

Mjerenje reaktivnih kisikovih vrsta u ljudskom miokardu za vrijeme reperfuzije i načini njihove prevencije

Boras, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:783256>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-10**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET SPLIT

Ema Boras

**MJERENJE REAKTIVNIH KISI KOVIH VRSTA U LJUDSKOM MIOKARDU ZA
VRIJEME REPERFUZIJE I NAČINI NJIHOVE PREVENCIJE**

Diplomski rad

Akadska godina: 2022./23.

Mentor:

Prof. dr. sc. Marko Ljubković

Split, srpanj 2023.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Ishemijska bolest srca	2
1.2. Akutni koronarni sindrom	4
1.3. Terapeutski postupci-revaskularizacija	6
1.4. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda	7
1.5. Reaktivne kisikove vrste (ROS)	9
1.6. Mitohondriji	11
1.6.1. Krebsov ciklus (ciklus limunske kiseline)	12
1.6.2. Oksidativna fosforilacija	13
1.7. ROS iz mitohondrija	15
1.8. Reverzni transport elektrona (RET)	17
1.9. Strategije prevencije reverznog transporta elektrona	19
1.10. Metformin – mehanizam djelovanja	21
1.11. Opcije korištenja metformina u liječenju drugih patoloških stanja (osim dijabetesa tipa 2)	23
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	26
2.1. Cilj istraživanja	27
2.2. Hipoteze istraživanja	27
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. Mjerenje reaktivnih kisikovih vrsta (superoksidnog aniona) u tkivu miokarda	29
3.1.1. Pacijenti	29
3.1.2. Priprema uzoraka za elektronsku paramagnetnu rezonancu (EPR)	30
3.1.3. Koncept elektronske paramagnetne rezonance	30
3.2. Mjerenje proizvodnje superoksida u uvjetima simulirane reperfuzije <i>in vitro</i>	31
3.2.1. Metoda Amplex Red sustava	33

3.2.2. Okolnosti mjerenja ROS-a putem Oroboros instrumenta.....	34
3.3. Statistička obrada.....	34
4. REZULTATI	35
4.1. Stvaranje ROS u ranoj fazi reperfuzije nakon postavljanja aorto-koronarne prenosnice	36
4.2. Stvaranje ROS za vrijeme oksidativne fosforilacije i u uvjetima simulirane reperfuzije	37
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČCI	44
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	46
8. SAŽETAK	52
9. SUMMARY	55

Zahvaljujem se

Mom dragom mentoru, profesoru koji i najkompleksnije teme može pretvoriti u priču. Hvala Vam što ste još na početku fakulteta u meni potaknuli novi logični način razmišljanja, koji me kasnije kroz fakultet nikada nije napustio. Uz opušteni pristup, pomoć na svakom koraku i dozu zezancije kroz svaki susret, ovaj diplomski rad će ostati u mom sjećanju kao jedno predivno iskustvo.

Mojoj mami, koja me naučila kako se izboriti za sebe i nikada ne odustati. Ti si izvor moje hrabrosti, zbog tebe ne pristajem na manje.

Mome tati, koji me naučio najvažnijim životnim vrijednostima. Moj si veliki uzor, i mogu se samo nadati da ću jednoga dana biti tako cjelovita i svestrana osoba poput tebe.

Mojoj sestri, koja je uvijek pazila svoju malu sestru, i bila joj najveća podrška kada joj je bilo najteže. Sada i ja mogu biti tu za tebe, sad kad si me naučila kako.

Mojim prijateljima, bez kojih ovo jedinstveno razdoblje ne bih mogla zamisliti. Hvala Vam što ste imali strpljenja za mene i učinili me boljom osobom te sa mnom proživjeli neke od zasada najljepših i najluđih trenutaka.

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

NO- dušikov oksid, engl. *nitric oxide*

LDL- lipoprotein niske gustoće, engl. *low density lipoprotein*

VLDL- lipoprotein vrlo niske gustoće, engl. *very low density lipoprotein*

CHD- kronična srčana bolest, engl. *chronic heart disease*

IM- infarkt miokarda

STEMI- infarkt miokarda sa podizanjem ST-spojnice, engl. *ST elevation myocardial infarction*

NSTEMI- infarkt miokarda bez podizanja ST-spojnice, engl. *non-ST-elevation myocardial infarction*

EKG- elektrokardiografija

PCI- perkutana koronarna intervencija, engl. *percutaneous coronary intervention*

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

IR ozljeda- ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

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

ATP-adenozin trifosfat

ADP-adenozin difosfat

AMP-adenozin monofosfat

cAMP- ciklički adenin monofosfat

mPTP- mitohondrijska permeabilizacijska pora, engl. *mitochondrial permeability transition pore*

SOD- superoksid dizmutaza, engl. *superoxide dismutase*

OAA-oksaloacetat

NADH-nikotin amin dinukleotid

FADH₂- flavin adenin dinukleotid

ETC-transportni lanac elektrona, engl. *electron transport chain*

H⁺-vodikov ion

SDH- sukcinat dehidrogenaza

PNC- ciklus purinskih nukleotida, engl. *purine nucleotide cycle*

MAS- malat/aspartat prijenos, engl. *malate aspartate shuttle*

RET- reverzni tok elektrona, engl. *reverse electron transport*

AMPK- AMP kinaza

GLUT4- glukozni transporter tip 4

EPR- elektronska paramagnetna rezonanca

FMN- flavin mononukleotid

CMH indikator- 1-hidroksi-3-metoksikarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirolidin

CM: 3-metoksikarbonil-proksil nitroksid

HRP- peroksidaza podrijetla hrena, engl. *horseradish peroxidase*

AICAR- 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleotid

MitoSNO- mitohondrijski selektivni S-nitrosation, engl. *mitochondria selective S-nitrosation*

TTP- lipofilni trifenil-fosfonij, engl. *lipophilic triphenyl-phosphonium*

1.1 Ishemijska bolest srca

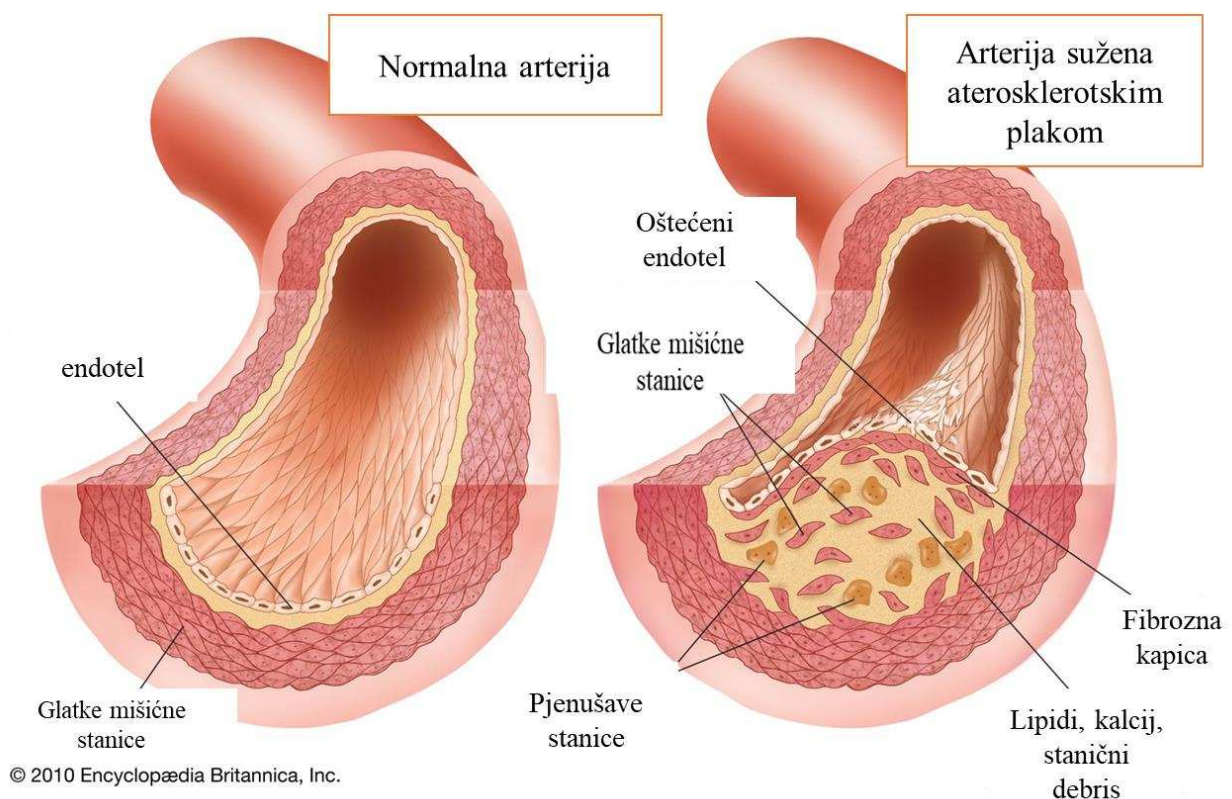
Ishemiju definiramo kao neadekvatni dotok krvi (i kisika) u određeno područje uslijed začepljenja krvne žile koja ga opskrbljuje. Ishemijska srčana bolest (koronarna srčana bolest), je naziv za oštećenje miokarda koje nastaje uslijed suženja koronarnih arterija. Uzrok toga suženja je najčešće ateroskleroza, kronična upalna bolest arterija (1). Aterosklerozu karakteriziraju naslage u području intime stijenke krvne žile (ispod njezina endotela), koje se zovu ateromima. Ateromi se šire prema lumenu i zbog toga ga sužavaju, a osim toga i mijenjaju kvalitetu same stijenke zbog čega ona gubi elasticitet. Oni sadržavaju (Slika 1.):

1. Lipide;
2. Upalne stanice i glatke mišićne stanice;
3. Matriks vezivnoga tkiva koji može u različitim stadijima svoje organizacije sadržavati trombe ili depozite kalcija.

Podlogu razvoju ateroskleroze čini ozljeda endotela krvne žile koja dovodi do posljedične upalne reakcije. Ovakve ozljede nastaju na područjima grananja arterija gdje je tok krvne struje turbulentan. Turbulentan tok krvi potiče endotelne stanice na ekspresiju adhezijskih molekula koje vežu upalne stanice, a osim toga i inhibira proizvodnju dušičnog oksida (NO), važnog vazodilatatora s protuupalnim djelovanjem. Ekspresija adhezijskih molekula ponajviše privlači monocite (vrstu upalnih stanica), koji se potom smještaju subendotelno i prelaze u makrofage, te lipide krvne struje: LDL (engl. Low density lipoprotein) i VLDL (engl. Very low density lipoprotein) koji se tu oksidiraju. Makrofazi preuzimaju oksidirane lipide pri čemu formiraju pjenušave stanice. One dalje luče upalne citokine koji potiču migraciju glatkih mišićnih stanica iz medije stijenke krvne žile. Različiti drugi čimbenici dovode do nakupljanja vezivnog tkiva odnosno formiranja vezivnog matriksa. Rizični faktori za aterosklerozu (šećerna bolest, dislipidemija, pušenje, hipertenzija), oksidativni stresori (superoksidni radikal) upala i sistemska infekcija također inhibiraju proizvodnju NO i stimuliraju ekspresiju adhezijskih molekula, pro upalnih citokina i vazokonstriktora, na još uvijek ne u potpunosti razjašnjene načine (2).

Ateroskleroza koronarnih krvnih žila najčešći je uzrok kronične srčane bolesti (engl. Chronic heart disease, CHD) (3). Rane faze CHD (suženje do 50% promjera lumena) se uglavnom ne očituju klinički, ukoliko ne dođe do pojave akutne komplikacije (npr. akutnog koronarnog sindroma). Tek danjim napredovanjem bolesti i većim suženjem lumena ona će se početi klinički očitovati kao pektoralna angina ili pak nijema ishemija.

Simptomi stabilne pektoralne angine su prisutni u stanjima fizičkoga napora ili emocionalnog stresa. Obično je riječ o nelagodi ili boli u prsištu, čeljusti, ramenima, leđima ili rukama. Patofiziološka pozadina tih simptoma je nemogućnost povećanja protoka krvi kroz sužene krvne žile u stanjima povećanih potreba (4). Povećane potrebe za kisikom u ovim su (i ostalim sličnim) stanjima posljedica ubrzanja srčane frekvencije, povišenja krvnog tlaka i povećanja snage srčane kontrakcije. Adekvatna fiziološka koronarna vazodilatacija izostaje kada su koronarne krvne žile zahvaćene aterosklerozom, i upravo zbog toga se javljaju navedeni simptomi (5). Oni pak nestaju na primjenu nitroglicerina odnosno prilikom odmora (4).



Slika 1. Prikaz aterosklerotskog plaka (preuzeto i prilagođeno prema : Atherosclerosis | Description, Pathophysiology, Risk Factors, & Treatment | Britannica [Internet]. [citirano 10. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/atherosclerosis>

1.2 Akutni koronarni sindrom

Prethodno je opisano kako arterije zahvaćene aterosklerozom gube elastičnost i postaju sve uže kako aterosklerotske naslage rastu. Ove naslage mogu biti stabilne i nestabilne, ovisno o njihovoj građi i sastavu.

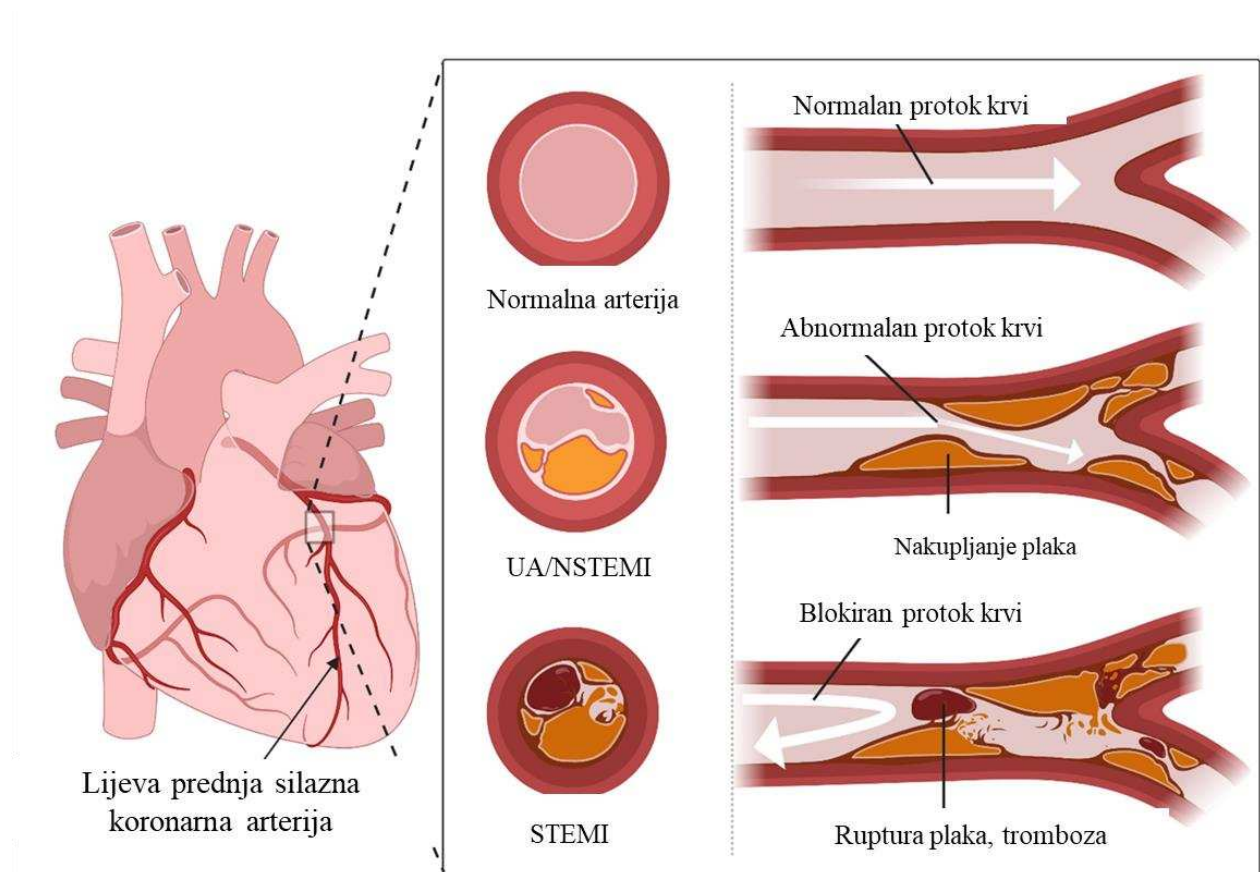
Stabilni plakovi su statični i polagano rastu uzrokujući nakon nekoliko desetljeća stenozu ili okluziju.

Nestabilni plakovi su podložni spontanim erozijama, fisurama ili rupturama što vodi u trombozu, okluziju ili infarkciju prije nego su narasle toliko da bi dovele do hemodinamski značajne stenozе. Većina kliničkih manifestacija koronarne srčane bolesti posljedica je nestabilnih naslaga.

Nestabilni plakovi imaju u svome sastavu visok udio makrofaga i lipida, pokriveni su tankom fibroznom „kapičom“ i sužavaju lumen krvne žile za manje od 50%. Kao što možemo pretpostaviti iz njihova naziva, nepredvidivog su ponašanja, pri čemu imaju tendenciju ka spontanoj rupturi (2). Upravo je ruptura plaka prijelomna točka, jer su tada moguća dva scenarija- u prvom se plak puni krvlju i širi, sve više sužujući lumen. U drugome sadržaj ateroma dolazi u doticaj sa strujom krvi što aktivira sustav agregacije trombocita i koagulacije, odnosno uzrokuje trombozu. U oba scenarija je dotok krvi u dio miokarda kojeg opskrbljuje ta koronarna krvna žila oslabljen (bilo djelomično ili u potpunosti. Ako je protok donekle održan javlja se klinička slika nestabilne angine ili infarkta miokarda bez podizanja ST spojnice (engl. non-ST-elevation myocardial infarction, NSTEMI), a ako je on u potpunosti prekinut infarkt miokarda s podizanjem ST spojnice (engl. ST elevation myocardial infarction, STEMI). (Slika 2.) Tada govorimo o akutnom koronarnom sindromu, akutnoj komplikaciji koronarne srčane bolesti (6).

Nestabilna angina ima simptome jednake onima pektoralne angine s tim da je bol jača ili dulje traje, javlja se u mirovanju ili se s vremenom pogoršava. Infarkt miokarda (IM) najčešće je karakteriziran dubokom substernalnom boli, karaktera pritiska, s mogućim širenjem u donju čeljust, rame, ruku, leđa. Bol može biti praćena zaduhom, preznojavanjem, mučninom i povraćanjem. Ona ne popušta u mirovanju ili na nitroglicerinu. Pacijenti nerijetko prije imaju prodromalne simptome (zaduha, zamor). Smetnje su u otprilike 20% akutnih slučajeva infarkta miokarda blage, pa govorimo o nijemom infarktu, uglavnom kod pacijenata s dijabetesom i žena. Stariji pacijenti češće osjećaju zaduhu nego bol u prsištu.

S obzirom da ishemično i nekrotično tkivo ima poremećenu električnu aktivnost, javljaju se specifične promjene u elektrokardiografskom zapisu (obično ST–T promjene, aritmije, smetnje provođenja). Ishemične ST–T promjene uključuju spuštanje ST–segmenta (često silaznog tijeka) ili njegovo podizanje, inverziju T–vala, visoke T–valove u hiperakutnoj fazi infarkta. Ovisno o tome da li na elektrokardiografskom zapisu (EKG-u) nalazimo podizanje ili spuštanje ST-spojnice infarkt miokarda dijeli se na STEMI i NSTEMI. Da bi se postavila dijagnoza IM, potrebno je, osim kliničkog pregleda i EKG-a, također obaviti laboratorijsku dijagnostiku, odnosno izmjeriti srčane markere. Srčani markeri su srčani enzimi (srčani tip kreatin kinaze, engl. creatine kinase-myocardial band, CK–MB) i komponente srčanih stanica (troponin I, troponin T, mioglobin). Oni se otpuštaju u krv nakon oštećenja kardiomiocita. Markeri najspecifičniji za IM su troponini (7).



Slika 2. Razlika patologije STEMI i nestabilne angine/NSTEMI. Preuzeto i prilagođeno prema: Metabolites Free Full-Text Defining Acute Coronary Syndrome through Metabolomics [Internet]. [citirano 10. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2218-1989/11/10/685>)

1.3 Terapeutski postupci- revaskularizacija

Početni pristup pacijentu s akutnim koronarnim sindromom uključuje primjenu aspirina (300 mg), klopidogrela, kisika i nitroglicerina. Dodatno se može uključiti i morfij (za smanjenje jake boli) te lijek iz skupine antiaritmika (ukoliko nastupe simptomatske ventikularne aritmije), po potrebi. Daljnji pristup ovisi o tome ima li pacijent STEMI ili pak NSTEMI/nestabilnu anginu.

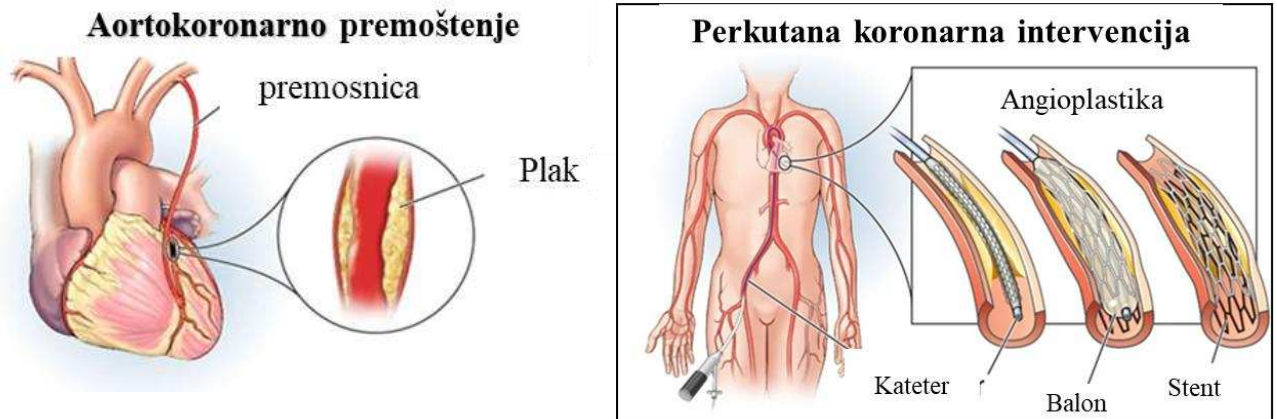
Ako je riječ o STEMI-u, odabrani terapijski pristup je neka od metoda revaskularizacije: perkutana koronarna intervencija (engl. Percutaneous coronary intervention, PCI), aortokoronarno premoštenje (engl. coronary artery bypass grafting, CABG) i fibrinolitička terapija. S obzirom da je PCI zlatni standard, prvi je izbor ukoliko ga se može napraviti unutar 120 minuta od prijema pacijenta. Ukoliko to nije moguće, preostaje odraditi fibrinolitičku terapiju (8).

PCI je invazivna nekirurška procedura kod koje se opstrukcija uklanja pomoću baloniranja zahvaćenoga segmenta i postavljanja stenta koji lumen održava otvorenim (9). Kateter s balonom se uvodi kroz perifernu krvnu žilu (najčešće a. femoralis ili a. brachialis) sve do razine koronarnih arterija, pri čemu se njegova lokalizacija detektira iniciranjem kontrasta (kojeg pak bilježimo dijaskopski pomoću x-zraka) (Slika 3.).

CABG se nameće kao bolja opcija u slučaju višežilne koronarne srčane bolesti, disfunkcije lijevoga ventrikula, uznapredovale opstrukcije lijeve glavne koronarne arterije, te kod pacijenata s dijabetesom (10). Također preostaje kao alternativa ukoliko PCI ne poluči uspjeh ili se razvije neka mehanička komplikacija (npr. ruptura papilarnog mišića/septuma). Prilikom CABG-a se medijalnom sternotomijom pristupa srcu, pri čemu se izdvaja lijeva a. mammaria interna ili graft v. saphene magnaе koje se potom koriste kao premosnica. Premosnica se povezuje sa zahvaćenom koronarnom krvnom žilom distalno od blokade s jedne strane, a s druge s proksimalnom aortom (11). S obzirom da je CABG zahtjevna otvorena kirurška metoda, znatno se rjeđe provodi u odnosu na široko rasprostranjenu PCI (Slika 3.).

Ako se pak ustanovi da je riječ o NSTEMI/nestabilnoj angini uključuje se antikoagulantna terapija. Različite institucije imaju različite protokole, a često je izbor bolus nefrakcioniranog heparina s nastavkom kontinuirane intravenske infuzije heparina (12). Daljnji pristup ovisi o tome pripada li pacijent skupini visokog ili niskog kardiovaskularnoga rizika, kao i o odgovoru pojedinog pacijenta na prethodno danu antikoagulantnu terapiju.

Visokorizični pacijenti i oni koji ne odgovaraju na terapiju bit će upućeni na neku od metoda revaskularizacije (13).



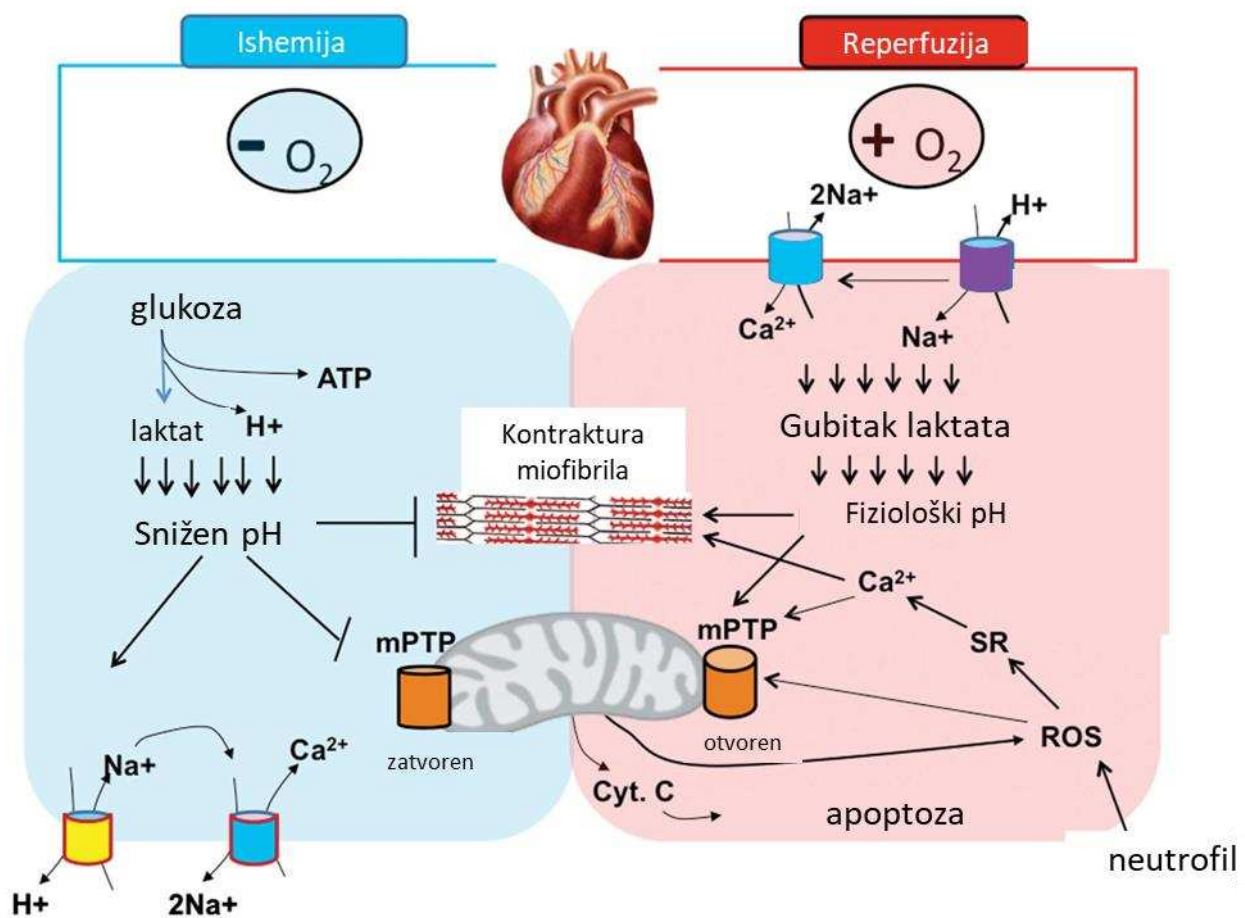
Slika 3. Način izvođenja aortokoronarnog premoštenja (CABG) i perkutane koronarne intervencije (PCI) (preuzeto i prilagođeno prema: Cleveland Clinic [Internet]. [citirano 10. srpanj 2023.]. Coronary Revascularization: Procedure Details & Risks. Dostupno na: <https://my.clevelandclinic.o>

1.4 Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (IR ozljeda) nastaje kada je dotok krvi u neko tkivo prekinut na određeno vrijeme (minuti do sati) a potom ponovno uspostavljen. Najbolji primjer za nju je upravo IR ozljeda miokarda nakon PCI-a ili pak CABG-a, ali ju nalazimo i u nizu drugih primjera. Neki od njih su transplantacija organa, moždani udar, hipovolemijski šok i elektivne kirurgije (14). Da bi tkivo izloženo ishemiji ostalo vitalno, nužno je osigurati ponovni dotok krvi odnosno reperfuziju. Veliki uspjeh u preživljavanju pacijenata s IM temelji se upravo na tehnikama reperfuzije, i zato je ona posljednjeg desetljeća postala široko rasprostranjena hitna metoda zbrinjavanja ovakvih bolesnika.

No, ono što se počelo primjećivati zahvaljujući laboratorijskim eksperimentima je da prilikom same reperfuzije nastaje većina IR ozljede. Naime, tokom perioda ishemije nastaju promjene u tkivu koje čine podlogu za oštećenje tokom faze reperfuzije. Trajanje ishemije koje je za to potrebno varira ovisno o vrsti pogođenog tkiva. Pri tome je ono što se dogodi u prvih nekoliko minuta nakon reperfuzije ključno za inicijaciju dugoročnog oštećenja. Tu glavnu ulogu igraju reaktivne kisikove vrste (engl. reactive oxygen species, ROS) iz mitohondrija (15). One uzrokuju oksidativno oštećenje mitohondrija i posljedično tomu remete mehanizam proizvodnje adozin trifosfata (ATP-a). ROS induciraju otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pore (engl. mitochondrial permeability transition pore, mPTP) (Slika 4.).

MPTP je protein koji se formira na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani pod određenim uvjetima, koji povećava njenu propusnost i otvara put komponentama matriksa mitohondrija prema van, pri čemu one izlaze u citoplazmu (16). To dalje inducira rupturu mitohondrija, poremećaj njegovog membranskog potencijala, programiranu staničnu smrt ili nekrozu. Usljed nastalog oštećenja mitohondrija otpuštaju se i molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (engl. damage-associated molecular pattern molecule, DAMPs), poput mitohondrijske DNA, što inicira sterilni upalni odgovor. Nastala upala pridonosi IR ozljedi. Na zahvaćenom području kao rezultat ovih procesa dolazi do remodeliranja i formiranja fibroznoga ožiljka zbog čega zahvaćeni organ ne funkcioniše kao prije i razvija dugoročnu patologiju CHD (15).



Slika 4. Patofiziologija ishemijsko-reperfuzijske ozljede. (preuzeto i prilagođeno prema: Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury (Review) [Internet]. [citirano 13. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2016.3877>)

1.5 Reaktivne kisikove vrste (ROS)

Reaktivne kisikove vrste su nestabilne molekule koje u svom sastavu imaju kisik. U reaktivne kisikove vrste ubrajamo superoksidni anion, hidroksilni radikal, perhidroksilni radikal i vodikov peroksid. One teže brzoj stabilizaciji, pa lako reagiraju s molekulama iz svoje okoline. Tako započinju lančanu reakciju u kojoj nastaju novi radikali. Dva se radikala mogu međusobno i neutralizirati, no to se događa iznimno rijetko zbog kratkog vremena poluživota pojedinog radikala te niske koncentracije radikala u tkivu. Kako je mala vjerojatnost da će dva radikala reagirati jedan s drugim, oni u suvišku interferiraju s okolnom DNA, lipidima i proteinima, što rezultira njihovim oštećenjem. Takva oštećenja nazivamo oksidacijskim oštećenjima (17). No, ROS ne trebamo smatrati „lošim“ molekulama. One imaju broje fiziološke funkcije u organizmu, i njihov manjak čini podlogu za određene patologije (kronična granulomatozna bolest, autoimune bolesti), kao i njihov suvišak (kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, karcinomi).

Niske do umjerene razine ROS sudjeluju u:

1. Regulaciji staničnog signaliziranja (u smislu rasta, programirane stanične smrti..);
2. Odbrani domaćina od infektivnih mikroorganizama
(indirektno- generiranje imunološkog odgovora,
i direktno -uništavanje mikroorganizama);
3. Bio sintezi određenih tvari u organizmu (jodinacija tiroidnih hormona);
4. Složenim sistemskim funkcijama (regulacija krvnog tlaka i kognicija).

Specifičnost biološkog djelovanja postiže se ovisno o količini, trajanju i lokalizaciji produkcije ROS-a. Stvaraju se u mitohondrijima za vrijeme oksidativne fosforilacije uslijed „istjecanja“ elektrona, kao nusprodukt tokom metaboličkih reakcija te putem enzima NADPH oksidaza.

U organizmu stalno teku reakcije oksidacije i redukcije (redoks-reakcije). Ukoliko se ravnoteža pomakne prema reakcijama oksidacije javlja se oksidacijski stres. On uzrokuje oštećenje makromolekula i posljedičnu patologiju. Oksidacijom DNA dolazi do mutacija gena (osnova široke palete bolesti), dok oksidacijom proteina dolazi do formiranja netopljivih proteinskih agregata (osnova neurodegenerativnih bolesti) (18). Nastale preinake aminokiselina i posljedično proteina dovode do tog da ih imunološki sustav prepozna kao strane što čini osnovu za razvoj autoimunih bolesti.

Zbog djelovanja na proteine/lipide LDL-a, ni on se ne prepoznaje na vlastitim receptorima u jetri pa se nakuplja u krvnoj struji, gdje ga hvataju makrofazi. Takvi se makrofazi se nakupljaju unutar endotela krvnih žila i postaju pjenušave stanice što je patofiziološka osnova razvoja ateroskleroze (17). ROS također sudjeluju u stvaranju napredno glikoziliranih završnih produkata (engl. advanced glycosylated endproducts, AGE) - glikoziliranih proteina i lipida koji su uključeni u razvoj raznih kroničnih bolesti poput ateroskleroze, dijabetesa, Alzheimerove bolesti i sl (18).

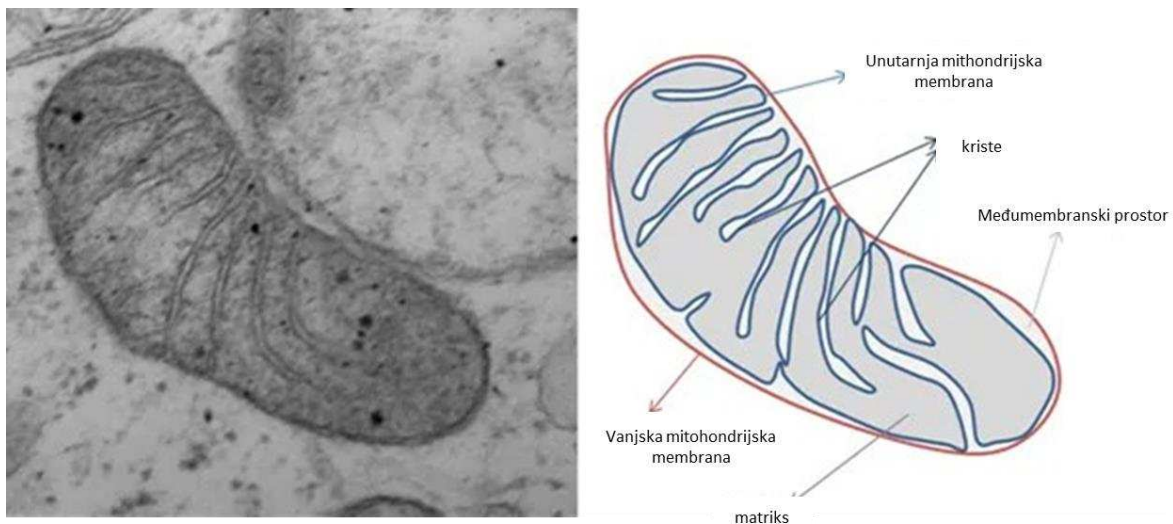
Zbog navedenih štetnih učinaka oksidativnog stresa razvijeni su mehanizmi obrane od njega, odnosno enzimi i "hvatači" koji eliminiraju ROS. To su superoksid dismutaza (engl. Superoxide dismutase, SOD) koja katalizira reakciju između superoksidnog radikala i vode pri čemu nastaju kisik i vodikov peroksid. Vodikov peroksid pak uklanja katalaza te različite peroksidaze. Lipidne perokside (nastale oštećenjem lipida putem ROS-a) reduciraju glutathion peroksidaza i vitamin E (17). Thioredoksini reduciraju oksidirane proteine. Peroksiredoksini reguliraju razinu peroksida induciranu citokinima. „Hvatači“ su uglavnom dijetetskog podrijetla i uključuju vitamin C i E, uričnu kiselinu, polifenole i karotenoide. U cijeloj je priči ključno putem navedenih mehanizama održavati optimalan omjer proizvodnje i razgradnje ROS-a kako se ne bi narušila delikatna ravnoteža između primjerenog redoks stanja i oksidativnog stresa (18).

1.6 Mitochondriji

Mitochondriji su stanične organele koje nalazimo u svim eukariotskim stanicama. Centar su proizvodnje energije u obliku ATP-a koja je nužna za zadovoljavanje staničnih potreba. Mehanizam koji im to omogućuje je proces oksidativne fosforilacije. Osim proizvodnje energije, mitochondriji imaju još mnoštvo funkcija. Uključeni su u druge metaboličke procese, poput sinteze proteina, metabolizma nukleotida i aminokiselina, katabolizma masnih kiselina, lipida, bio sinteze steroida, programirane stanične smrti, homeostaze iona (19).

Podrijetlo mitochondrija pripada grupi alfa-proteobakterija. Takva je bakterija u davnoj prošlosti ušla u eukariotsku stanicu (za koju se smatra da je pobježe povezana s grupom Archaea). Iz te je stanice ona crpila hranjive tvari (kisik i piruvat), ali je pritom nusproizvodom svog metabolizma priskrbivala istu. Kako se taj nusproizvod ATP, pokazao i više nego kvalitetnim izvorom energije za samu stanicu, između preteče mitochondrija i eukariotske stanice razvila se simbiotska povezanost, od koje su obje članice imale korist. Ovaj je proces bio vrlo značajan u samoj evoluciji eukariotskih organizama. On se razvijao postupno, kroz tisuće postepenih koraka tranzicije bakterije u organelu, te ga se nikako se smije smatrati jedinstvenim događajem, kao što se često pogrešno interpretira. Kompleksnost eukariotskog genoma i proteoma se tokom danje evolucije povećavala, dok su se genom i proteom budućeg mitochondrija smanjivale jer je organela inkorporirala dio vlastitog genoma u onaj domaćina (20). Stoga su mitochondriji izgrađeni dijelom od proteina kodiranih vlastitim genomom, a dijelom od onih kodiranih genomom jezgre i unesenih iz citoplazmatskoga matriksa, što ih čini jedinstvenim među organelima. Njihova DNA kodira za neke proteine mitochondrija, ribosomsku RNA te transportnu RNA.

Mitochondrije čini unutarnja i vanjska membrana odijeljene međumembranskim prostorom. Unutarnja membrana oblikuje brojne nabore (kriste) koji se protežu u unutrašnjost (matriks) organela i znatno je manje propusna od vanjske. Enzimi odgovorni za metaboličke procese smješteni su upravo na unutarnjoj membrani i u matriksu mitochondrija. U matriksu se još nalaze kružna molekula mitochondrijske DNA te mnogobrojni ribosomi (21).

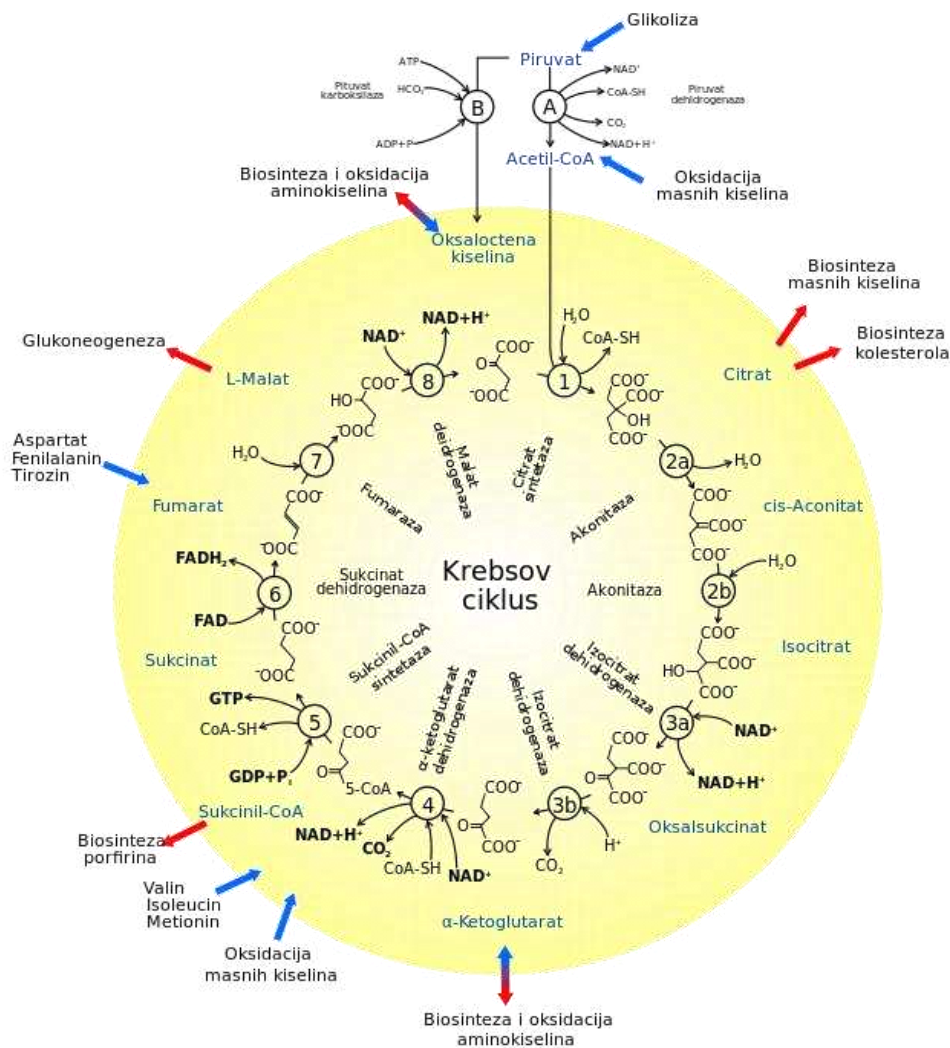


Slika 5. Prikaz mitohondrija elektronskim mikroskopom. (preuzeto i prilagođeno prema: What are mitochondria? [Internet]. Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research. 2016 [citirano 10. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.newcastle-mitochondria.com/patient-and-public-home-pag>)

1.6.1 **Krebsov ciklus (ciklus limunske kiseline)**

Putem ciklusa limunske kiseline omogućeno je da se degradacija unesenih hranjivih tvari- ugljikohidrata, masti i proteina prevede do ugljičnog dioksida (CO_2) i vode uz paralelno oslobađanje kemijske energije. Krebsov ciklus je također važan izvor preteča aminokiselina (acetil koenzima a, α -ketoglutarata, sukcinil koenzima a, sukcinata, fumarata, oksalacetata).

Osnovni supstrat Krebsova ciklusa je acetil koenzim a (acetil CoA), kojeg čini jedna acetilna skupina vezana za koenzim a. Tijekom ciklusa dvije molekule acetil-CoA oslobađaju svoje acetilne skupine, koje se potom spajaju s oksalacetatom (OAA) da bi generirale limunsku kiselinu. Limunska kiselina prolazi kroz niz kemijskih reakcija, pri tome oslobađajući dvije molekule CO_2 nakon čega se regenerira natrag u OAA. U ciklusu se stvara molekula gvanozin trifosfata koja je u energetsom smislu jednaka ATP-u. Osim tog proizvode se tri molekule reduciranog nikotin adenin dinukleotida (NADH) i jedna molekula flavin adenin dinukleotida (FADH_2)(Slika 6.). Ovi reducirani koenzimi će se služiti kao davaoci elektrona u reakcijama oksidativne fosforilacije koja slijedi (22).



Slika 6. Ciklus limunske kiseline. (izvor: Krebsov ciklus – Wikipedija [Internet]. [citirano 13. srpanj 2023.]. Dostupno na: https://hr.wikipedia.org/wiki/Krebsov_ciklus)

1.6.2 Oksidativna fosforilacija

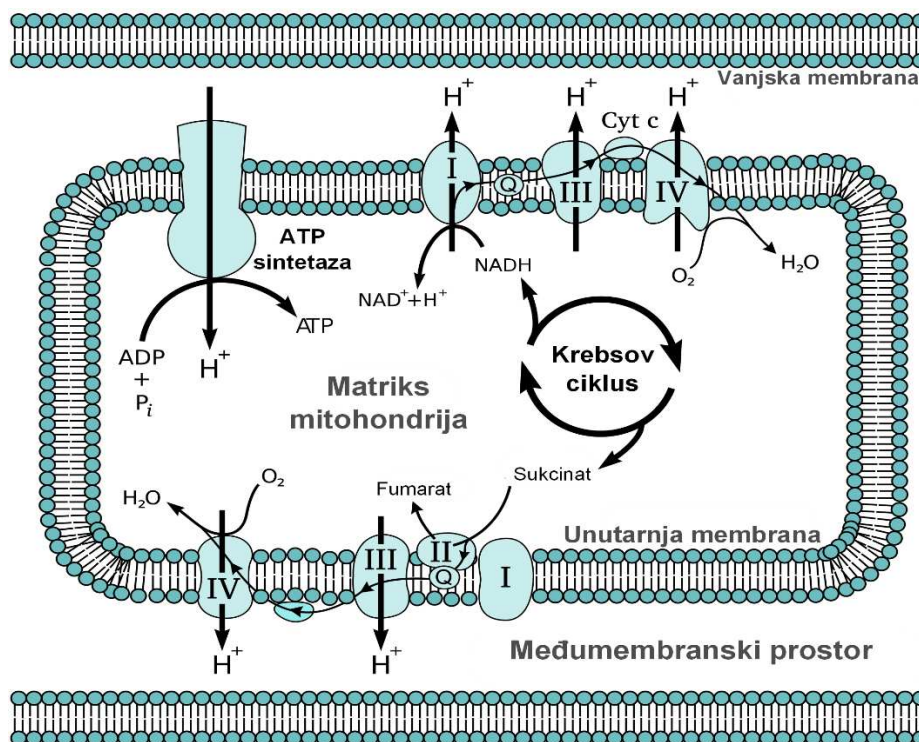
Oksidativna fosforilacija je stanični proces u kojemu dolazi do redukcije kisika pri čemu se generiraju visokoenergetske fosfatne veze u sklopu molekule ATP-a. Čini ju niz oksidacijsko-redukcijskih reakcija koje uključuju transfer elektrona od NADH i FADH₂ (generiranih u ciklusu limunske kiseline) do kisika preko sustava proteina, lipida i metala u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani. Taj se sustav zove transportni lanac elektrona (engl. electron transport chain, ETC). S obzirom da je u procesu oksidativne fosforilacije završni primalac elektrona kisik, a upravo se tokom nje generira glavnina energije za stanične potrebe, to je razlog zbog kojeg je svim eukariotskim stanicama kisik nužan za preživljavanje.

Četiri kompleksa proteina koji imaju funkciju enzima su uključena u transport elektrona u ETC. Na njima se odvijaju reakcije oksidacije i redukcije, što omogućuje prijenos elektrona s jednog nosača na drugi. Ti se kompleksi označuju brojevima: kompleks I, II, III i IV. Kompleks V (ATP sintetaza) ima drugačiji mehanizam rada od ostalih. Na kompleksu V (ATP-azi) se generira ATP, stoga on predstavlja mjesto fosforilacije (ADP-a u ATP) u procesu oksidativne fosforilacije. Kompleksi I, III i IV u svom sastavu imaju kanal koji omogućuje prolaz vodikovih iona (H^+) iz matriksa mitohondrija u međumembranski prostor.

Da bi se elektroni preusmjerili s jednog kompleksa na idući potrebno je imati posebne prijenosnike. To su hidrofилni citokrom c (koji prolazi međumembranskim prostorom) i hidrofobni koenzim q (koji difundira fosfolipidnim dvoslojem unutrašnje mitohondrijske membrane)

- Koenzim q10 se u oksidiranom stanju zove još i ubikvinon (oznaka Q). Kada je reduciran, (nakon što preuzme elektrone s NADH i sukcinata) nosi na sebi dva iona vodika i jedan elektronski par u formi ubikvinola (QH₂). Po dolasku na kompleks III ponovno se oksidira natrag u ubikvinon.
- Citokrom c sastavljen je od atoma željeza okruženog porfirinskim prstenom. Redukcija i oksidacija željeza (između Fe^{2+} u Fe^{3+} oksidacijskih stanja) omogućuje mu da prenese jedan elektron od kompleksa III prema kompleksu IV (koji će ga predati finalnom primaocu kisiku) (23).

Prilikom prijenosa elektrona energija oksido-redukcijskih procesa pretvara se u potencijalnu energiju gradijenta protona. Gradijent protona nastaje na način da H^+ prelaze iz matriksa u međumembranski prostor (zahvaljujući energiji oslobođenoj predajom elektrona) kroz kanale kompleksa I, III i IV. Kompleks V iskoristit će energiju pohranjenu u tako formiranom gradijentu za prelazak H^+ (kroz njen vlastiti kanal) iz područja visoke (međumembranski prostor) koncentracije u područje niske (matriks) da bi iz adenzin difosfata (ADP-a) sintetizirala ATP. (Slika 7.) (17) Dakle, gradijent protona predstavlja oblik uskladištene energije, a još ga nazivamo i proto motornom silom (24). Bitno je naglasiti kako je unutarnja membrana mitohondrija nepropusna za većinu iona i malih molekula što je ključno za održavanje samog gradijenta protona (17).



Slika 7. Oksidativna fosforilacija. (izvor: Wikiwand [Internet]. [citirano 13. srpanj 2023.]. Wikiwand - Oksidativna fosforilacija. Dostupno na: https://wikiwand.com/sh/Oksidativna_fosforilacija)

1.7 ROS iz mitohondrija

Kako je već navedeno, dio elektrona tokom ETC ne dođe do davaoca koji mu je predodređen (citokrom c, koenzim q, molekularni kisik), nego „odluta“ u okolinu, reagirajući s kisikom u njoj, pri čemu nastaju ROS. Čak 2-3% kisika koji dnevno potroše mitohondriji služi za generiranje ROS-a ovim putem. Upravo je ta količina ROS-a idealna za normalno funkcioniranje mitohondrija, odnosno time i stanice. Proizvodnja ROS-a iznad ove razine remeti balans i ROS preuzimaju ulogu pokretanja stanične smrti na mjesto dosadašnjeg signaliziranja. No i ovo djelovanje može biti fiziološko i patološko. Fiziološko je ukoliko se na taj način eliminiraju neželjene stanice tkiva koje imaju još uvijek sposobnost mitoze, a patološko ukoliko se eliminiraju stanice koje više nemaju mogućnost dijeljenja (npr. kardiomiociti). Upravo se ovo patološko djelovanje ROS-a očituje tokom reperfuzije (25).

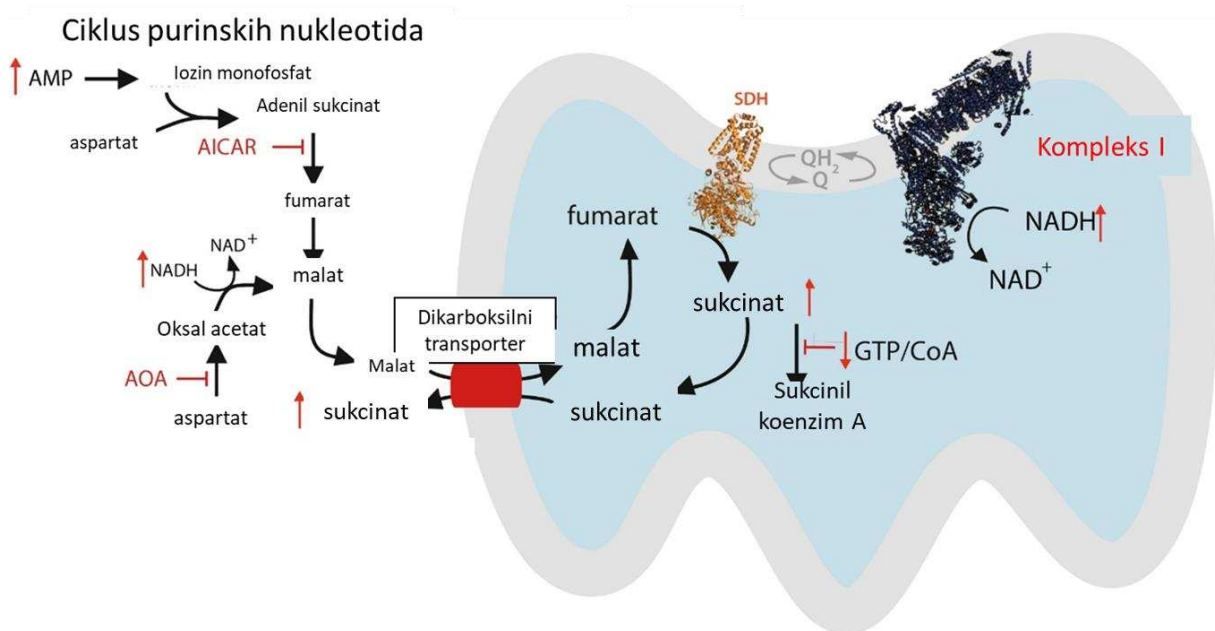
Provođenjem eksperimenata na mišjem bubregu, jetri i srcu te na mozgu štakora koji su *in vivo* bili pogođeni ishemijskom, ustanovilo se da dolazi do nakupljanja različitih metabolita. Samo tri metabolita od brojnih su bili povećani u svim tkivima- hipoksantin, ksantin i sukcinat. Hipoksantin i ksantin su svakako očekivani, oni su nusproizvodi razgradnje purinskih nukleotida (engl. purine nucleotide cycle, PNC) koja se događa uslijed akumulacije adenozin monofosfata (AMP-a) u ishemijskim uvjetima. Njih razgrađuje ksantin oksidoreduktaza u citoplazmatskom matriksu i oni ne pridonose mitohondrijskom metabolizmu. Treći metabolit, sukcinat, pripadnik je ciklusa limunske kiseline i jedini je mitohondrijski biljeg ishemije. Akumulacija sukcinata tokom razdoblja ishemije proporcionalna je njenom trajanju. U fazi reperfuzije on se ubrzano metabolizira (vraća se na normoksične razine unutar 5 minuta) dok se u isto vrijeme (proporcionalno opsegu nakupljenog sukcinata) mitohondrijska proizvodnja ROS-a povećava. No sukcinat se u razdoblju ishemije ne nakuplja zbog ubrzanog metabolizma (ugljikohidrata i masti) odnosno odvijanja samog procesa limunske kiseline. Ishodište njegovu gomilanju su mehanizmi drugačiji od fizioloških, a poticaj za njih je nakupljanje fumarata.

Fumarat raste tokom ishemije aktivacijom dva glavna metabolička puta.

- Prvi od njih je razgradnja nagomilanog AMP-a putem PNC. Tako se generira adenilsukcinat kojeg adenilsukcinat liaza dalje razgrađuje do fumarata. Da bi fumarat ušao iz citoplazme gdje se odvijaju ovi procesi u mitohondrijski matriks, prvo se mora konvertirati do malata da bi se preko dikarboksilnog nosača zamijenio za sukcinat. Na ovaj se način sukcinat raspodjeljuje kroz čitavu stanicu. Naime, fumarat ne može ući izravno u matriks jer nema vlastiti nosač koji bi mu to omogućio.
- Drugi metabolički put koji pridonosi gomilanju fumarata je transaminacija aspartata u OAA. Nju favorizira nakupljeni NADH koji će predati elektrone OAA (koji pritom prelazi u malat) kako bi se sam oksidirao. Aspartat osim deaminacijom pridonosi gomilanju fumarata i kroz PNC.

Fumarat koji se stvara navedenim mehanizmima dalje reducira sukcinat dehidrogenaza reverznim djelovanjem od uobičajenoga (Slika 8.). Uzrok tomu nalazimo u činjenici da su u uvjetima ishemije prekomjerno reducirane komponente respiratornog lanca, pa tako i konezim q i početni davalac NADH. Oni traže nove primatelje kojima bi predali svoje elektrone u težnji da postignu željeno oksidirano stanje. Maksimalno reducirani koenzim q tako predaje elektrone sukcinat dehidrogenazi (SDH) nalazeći novog primaoca kojeg ima u izobilju- fumarat, generirajući tako sukcinat.

Kako je sukcinat krajnji nagomilani metabolit, za čiju danju razgradnju nema potičućih uvjeta, njega smatramo glavnim metaboličkim biljekom ishemijske u tkivu (15).



Slika 8. Nakupljanje sukcinata u mitohondrijima u fazi ishemijske. (preuzeto i prilagođeno prema: Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C i sur. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. Cell Metab. 2016;23)

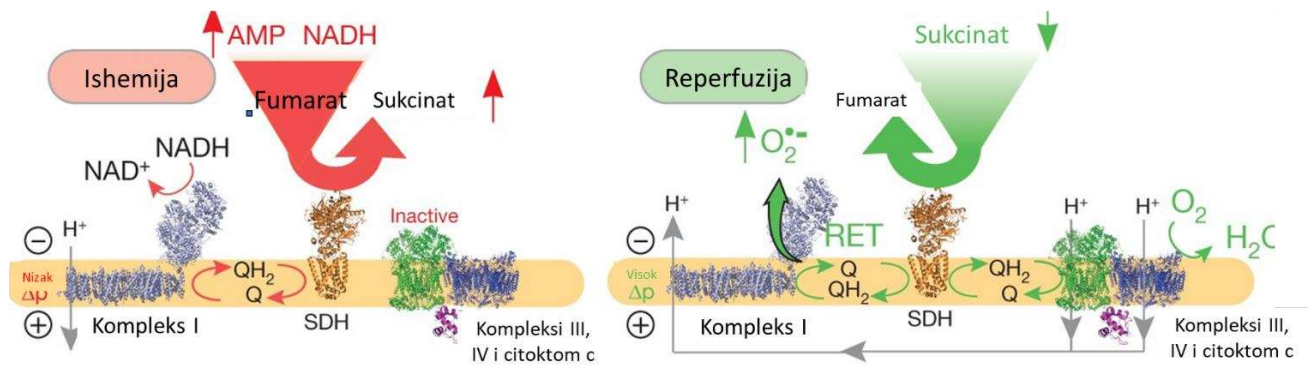
1.8 Reverzni transport elektrona

Prethodno je objašnjeno kako u uvjetima ishemijske komponente respiratornog lanca koje prenose elektrone postaju prekomjerno reducirane. Razlog tomu je što u uvjetima anoksijske nema završnog primaoca elektronskog lanca - kisika. Kako onda citokrom c nema kome predati elektrone, postaje prekomjerno reduciran. Kao rezultat toga, koenzim q nema kome predati elektrone pa i on postaje prekomjerno reduciran. Isto vrijedi i za NADH. To potiče sukcinat dehidrogenazu na obrnuto djelovanje, odnosno na redukciju nagomilanog fumarata u sukcinat, ne bi li na taj način oksidirala nakupljene reducirane spojeve. S obzirom da bez energije oksido-reduktivnog prijenosa elektrona nema ni energije koja bi omogućila kretanje H^+ iz matriksa mitohondrija u međumembranski prostor, proces oksidativne fosforilacije se zaustavlja, odnosno bez kisika na ovaj način nije moguće proizvoditi ATP.

Za vrijeme trajanja ishemije u stanici se potroši ADP i adenzin monofosfat (AMP), ishodišne molekule za proizvodnju energije ATP-a. AMP se deaminira i degradira do iozina i hipoksantina, ili se dalje metabolizira u PNC. (15) Zbog toga u fazi reperfuzije priljev kisika neće moći tek tako vratiti sustav na početno stanje. Naime, u trenutku kada je kisik ponovno dostupan nakupljeni sukcinat se oksidira djelovanjem SDH (teče Krebsov ciklus) i pri tom reducira bazen koenzima q. Citokrom c ponovno ima dostupnog primaoca elektrona (O_2). Zato kompleksi III i IV mogu ponovno krenuti s radom kroz konvencionalni transport elektrona, gradeći protomotorni gradijent H^+ . No, kako kompleks V nema dostupnog supstrata (ADP) nema niti proizvodnje ATP-a, odnosno toka H^+ u suprotnom smjeru. Gradijent pritom postaje prevelik i nadržava energiju oksidoreduktivnoga prijenosa. Jedini način da se nastavi transport elektrona je da se povrat H^+ uspostavi na drugom mjestu. To mjesto je kanal kompleksa I. Preduvjet da bi do toga došlo je (uz golemu protomotornu silu) maksimalno reducirani ubikvinol, koji će s jedne strane omogućiti konvencionalni rad kompleksa III i IV (što će izgraditi golemu protomotornu silu), a s druge RET kroz kompleks I.

Ubikvinol predaje elektrone preko kompleksa I, manjim dijelom na oksidirani nikotin amid dinukleotid (NAD^+), a većim dijelom na okolni kisik, pri čemu se generira superoksid. Uzrok tomu je što su razine NAD^+ u ranoj fazi reperfuzije niske jer se nagomilani reducirani NADH nije stigao značajno oksidirati.

Upravo je to proces reverznog toka elektrona (engl. reverse electron transport, RET) (Slika 9.). Superoksid sam po sebi čini štetu, ali također potiče stvaranje vodikova peroksida i ostalih reaktivnih kisikovih vrsta. Da je upravo oksidacija sukcinata odgovorna za generiranje ROS-a odnosno pokretanje RET-a pokazuju eksperimenti u kojima se inhibicijom nakupljanja sukcinata (inhibitorom SDH-dimetil malonatom) eliminira generiranje ROS-a. A da se RET odvija upravo preko kompleksa I dokazuje njegova blokada inhibitorom rotenonom koja znatno snižava razine detektiranog ROS-a (15).



Slika 9. Reverzni tok elektrona. (preuzeto i prilagođeno prema: Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL i sur. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. Nature. 2014;515:431-35.)

1.9 Strategije prevencije reverznog transporta elektrona

Navedene spoznaje na području patofiziologije IR ozljede otvaraju razne mogućnosti farmakološke intervencije kako bi se opsežnost ove ozljede minimalizirala. U istraživanja ovog problema se posljednjih desetljeća ulažu veliki naponi, no rezultati još uvijek ne zadovoljavaju. Dapače, čak i uspjesi dokazani na animalnim studijama prilikom primjene u kliničkim istraživanjima nisu pokazali značajnu korist. Prema tome, potrebni su novi pristupi i spoznaje koji bi omogućili ublažavanje ove široko rasprostranjene patologije.

Teorijski, moglo bi se djelovati na svakom koraku koji omogućuje RET ili neutralizira ROS. Za početak, jedna bi mogućnost bila spriječiti nakupljanje sukcinata tokom ishemije.

To bi se postiglo:

1. Inhibicijom SDH koja reverznim mehanizmom rada u uvjetima ishemije reducira fumarat u sukcinat, a uobičajenim načinom djelovanja tokom reperfuzije oksidira nagomilani sukcinat (što je prvi korak koji pokreće RET). Ta se inhibicija postiže posredno dimetil malonom, prekursorom malonata koji je kompetitivni inhibitor SDH.;
2. Blokodom puteva koji generiraju fumarat- ciklus purinskih nukleotida i prijenos malat/aspartat (engl. malate aspartate shuttle, MAS). Za to mogu poslužiti aminoociacetat koji inhibira aspartat aminotransferazu u MAS, te aminoimidazol karboksiamidom ribonukleotidom (engl. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, AICAR) koji inhibira adenilsukcinat liazu u PNC.

Drugi bi pristup bio inhibirati kompleks I na kojem se odvija reverzni tok elektrona što se može postići:

1. Inhibitorima kompleksa I poput rotenona i metformina. Rotenon je prirodni spoj, koji se koristi kao insekticid i herbicid. Po kemijskom je sastavu kompleksni keton koji zbog svoje izrazite lipofilnosti lako prolazi krvno-moždanu barijeru (26). Njegova se toksičnost temelji na visoko selektivnoj inhibiciji kompleksa I što uzrokuje sekundarno povećanu proizvodnju ROS-a (27).
2. Stabilizacijom kompleksa I u deaktiviranom stanju. Kompleks I prelazi u deaktivirano stanje kada određeno vrijeme (10ak minuta) ne „radi“- ne oksidira NADH i ne prenosi H⁺. Prelazak u to stanje praćen je konformacijskom promjenom. Pri tome se izlaže cisteinska skupina čijom se kovalentnom modifikacijom kompleks I zaključava u deaktiviranom stanju. Reverzibilnu modifikaciju tog cisteinskog ostatka moguće je postići thiol reaktivnim agensima; jedan od kojih je S-nitrosation selektivan za mitohondrije (engl. Mitochondria selective S-nitrosation, MitoSNO). Reverzibilnost je u ovom slučaju osigurana endogenim mehanizmima redukcije thiola (poput glutationa) nakon nekoliko minuta od početka reperfuzije. Time se tok elektrona na kompleksu I prevenira upravo u ono vrijeme reperfuzije kada se generira najviše ROS-a, odnosno kada nastaju najveća oštećenja tkiva. Nakon prolaska tog vremena, kompleks I vraća se u svoju punu aktivnost dok se sukcinat nagomilan tokom ishemije u međuvremenu već oksidirao (15).

Fokus farmakološkog djelovanja mogao bi biti i promjena ostalih uvjeta koji omogućavaju RET. Naime, da bi došlo do reverznog toka elektrona osim oksidacije sukcinata koja osigurava maksimalnu redukciju transportera (koenzima q i citokroma c) što onda generira golemu protomotornu silu, nužno je da je u stanici potrošen supstrat za sintezu ATP-a, ADP. Na temelju ovoga bi se, barem teorijski, onemogućio RET rušenjem gradijenta H⁺ (koji osigurava golemu protomotornu silu) ili uvođenjem ADP-a (28). „Razbijanje“ gradijenta protona postiže se „rasprezačima“ poput 2,4-dinitrofenola (DNP) ili FCCP-a (15). „Rasprezači“ oksidativne fosforilacije prekidaju povezanost ETC i fosforilacije (ADP-a) što inhibira sintezu ATP-a bez da pritom djeluju na sami respiratorni lanac i ATP sintetazu. Nemogućnost sinteze ATP-a pritom leži u činjenici da se energija redoks reakcija ne može iskoristiti za fosforilaciju onda kada je „razbijen“ gradijent protona (odnosno uništena protomotorna sila koju su redoks reakcije generirale) (28).

Ostala potencijalna terapijska rješenja djeluju nizvodno od samog generiranja ROS-a. Njima pripadaju antioksidansi koji minimaliziraju oksidativno oštećenje. Jedan od njih, vrlo dobro istražen je koenzim q. Kako njegova primjena nije pokazala korist u smanjenju IR ozljede, razvijen je mitoQ – spoj čija je komponenta koenzim q, ali veće bio dostupnosti. MitoQ čini ubikvinon vezan na lipofilni trifenil-fosfonij (engl. lipophilic triphenylphosphonium, TPP). S obzirom da je TPP pozitivno nabijen lipofilni kation, MitoQ se pojačano akumulira u mitohondrijima privučen negativnim nabojem njihove unutarnje membrane. Uspjesi zasad postoje na životinjskim modelima, ali učinak još nije ispitan u kliničkoj praksi. Još jedan primjer TPP konjugiranog antioksidansa je Mito-TEMPO, koji djeluje kao hvatač slobodnih radikala. Njegova je efikasnost zasada dokazana u smanjenju oštećenja mitohondrijske DNA tokom ligacije femoralne arterije.

Spojevi koji imitiraju djelovanje superoksid dismutaze poput MnTBAP, MnTMPyP, (koji ima djelovanje MnSOD i katalaze), MnTPyP hvataju superoksid i peroksinitrit. Koktel sačinjen od jednog od njih-MnTBAP, glutationa i katalaze pokazao se protektivnim protiv generiranja ROS-a u IR ozljedi.

Alternativni pristupi još bi mogli biti blokada otvaranja mPTP kanala (melatoninom) ili pak ublažavanje upalnog odgovora induciranog oštećenjem mitohondrija (29).

1.10 Metformin – mehanizam djelovanja

Metformin (dimetilbigvanid) je najčešće prepisivani hipoglikemijski lijek koji se koristi u terapiji dijabetesa tipa 2. Otkriće metformina ima dug povijesni tijek. Početak nalazimo u razdoblju srednjovjekovne Europe gdje se francuski jorgovan (lat. Galega officinalis), koji u svom sastavu ima gvanidin, koristio kao široko raširen biljni lijek (30). Kasnije se pokazalo kako gvanidin ima sposobnost snižavanja razine glukoze u krvi, no njegova se uporaba obustavila zbog toksičnosti kod ljudi. S vremenom su se sintetizirali brojni derivati gvanidina. Prvi u nizu bio je galegin (lat. Isoamylene guanidine) koji se kratko primjenjivao 1920-tih. U to doba sintetizirala su se i dva sintetska digvanida, čija uporaba također nije opstala u duljoj primjeni (31). Sinteza prvih bigvanida započela je tridesetih godina dvadesetog stoljeća (30). Kako metformin nije bio toliko potentan kao ostali bigvanidi (fenformin i buformin) na njega se sve do 1970-tih nije obraćalo previše pažnje. Tada su dva navedena bigvanida isključena iz uporabe zbog visokog rizika razvoja nuspojave laktične acidoze (31).

Zbog straha od sličnosti s njima metformin je još neko vrijeme ostao u sjeni, sve dok 1995. nije dopušteno njegovo korištenje u Americi. Ono je bilo potaknuto sposobnošću metformina da smanji inzulinsku rezistenciju i hiperglikemiju bez istovremenog utjecaja na rast tjelesne mase i rizika razvoja hipoglikemije. Par godina nakon, 1998. , započela je i njegova primjena u Europi inicirana Prospektnom studijom dijabetesa u Ujedinjenom Kraljevstvu, gdje su istaknuti njegovi dugoročni pozitivni kardiovaskularni učinci. I tako je metformin gotovo 60 godina nakon svog otkrića došao na mjesto najkorištenijeg hipoglikemijskog lijeka širom svijeta (30).

Zbog ovakvoga podrijetla, za razliku od većine modernih lijekova, on nije dizajniran kako bi djelovao na određeni metabolički put ili patofiziologiju bolesti. S obzirom na to da se pokazao sigurnom i efikasnom terapijom prije nego su detaljne studije mehanizma njegovog djelovanja bile provedene, još uvijek ne znamo u potpunosti na koje sve načine metformin ostvaruje svoje učinke (32).

Biodostupnost metformina je između 40% i 60% i gastrointestinalna apsorpcija je potpuna unutar 6 sati od oralnog unosa. Metformin se nakon apsorpcije brzo distribuira po organizmu. Iz njega se izlučuje nepromijenjen putem bubrega, s poluvijekom eliminacije između 4 i 8.7 sati. Upravo to razlikuje farmakokinetiku metformina u odnosu na ostale bigvanide koji se metaboliziraju putem jetre. Podatci o ovisnosti između koncentracije lijeka u plazmi i ostvarenih metaboličkih učinaka su zasad oskudni. Terapijske doze se kreću između 0.5 do 1 mg/l prilikom gladovanja i 1 do 2 mg/l nakon jela (33).

Metformin djeluje na sljedeća ciljna mjesta u organizmu da bi ostvario svoje učinke:

1. Jetru, na čijoj razini smanjuje proizvodnju glukoze u procesu glukoneogeneze;
2. Periferna tkiva, gdje dovodi do povećanog preuzimanja glukoze iz krvi što povećava osjetljivost na inzulin;
3. Crijeva, gdje smanjuje preuzimanje glukoze od strane enterocita te promovira sintezu peptida nalik na glukagon, endogenog spoja koji ima anti dijabetičku aktivnost (34);
4. Hipofizu, gdje inhibira bazalnu sekreciju određenih hormona: hormona rasta, adrenokortikotropnog hormona, FSH. Time očituje svoje djelovanje na povećavanje inzulinske osjetljivosti kroz tkiva na koja ti isti hormoni ostvaruju svoje učinke-jetru, skeletne mišiće, endotel, masno tkivo, jajnike (35).

Kako je metformin pozitivno nabijena molekula smješta se duž stanične membrane i unutarne mitohondrijske membrane privučen njihovim negativnim nabojem. U mitohondrijima metformin blokira kompleks I transportnog lanca elektrona time onemogućujući proizvodnju ATP-a. Zbog čega raste omjer ADP/ATP i AMP/ATP u stanici. To aktivira AMP-kinazu (AMPK) (34).

AMPK ima ulogu u :

1. Odgovoru na inzulin;
2. Metabolizmu masti i glukoze;
3. Balansu energije u organizmu.

Aktivacija AMPK inhibira ekspresiju gena glukoneogeneze- glukoza 6 fosfataze i fosfoenolpiruvat karboksikinaze. Osim tog AMPK fosforilira karboksilazu acetyl-CoA dovodeći na taj način do inhibicije sinteze masti i posljedičnog povećanja njihove oksidacije te smanjenja njihovih zaliha u jetri. Aktivirana AMPK također omogućuje povećano preuzimanje glukoze neovisno o inzulinu. To postiže povećanom ugradnjom glukoznog transportera tipa 4 (GLUT4) u staničnu membranu (preko fosforilacije i time aktivacije pojačivača GLUT4 transportera).

Rast omjera AMP/ATP inhibira fruktozu-1,6-bifosfatazu, enzim koji je komponenta procesa glukoneogeneze. Prema tome, AMP neovisno o AMPK suprimirajući glukoneogenezu i glikogenolizu djeluje na snižavanje glukoze u krvi. AMP pak sam po sebi blokira adenilat ciklazu, što dalje snižava razinu cikličkog AMP-a (cAMP), važne glasničke molekule koja se pojačano stvara u odgovoru na glukagon. Time se blokira odgovor stanice na glukagon koji povisuje glikemiju u stanju gladovanja (34).

1.11 Opcije korištenja metformina u liječenju drugih patoloških stanja (osim dijabetesa tipa 2)

Metformin je već dugi niz godina prvi izbor u liječenju dijabetesa tipa 2. Nerazjašnjeni mehanizmi putem kojih ostvaruje hipoglikemijski učinak potaknuli su opsežna istraživanja metformina. Saznanja do kojih se tokom njih došlo otvorila su vrata korištenju ovog lijeka u širokoj paleti različitih patologija. Metformin se danas koristi u liječenju:

1. Sindroma policističnih jajnika, zbog djelovanja na povećanje inzulinske osjetljivosti;
2. Dijabetesa tipa 1, gdje omogućuje smanjenje doze inzulina;

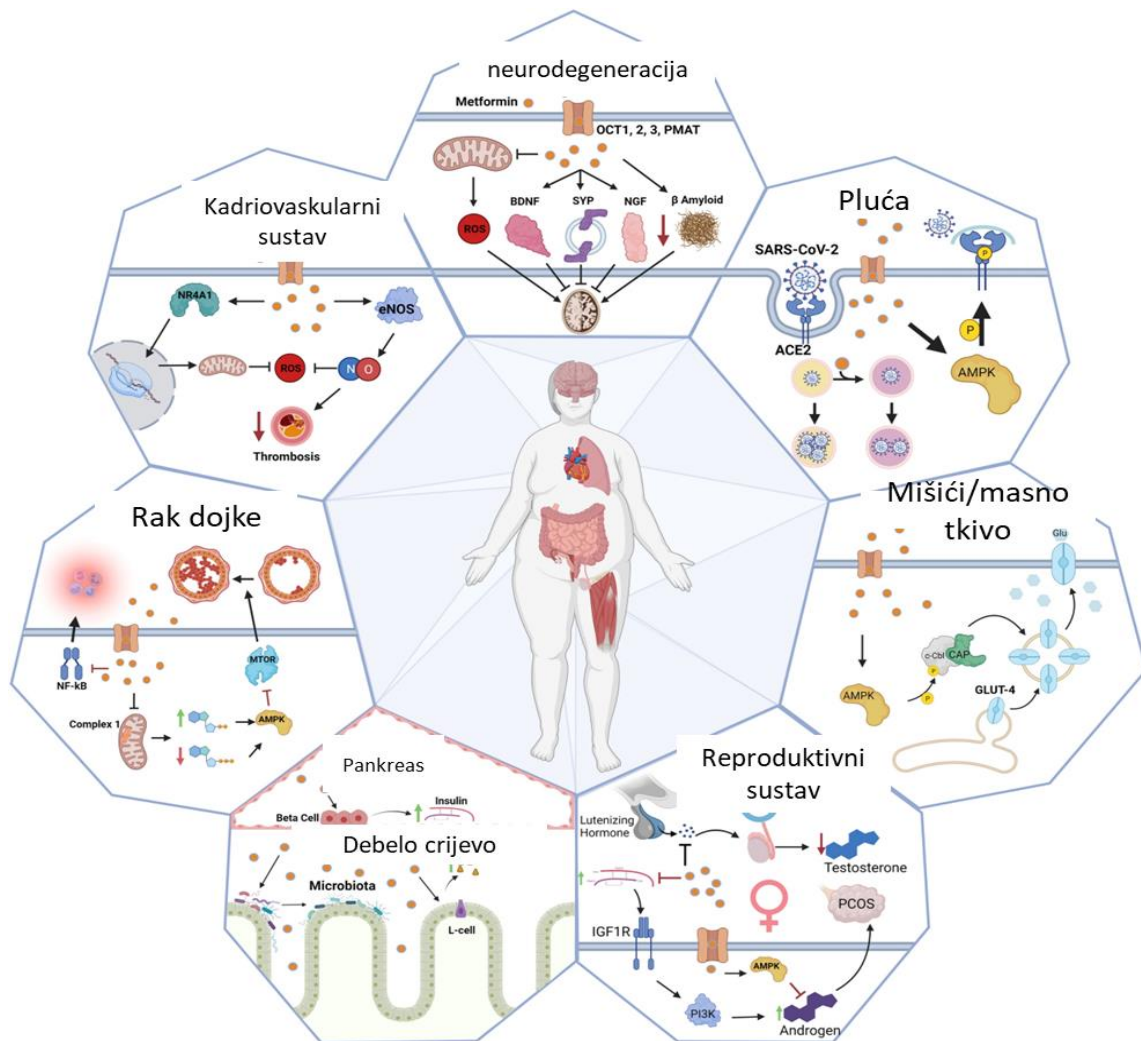
3. Tumorskih bolesti, u kojima se pokazao kao lijek koji inhibira preživljavanje, rast i metastaziranje različitih vrsta tumorskih stanica. Dokazan je njegov učinak u terapiji karcinoma dojke, jetre, kosti, gušterače, endometrija, bubrega, pluća te debelog crijeva.

Protu-tumorske karakteristike metformina posljedica su direktnog i indirektnog utjecaja na stanični metabolizam. Direktni utjecaj je putem aktivacije AMPK, što vodi u inhibiciju mTOR puta (s posljedičnim poremećajem sinteze proteina, supresijom staničnog rasta i proliferacije). Preko AMPK inducira i fosforilaciju p53, najvažnijeg tumorskog supresora u ljudskom organizmu. Time prevenira invaziju i metastaziranje tumorskih stanica. Dodatno (već prethodno opisanim) mehanizmom supresije kompleksa I smanjuje proizvodnju ROS-a time smanjujući oštećenje DNA, što suprimira razvoj tumora. Indirektno protutumorsko djelovanje ostvaruje utjecajem na angiogenezu, fibroblaste i makrofage, dakle mijenjanjem mikrookoliša samog tumora. Također indirektno djeluje i imuosupresijski, aktivirajući imunološki odgovor protiv neoplastičnih stanica.;

4. Jetrenih bolesti i bubrežnih bolesti te pretilosti, gdje također utječe na stanični metabolizam inhibicijom kompleksa I i aktivacijom AMPK.;
5. Kardiovaskularnih bolesti, u kojima svoje djelovanje ostvaruje preko mehanizma aktivacije AMPK koja dovodi do inhibicije modifikacije apolipoproteinskih ostataka LDL-a i HDL-a čime se inhibira poremećaj njihove funkcije, što posljedično poboljšava transport kolesterola (36). Osim toga, metformin stimulira proizvodnju NO koji smanjuje upalu stijenke krvne žila (u procesu ateroskleroze) i ozljedu miokarda nakon ishemije (37). Djeluje i na makrofage (u procesu ateroskleroze), reducirajući diferencijaciju monocita i inhibirajući upalu, oksidativni stres i formaciju pjenušavih stanica. Samim učinkom na makrofage može se opsežno povećati njegov terapijski potencijal u stanjima poput pretilosti, ateroskleroze, demencije i starenja, a teško je zamisliti koliki on doista može biti ako se uzmu u obzir svi spomenuti i još brojni drugi mehanizmi njegova djelovanja (38).

Metformin bi mogao imati zaštitni učinak protiv razvoja neurodegenerativnih bolesti, zbog učinaka na supresiju pro-upalnih puteva, zaštitu mitohondrija i krvožilne funkcije te izravnog djelovanja na neuronske matične stanice (Slika 16.)(39). Već puno puta spomenuti učinci metformina na inhibiciju kompleksa I i time smanjenje produkcije ROS-a (posljedično manjeg oštećenja DNA), supresiju upale i autofagije isti su kojima bi se mogao usporiti proces starenja, pa se u novije vrijeme provode brojna istraživanja i na tu temu (40).

Iz svega navedenog možemo zaključiti kako je potencijalni spektar primjene metformina širi od njegovih trenutnih indikacija, te kako opseg njegovog terapijskog i preventivnog djelovanja vjerojatno nadilazi trenutnu primjenu. Korištenje metformina s ciljem prevencije ishemijsko- reperfuzijske ozljede tijekom revaskularizacije miokarda, što je bio jedan od ciljeva ovog istraživanja, bi moglo bi biti upravo jedno od njih.



Slika 10. Sumacijski prikaz mjesta djelovanja metformina u liječenju široke palete bolesti.

(preuzeto i prilagođeno prema: Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? -

ScienceDirect [Internet]. [citirano 10. srpanj 2023.]. Dostupno na:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049522001019?via%3Dihub#s0180>

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1 Cilj istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja je bio prikazati kretanje razine slobodnih kisikovih radikala u fazi reperfuzije miokarda koji je prethodno bio izložen ishemiji te ustanoviti kakvo je ono u odnosu na stupanj razvijenosti kolateralnih krvnih žila te u odnosu na dodatak metformina. U dosadašnjim istraživanjima je potvrđeno da je za nastanak ishemijsko-reperfuzijske ozljede miokarda glavni krivac ROS, koji pritom nastaje mehanizmom reverznog transporta elektrona. Svrha ovog istraživanja je prikazati kako na razine ROS-a generiranog mehanizmom RET-a utječe razvijenost koronarne kolateralne cirkulacije te osim toga i primjena metformina.

2.2 Hipoteze istraživanja

1. Postupak kirurške revaskularizacije ishemičnog miokarda dovodi do povećanog stvaranja ROS-a u ranoj fazi reperfuzije, i to primarno kod pacijenata bez razvijene kolateralne cirkulacije
2. Porast razine ROS-a za vrijeme simulirane reperfuzije se može ublažiti primjenom metformin

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Mjerenje reaktivnih kisikovih vrsta (superoksidnog aniona) u tkivu miokarda

3.1.1 Pacijenti

U istraživanje kojim su prikupljeni podaci za ovu radnju je uključeno 11 pacijenata koji nisu imali znakove akutne srčane dekompenzacije i kojima je ejectiveska frakcija bila veća od 35%, a koji su zbog NSTEMI liječeni CABG-om. Svi su imali subtotalnu stenozu (99%) prednje lijeve silazne koronarne arterije što je potvrđeno koronarnom angiografijom, zbog čega nisu bili prikladni pacijenti za revaskularizaciju putem PCI. Istraživanje je registrirano na stranici *www.clinicaltrials.gov* i odobreno od strane Etičkih povjerenstava Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i KBC-a Split. Pacijenti su potpisali pisani pristanak prije uključivanja u istraživanje.

Razvoj koronarnih kolateralnih krvnih žila se procijenio korištenjem koronarne angiografije, a ocijenio Rentropovim sustavom (Tablica 1.). Pacijenti su primili standardnu njegu za NSTEMI, nakon čega je uslijedio operativni zahvat postavljanja srčane premosnice bez upotrebe stroja za iznaničnu oksigenaciju krvi (tzv. „*off pump*“ CABG), tokom kojega je metodom subepikardijalne iglene biopsije uzet malen uzorak miokarda u dva navrata - prije postavljanja premosnice (dakle u fazi ishemije) i 5 minuta nakon ugradnje premosnice (u fazi reperfuzije). U podgrupi od 5 pacijenata je u fazi ishemije (prije postavljanja premosnice) uzet dodatni uzorak tkiva za potrebe analize proizvodnje ROS-a *in vitro* (41).

Rentrop klasifikacija je način na koji se procjenjuje stupanj razvijenosti kolateralne cirkulacije. U priloženoj tablici može se vidjeti način na koji se ona gradira ovisno o nalazu koronarne arteriografije (42).

Rentrop klasifikacija

- | | |
|---|--|
| 0 | Nema punjenja kolateralnih krvnih žila |
| 1 | Punjenje kolateralnih krvnih žila bez epikardijalnog punjenja ciljane arterije |
| 2 | Parcijalno epikardijalno punjenje kolateralama ciljane arterije |
| 3 | Potpuno epikardijalno punjenje kolateralama ciljane arterije |

Tablica 1. Rentrop klasifikacija stupnja razvijenosti kolateralnih krvnih žila.

3.1.2 Priprema uzoraka za elektronsku paramagnetnu rezonancu (EPR)

Neposredno nakon uzimanja, uzorci su uronjeni u tekući dušik, što je omogućilo kvantifikaciju ROS-a koja je bila prisutna in situ u tom trenutku. Prvo su pohranjeni na -80°C , a potom transportirani na suhom ledu do Zavoda za fizikalnu kemiju na Institutu Ruđer Bošković, gdje su napravljena mjerenja metodom elektronske paramagnetne rezonance (EPR). Način na koji ova metoda mjeri ROS je da se u uzorak prvo doda indikator osjetljiv na njih - u našem slučaju to je CMH indikator (1-hidroksi-3-metoksikarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirolidin). Taj se indikator mijenja u reakciji s ROS-om, a nastalu promjenu bilježi EPR uređaj. CMH detektira sljedeće radikale: superoksidni ion, peroksidni radikal, peroksinitrit i dušični dioksid, ali nije u mogućnosti detektirati dušični oksid niti vodikov peroksid. Generalno je korištenjem ovoga indikatora glavna posredno mjerena molekula superoksid, najvažniji radikal odgovoran za reperfuzijsku ozljedu.

Uzorci biopsije su pomiješani s otopinom (Krebsov HEPES pufer) u kojoj se nalazi CMH indikator. Da bi se smrznuti uzorci inkubirali zajedno s indikatorom, prvo su narezani na sitne uzorke u Krebsovom HEPES puferu i potom stavljani u mikro centrifugu zajedno s dodatnih 10 nM CMH. Potom su izloženi vodenoj kupelji uz lagano treskanje. Nakon sat vremena, 1 ml tako nastale otopine je uzet injekcijom i zaleđen u tekućem dušiku. Pri tome je došlo do reakcije indikatora sa slobodnim kisikovim vrstama pri čemu se formirao paramagnetski CM: (3-methoxycarbonyl-proxyl nitroxide), kojeg mjerimo EPR-om (43).

3.1.3 Koncept elektronske paramagnetne rezonance

Koncept EPR analogan je nuklearnoj magnetnoj rezonanci, s tom razlikom da su spinovi koju se eksitiraju u ovom slučaju oni elektrona, a ne atomske jezgre. U toj metodi detektiraju se tranzicije između energetske stanja nesparenih elektrona u primijenjenom magnetnom polju. Svaki elektron ima svoj spin što mu daje magnetni moment. Zbog tog magnetnog momenta on ima sposobnost ponašati se poput malenog magneta. U prisustvu vanjskog magnetnog polja, magnetni moment elektrona poredat će se ili paralelno ili anti paralelno u odnosu na vanjsko polje, pri čemu svaki od ta dva položaja ima specifičnu energiju. Razlika između te dvije energije ovisi o jačini vanjskog magnetnog polja. Pri primjeni dodatnog (elektro)magnetnog polja koje oscilira u dovoljno visokoj frekvenciji (čija energija odgovara energiji prvog primijenjenog magnetnog polja), elektroni mogu mijenjati smjer svog spina. Kako je njih više bilo u spinu nižeg energetske stanja (a sada prelaze u spin višeg energetske stanja) dolazi do neto apsorpcije energije koja se pritom bilježi i pretvara u spektar.

Magnetni moment elektrona puno je veći u odnosu na onaj jezgre pri izlaganju identičnim jačinama vanjskog magnetnog polja. Razlog za to se krije u značajno većoj masi jezgre u odnosu na elektron, pa je potrebna puno veća elektromagnetna frekvencija da bi postigla rezonanciju sa spinom elektrona (44).

S obzirom da je podrijetlo signala EPR nespareni elektron, zaključujemo da bi se njome mogli lako detektirati slobodni kisikovi radikali. Ali, kako su oni iznimno reaktivni i kratkog životnog vijeka, u uzorak je potrebno dodati nešto s čime će oni reagirati i formirati stabilni produkt. Pri tome je naravno nužno da i taj produkt ima nespareni elektron. U ovom slučaju za tu je svrhu korišten CMH indikator. On u prisutnosti ROS-a biva oksidiran pri čemu nastaje dušični radikal kojeg detektira EPR (45).

Preciznost kvantitativnog EPR-a postiže se brižnim kontroliranjem uzorka, njegova položaja, volumena i veličine te korištenjem epruvete s homogenom debljinom stijenke. Ovim pristupom osiguravano je da se udio radikala koji oksidiraju CMH u smrznutim uzorcima egzaktno mjeri (43).

3.2 Mjerenje proizvodnje superoksida u uvjetima simulirane reperfuzije *in vitro*.

Stvaranje superoksidnih radikala u mitohondrijskom respiracijskom lancu je mjereno u idućem istraživanju na uzorcima ljudskog miokarda (lijevog ventrikula) dobivenim za vrijeme kardiokirurške operacije postavljanja aorto-koronarnog premoštenja, kao što je ranije opisano. Uzorci dobiveni biopsijom iz manje skupine pacijenata (n=5) su odmah uronjeni u kardioplegičnu otopinu (sastava: 2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 6.56 mM MgCl₂, 5.7 mM Na₂ATP, 15 mM fosfokreatina, 20 mM imidazola, 20 mM taurina, 0.5 mM DTT-a i 50 mM K-metanosulfonata, pH 7.1 na 0°C), te unutar 15 minuta dopremljeni u Laboratorij za staničnu fiziologiju na Medicinskom fakultetu u Splitu, gdje je potom uslijedilo mjerenje mitohondrijskih funkcija, uključujući stvaranje superoksida.

Uzorci miokarda su prvo pregledani pod povećalom te su odstranjeni eventualno prisutni dijelovi masti ili veziva. Slijedilo je vaganje uzoraka (prosječna masa 4-6 mg), a potom priprema uzoraka za eksperiment, uz pomoć uređaja za homogenizaciju tkiva. Homogenat je pripremljen u posebno prilagođenoj otopini čiji je sastav optimiziran za mjerenje mitohondrijske respiracije i proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva u *in vitro* uvjetima u metaboličkoj komori (sastav otopine: 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 60 mM laktobioničke

kiseline, 20 mM taurina, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM saharoze i 1g/l BSA). Ovakvu otopinu nazivamo respiracijskom otopinom.

Pripremljen homogenat lijevog ventrikula u respiracijskoj otopini prebačen je u eksperimentalnu komoricu, te je uz miješanje stavljen na temperaturu od 30°C, uz dodatak metaboličkih supstrata. Također, u homogenat su dodane komponente Amplex Red detekcijskog sustava, kojima je omogućena procjena stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva.

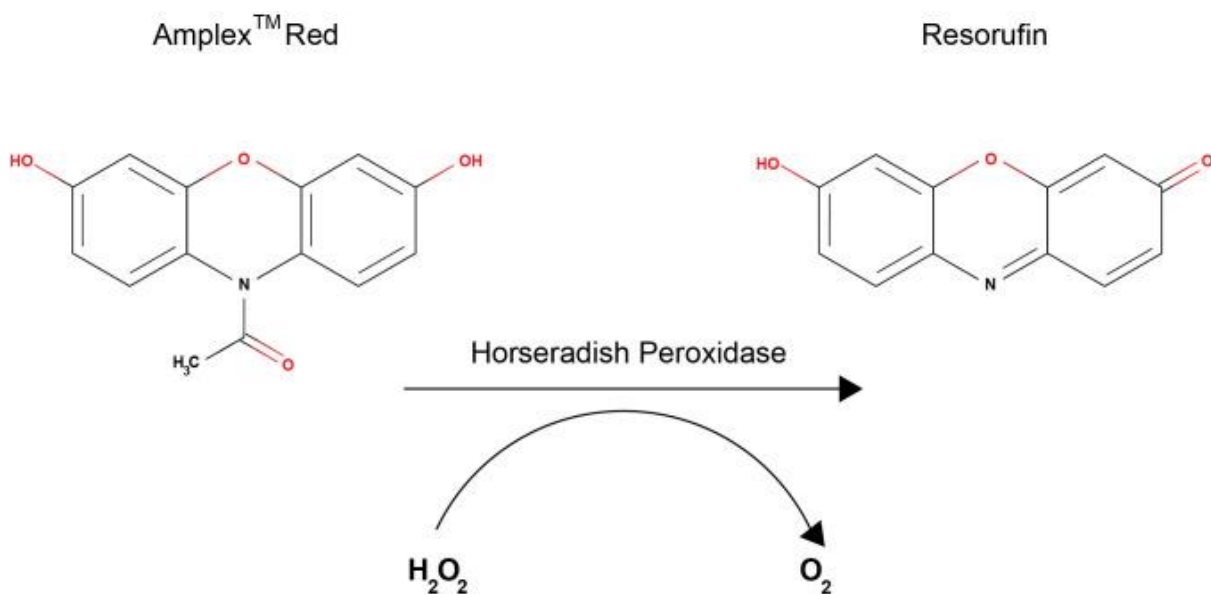
Metabolička komora (proizvođač Oroboros, Innsbruck, Austrija) je uređaj koji omogućuje, u kontroliranim temperaturnim uvjetima, procjenu raznih parametara mitohondrijske funkcije, ovisno o korištenim sensorima koji su uronjeni u eksperimentalnu komoricu (Slika 11.). U ovom ispitivanju smo koristili fluorescentne senzore, kojima se procjenjuje emisija fluorescentnog spoja. Kako bismo na ovaj način detektirali razinu stvorenog ROS-a, dodajemo indikator (Amplex Red) koji je osjetljiv na reaktivne vrste kisika, odnosno vodikov peroksid. Nakon vezanja vodikovog peroksida i indikatora formira se produkt, rezorufin. Upravo rezorufin ima fluorescencijsku sposobnost, koju detektiramo u sustavu i iz koje dalje računamo razinu proizvedenog peroksida.



Slika 11. Oroboros uređaj. (izvor: 1. O2k-FluoRespirometer - Bioblast [Internet]. [citirano 13. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://wiki.oroboros.at/index.php/O2k-FluoRespirometer>)

3.2.1 Metoda Amplex Red sustava

Amplex Red je reagens za detekciju vodikova peroksida ili aktivnosti peroksidaze. U prisutnosti peroksidaze podrijetla hrena (engl. horseradish peroxidase, HRP), Amplex Red reagira s vodikovim peroksidom u omjeru 1:1 da bi nastao rezorufin. Ono što je u pozadini te reakcije je da vodikov peroksid preuzima elektron indikatoru (Amplex Red) da bi prešao u vodu, pri čemu sami indikator prelazi u rezorufin (46) (Slika 12.). Kako rezorufin možemo detektirati zahvaljujući njegovoj sposobnosti fluorescencije, preko njega posrednim putem izračunavamo udio ROS-a u tkivu. Rezorufin se ekscitira sa svjetlošću valne duljine 525 nm da bi emitirao onu od 585 nm. Emitiranu svjetlost bilježi fluorescentni detektor i ona je glavna varijabla koju koristimo (47). Proporcionalno, što je više peroksida u tkivu, to je više rezorufina. A što je više rezorufina to je više emitirane svjetlosti, koju hvata detektor. S obzirom da je za reperfuzijsku ozljedu glavni krivac superoksid, a njega ovom metodom ne mjerimo izravno, u sustav se dodaje i superoksid dismutaza. Na taj je način osigurano da se sav superoksid u kardiomiocitima preveo u peroksid, kojeg detektiramo na prethodno objašnjen način.



Slika 12. Interakcija Amplex Red indikatora s vodikovim peroksidom. (izvor: Karakuzu O, Cruz MR, Liu Y, Garsin DA. Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans*. *Bio Protoc.* 2019;9:e3409.)

Homogenatu miokarda dodano je 2.5 μ M Amplex Red indikatora, 1 U/ml enzima HRP i 5 U/ml enzima superoksid dismutaze. Dinamika proizvodnje rezorufina je procijenjena mjerenjem emisije na 585 nm (nakon ekscitacije s 525 nm), uz pomoć fluorescentnog senzora (Orboros instruments).

Kvantifikacija ROS-a proizvedenog u mitohondrijskom lancu je omogućena prethodnom kalibracijom signala rezorufina uz pomoć egzogeno dodanog H₂O₂ (0.1 μM).

3.2.2 Okolnosti mjerenja ROS-a putem Oroboros instrumenta.

Mitohondrijski ROS na ovaj se način mjerio u 3 različita scenarija.

Prvo je mjeren za vrijeme oksidativne fosforilacije; u prisutnosti metaboličkih supstrata: piruvata (5 mM), malata (0.5 mM), glutamata (5 mM), sukcinata (10 mM), ADP-a (2.5 mM) i kisika.

Nakon toga, tkivo i mitohondriji su *in vitro* izloženi uvjetima koji oponašaju poslije-ishemijsku reperfuziju. To su uvjeti u kojima dominira visoka koncentracija sukcinata (supstrat kompleksa II respiracijskog lanca) i visok elektrokemijski gradijent za H⁺ na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani, uz dostupnost kisika. Oni uzrokuju retrogradni tok elektrona u respiracijskom lancu, odnosno od reduciranog koenzima Q (QH₂, ubikvinol) prema kompleksu I, što pogoduje stvaranju većih količina superoksidnog aniona.

U trećem je scenariju proizvodnja ROS-a mjerena za vrijeme simulirane reperfuzije u prisutnosti metformina (1 mM), koji je dodan direktno u eksperimentalnu komoricu.

3.3 Statistička obrada

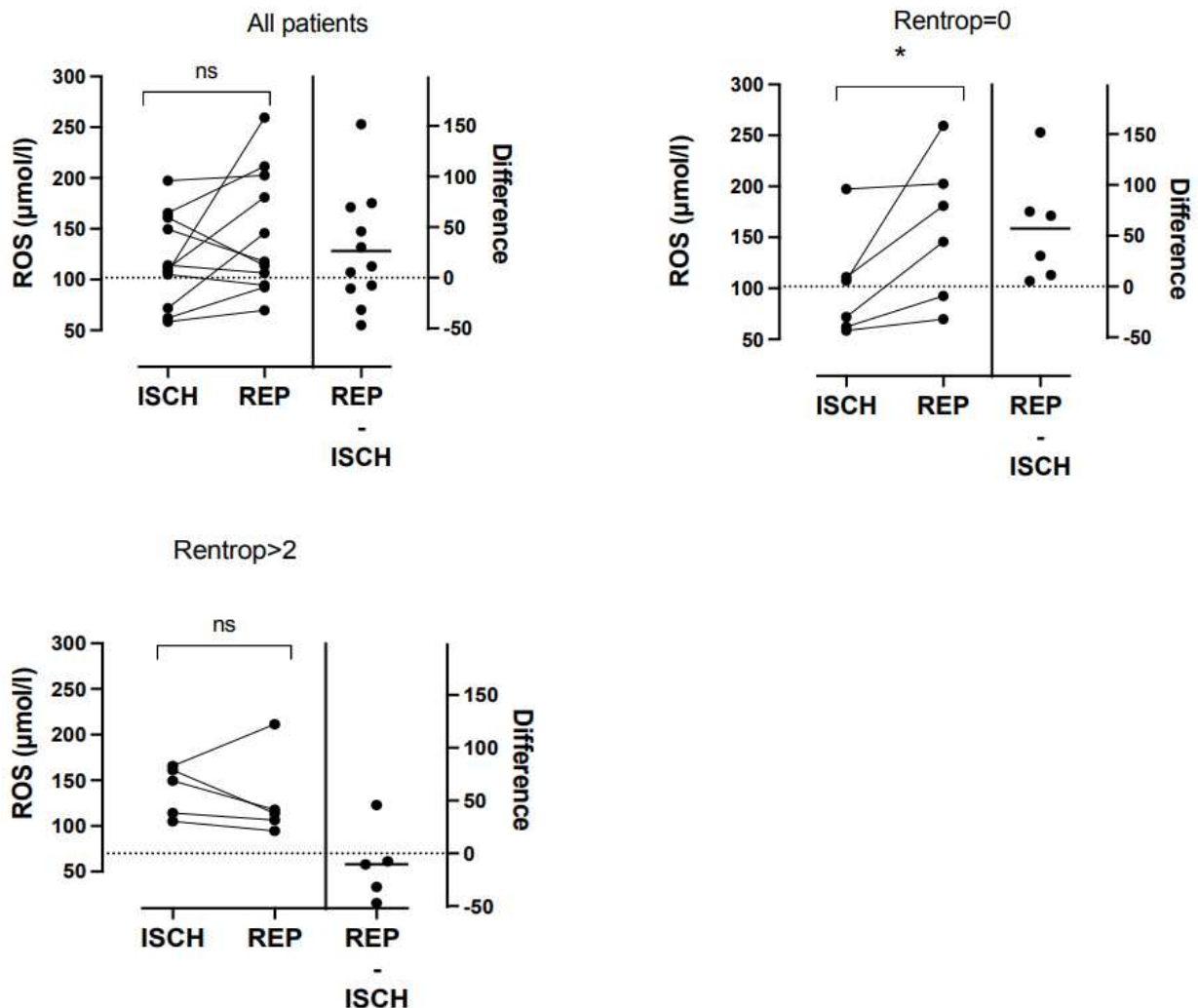
Usporedba razine stvorenih reaktivnih kisikovih spojeva između razdoblja ishemije i reperfuzije u uzorcima miokarda je napravljena korištenjem Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova. Usporedba dinamike stvaranja H₂O₂ u uzorcima miokarda izloženim uvjetima normoksije i simulirane reperfuzije (s i bez prisutnosti metformina) u metaboličkoj komori napravljena je korištenjem Friedmanovog testa uz Dunnovu post-hoc analizu.

Statistička analiza napravljena je korištenjem programa GraphPad Prism 9. Svi podaci su izraženi kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Za svaki statistički test, P < 0.05 je smatran značajnom razlikom.

4 REZULTATI

4.1 Stvaranje ROS u ranoj fazi reperfuzije nakon postavljanja aorto-koronarne prenosnice

Pacijenti uključeni u istraživanje u kojem se razina ROS-a mjerila putem EPR- a su dominantno imali očuvanu srčanu sistoličku funkciju i kliničke karakteristike tipične za NSTEMI : stariju životnu dob (64 ± 8 godina), višezilnu bolest (82%) , komorbiditete: dislipidemiju (64%), hipertenziju (64%) i dijabetes (27%). Kada su svi pacijenti uključeni u statističku analizu nije pronađena statistički značajna razlika u porastu stvaranja ROS-a. (Slika 13.) No, pri analizi samo one skupine pacijenata koji nemaju razvijene kolateralne krvne žile (Rentrop ocjena = 0) ustanovljeno je da je reperfuzija dovela do 56% porasta razine ROS-a (Slika 13.). S druge strane, kod pacijenata koji imaju razvijene kolateralne krvne žile (Rentrop ocjena ≥ 2) nisu utvrđene promjene razine ROS-a (Slika 13.).



Slika 13. Prikaz razine ROS-a u miokardu u tokom izvođenja CABG-a mjeren metodom EPR-a. Razine ROS-a su mjerene prije (faza ishemije, ISCH) i 5 minuta nakon postavljanja prenosnice (faza reperfuzije, REP) u svih pacijenata (gore lijevo, n=11), kod pacijenata bez kolateralnih krvnih žila (gore desno, Rentrop = 0; n = 6); i u pacijenata s razvijenim kolateralnim krvnim žilama (dolje lijevo, Rentrop \geq 2, n = 5). Desni stupci prikazuju razliku u razini ROS između reperfuzije i ishemije (REP – ISCH). Razine ROS-a su proporcionalne razini paramagnetskog CM• čije su koncentracije izražene u $\mu\text{mol/l}$ po 1 mg tkiva.

4.2 Stvaranje ROS za vrijeme oksidativne fosforilacije i u uvjetima simulirane reperfuzije

Procjena stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta, primarno superoksida, je također napravljena *in vitro*. U tu svrhu, tkivo lijevog ventrikularnog miokarda (dobivenog biopsijom za vrijeme kardiokirurške operacije) je uronjeno u otopinu u eksperimentalnu metaboličku komoricu, te je u kontroliranim uvjetima mjereno stvaranje ROS-a uz pomoć posebnog fluorescentnog indikatora Amplex Red.

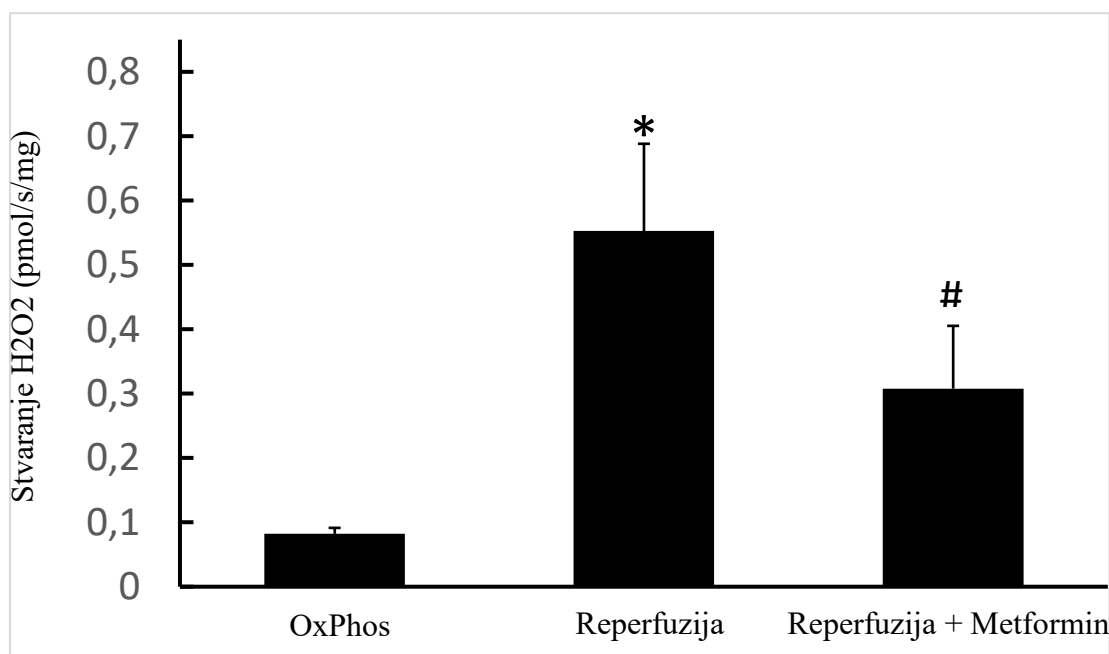
Nakon stavljanja uzorka miokarda u komoricu, sustav je stabiliziran na 30°C te je tkivo izloženo metaboličkim supstratima na način kojim se *in vitro* potaknuo proces oksidativne fosforilacije ili su se oponašali uvjeti kojima je miokard (i njegovi mitohondriji) izložen za vrijeme reperfuzije nakon prethodnog perioda ishemije.

Oksidativna fosforilacija se normalno odvija u prisutnosti elektronskih donora NADH i FADH₂, koji uglavnom nastaju u ciklusu limunske kiseline iz metaboličkih supstrata, poput piruvata, malata, glutamata i sukcinata. Uz reducirane spojeve, za proces oksidativne fosforilacije je neophodan ADP (uz slobodni fostat), kao i dostupnost kisika. Za vrijeme tog procesa, tijek elektrona koji potječu od reduciranih spojeva se odvija respiracijskim lancem posredstvom enzimatskih kompleksa, uz molekularni kisik kao završni elektronski primalac iz kojega nastaju molekule vode. Ipak, manja količina elektrona prijevremeno napusti respiracijski lanac, pritom često uzrokujući nepotpunu redukciju molekule kisika i nastanak reaktivnih kisikovih spojeva.

U našim eksperimentima, stvaranje ROS-a za vrijeme oksidativne fosforilacije je mjereno *in vitro* u uzorcima miokarda pacijenata.

Pri tom su kardiomiocitima bili dostupni metabolički supstrati: piruvat, malat, glutamat, sukcinat; zatim komponente potrebne za stvaranje visokoenergetskih fosfatnih spojeva (ADP i HPO_4^{2-}) te dovoljne količine molekularnog kisika. Superoksidni anion koji se pritom stvara se konvertira u vodikov peroksid (H_2O_2) djelovanjem endogenog i egzogeno dodanog enzima superoksid dismutaze, a H_2O_2 se može kvantificirati uz pomoć fluorescentnog indikatora Amplex Red (kao što je opisano u Materijalima i metodama). Kao što je vidljivo na Slici 15. za vrijeme oksidativne fosforilacije, dinamika stvaranja ROS je relativno niska ($0,082 \pm 0,009$ pmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{s}/\text{mg}$ tkiva).

Nakon oksidativne fosforilacije, tkivo miokarda je *in vitro* izloženo metaboličkim uvjetima simulirane reperfuzije, od kojih su glavni visokoreducirani ubikvinol i visok protonski gradijent preko unutarnje mitohondrijske membrane. U tim uvjetima, proizvodnja ROS-a je značajno povećana (na $0,553 \pm 0,135$ pmol $\text{O}_2/\text{s}/\text{mg}$ tkiva). U slučaju izlaganja tkiva istim uvjetima simulirane reperfuzije, ali u prisutnosti metformina, proizvodnja ROS je bila značajno niža ($0,308 \pm 0,098$ pmol $\text{O}_2/\text{s}/\text{mg}$) (Slika 14.).



Slika 14. Prikaz razine stvorenog ROS-a za vrijeme oksidativne fosforilacije, simulirane reperfuzije te simulirane reperfuzije uz dodatak metformina. Iz tablice je vidljivo znatno povišenje razine ROS-a u uvjetima simulirane reperfuzije, koje se smanjuje dodatkom metformina u metaboličku komoru. * $P < 0,05$ u odnosu na oksidativnu fosforilaciju, # $P < 0,05$ u odnosu na oksidativnu fosforilaciju i Reperfuziju.

Kao što je već opisano u Uvodu, rane terapijske intervencije tehnikama reperfuzije značajno poboljšavaju ishode pacijenata s akutnim koronarnim sindromom. No, usprkos tome što se obustavljanjem ishemije „spašava“ zahvaćeni miokard od nekroze koja bi nastupila ukoliko se ne bi interveniralo reperfuzijskim metodama, tokom same reperfuzije nastaje dodatno oštećenje miokarda. Za reperfuzijsko se oštećenje smatra da doprinosi konačnoj veličini infarciranoga tkiva do čak 50% ukupne veličine. Njegovi su glavni inicijatori reaktivne kisikove vrste. Zbog toga strategije smanjenja reperfuzijske ozljede imaju upravo ROS u svom fokusu.

Iako se ovom problematikom bave mnogostruka istraživanja već dugi niz godina, i u njima su se dokazali uspjesi na životinjskim i staničnim uzorcima, njihova translacija u kliničku praksu predstavlja za sada nepremostiv izazov.

Ova studija je bila prva u kojoj se putem EPR mjerila promjena ROS-a u ljudskom miokardu tokom ishemije i reperfuzije. U njoj je zaključeno da porast ROS-a prilikom revaskularizacije metodom CABG-a u pacijenata sa NSTEMI postoji u onih pacijenata bez razvijenih koronarnih kolateralnih krvnih žila. No, u pacijenata s razvijenim kolateralnim krvnim žilama nema značajnog porasta u stvaranju ROS-a. Time je potvrđena važnost postojanja kolateralne cirkulacije za smanjenje nastale reperfuzijske ozljede zbog čega će najveću korist od intervencija kojima se smanjuje njen opseg imati upravo oni pacijenti koji nemaju razvijene kolateralne krvne žile.

Vrlo je vjerojatno da bi porast ROS-a bio još i veći uslijed revaskularizacije nakon STEMI. Naime, pacijenti sa STEMI su glavna ciljna skupina kod koje se kardioprotektivni učinak ostvaruje koronarnom revaskularizacijom. No, s obzirom da ovim pacijentima nije moguće doći do uzorka miokarda jer je metoda terapijskog izbora kod njih PCI, ovu teoriju nije moguće egzaktno dokazati.

Prilikom izvođenja pokusa na srcima štakora u kojima se također koristio EPR da bi se analizirao vremenski slijed kretanja razine ROS-a ustanovljeno je da se vrhunac proizvodnje doseže u prvim minutama reperfuzije. Moguće je stoga, da smo u ovom istraživanju detektirali tek kasnije niže razine ROS-a, odnosno puno niže od onih koje su prisutne u ranijim fazama (41).

Inhibicijsko djelovanje metformina na kompleks I dokazano je još 2000-tih godina. No, taj je učinak metformina zasada ostvariv samo korištenjem supra-farmakoloških (milimolarnih) koncentracija u laboratorijskim eksperimentima (48). Međutim, primijećeno je da se on može postići i pri manjim dozama na uzorcima intaktnih stanica (mikromolarne koncentracije), dok su na izoliranim mitohondrijima potrebne doze znatno veće.

Prisutne su dvije hipoteze o tome zašto su doze metformina potrebne za inhibiciju kompleksa I na razini stanice niže nego one potrebne za isti učinak na izoliranim mitohondrijima.

1. Prva hipoteza predlaže da metformin inhibira kompleks I indirektno aktivirajući još nepoznate signalne puteve *in vivo*;
2. Po drugoj se teoriji metformin akumulira u mitohondrijima privučen njihovim negativnim membranskim potencijalom gdje direktno vrši inhibiciju kompleksa I.

Dva istraživanja koja su pokušala dokazati akumulaciju metformina u mitohondrijima u tome nisu uspjela. Štoviše, pokazala se potpuna odsutnost lijeka u mitohondrijima, iako je kompleks I svejedno bio inhibiran. Prema tome, ili su u spomenutim istraživanjima napravljene tehničke pogreške ili je doista nemoguće eksperimentalno pokazati utjecaj metformina *in vivo* pri primjeni mikromolarnih koncentracija lijeka.

U istraživanju koje je prikazano u ovom radu također su se koristile supra-terapijske (milimolarne) doze metformina. Dakle, upitno je da li su dobiveni rezultati relevantni u kliničkoj praksi gdje se primjenjuju manje (mikromolarne) doze lijeka. S obzirom da se u ovom istraživanju radilo na uzorcima samih mitohondrija, koji su oslobođeni iz stanica procesom homogenizacije uzorka, vjerojatno je da bi potrebne doze za ostvarenje istog učinka na staničnim uzorcima bile manje. Jednako tako, manje doze metformina vjerojatno bi imale jednak učinak pri primjeni u kliničkoj praksi.

Izlaganjem izoliranih mitohondrija metforminu pokazano je kako se njegov utjecaj na produkciju ROS-a razlikuje ovisno o supstratu koji je dostupan kompleksu I. Pa tako prilikom oksidacije malata/piruvata (u konvencionalnom transportu elektrona) od strane kompleksa I rastu razine stvorenog ROS-a u prisutnosti metformina, a pri oksidaciji sukcinata one padaju. Kako je u IR ozljedi dostupan supstrat sukcinat, metformin se nameće kao terapijska opcija za ublažavanje IR ozljede, odnosno inhibiciju RET-a.

Ovdje se očituju njegove sličnosti s rotenonom, koji povećava proizvodnju ROS-a u konvencionalnom ETC-u, a smanjuje ju tokom RET-a (49).

Kompleks I je veliki protein sastavljen od 45 podjedinica. Ima hidrofobni dio koji je ugrađen u unutarnju mitohondrijsku membranu a uključen u prijenos H^+ , te hidrofilni dio koji je smješten u matriksu mitohondrija a čija je funkcija prijenos elektrona s NADH do ubikvina kroz niz redoks reakcija. Metformin djeluje kao ne kompetitivni inhibitor prijenosa elektrona na kompleksu I, ali samo onda kada se kompleks I nalazi u deaktiviranom stanju. Osim toga on je blagi pokretač deaktivne tranzicije kompleksa I, odnosno pri visokim koncentracijama lijeka povećana je stopa spontane deaktivacije kompleksa I (48).

Već je dugo poznato da deaktivna forma kompleksa I nije sposobna provoditi RET. Naime, redoks karakteristike ovog konformacijskog oblika su vrlo slične onima u kojima je aktivi oblik inhibiran rotenonom. Dakle, deaktivirano stanje kompleksa I je manje aktivno u generiranju ROS-a u odnosu na aktivno. Upravo je zato generiranje ROS-a u razdoblju ishemije zanemarivo. Prema tome mogli bismo zaključiti kako bi se prelaskom kompleksa I u deaktivno stanje stanice mogle zaštititi od ozljede posredovane ROS-om. To se doista i događa spontano u određenim stanjima, jedan od kojih je perinatalna hipoksično-ishemična ozljeda mozga. Proučavanjem životinjskog modela perinatalne hipoksično-ishemične ozljede mozga primijećeno je da se udio deaktivne forme kompleksa I značajno povećava u uzorku. Ova se tranzicija kompleksa I smatra intrinzičnim zaštitnim mehanizam putem kojega se nezreli mozak štiti od ozljede inicirane RET-om, odnosno uzrokovane ROS-om (50).

Dokazano je da povećana razina ROS-a doprinosi, barem u određenom dijelu, srčanom remodeliranju i razvoju CHD nakon IM. S obzirom da je obujam oštećenih kardiomiocita (veličina infarkta) glavni čimbenik koji u okolnom miokardu potiče proces srčanog remodeliranja, utjecajem na smanjenje IR ozljede u akutnoj fazi (a time konačne veličine nastalog ožiljka) postiže se terapijski cilj poboljšanja dugoročnog preživljenja nakon IM.

Kako je već prethodno objašnjeno, odsutnost kisika u razdoblju ishemije zaustavlja proces oksidativne fosforilacije (i ETC i fosforilaciju ADP-a). Protonski se gradijent ne može održati kada nema kisika i sinteze ATP-a, pa kompleks V počinje raditi u suprotnom smjeru od fiziološkog, odnosno hidrolizirati ATP da bi održalo mitohondrijski membranski potencijal. Nedostatak energije ATP-a u stanicama uzrokuje poremećaj ionskog transporta koji o njemu ovisi. Pritom dolazi do nakupljanja iona kalcija u citoplazmatskom matriksu i matriksu mitohondrija.

Uz nakupljanje kalcija, ostali uvjeti koji su tada prisutni u stanici: povišen NADH, nedostatak adeninskih nukleotida, gubitak mitohondrijskog membranskog potencijala i povećana proizvodnja ROS-a, favoriziraju otvaranje mPTP. Njihovo otvaranje dalje dovodi do kolapsa mitohondrijskog membranskog potencijala te otpuštanja NAD⁺ i kalcija u citoplazmatski matriks te oticanja i rupture mitohondrija. Zajedno s otpuštanjem proapoptotskih čimbenika poput citokroma c, to će neizbježno voditi u staničnu smrt (29). Metformin inhibira navedeno otvaranje mPTP na razini intaktnih stanica. Time vjerojatno prevenira usmjeravanje permeabilne tranzicije prema staničnoj smrti (51).

Iz navedenog se može zaključiti kako bi se primjenom metformina neposredno nakon podvrgavanja pacijenta nekoj od metoda revaskularizacije mogla ublažiti reperfuzijska ozljeda inhibicijom RET-a i posljedično smanjiti obujam nastalog oštećenja miokarda.

Uzorci ljudskog miokarda dobiveni biopsijom nakon postavljanja prenosnice su uzeti samo u jednoj vremenskoj točki, i to 5 minuta nakon početka reperfuzije, čime je onemogućeno ispitivanje dinamike stvaranja ROS-a u ovoj fazi. Također, otvara se mogućnost kako je većina skoka ROS-a do tog trenutka već završila, što je moglo utjecati na zaključke naše studije. Ipak, većina literature se slaže kako je upravo u razdoblju od 5-10 minuta od početka reperfuzije proizvodnja ROS-a na vrhuncu, što je, uz nemogućnost višestrukih biopsija ljudskog srca kako se ne bi negativno utjecalo na tijek liječenja, razlog zašto smo odabrali upravo ovu vremensku točku. Također, s obzirom na kratak životni vijek ROS-a u tkivu, postoji mogućnost kako nije detektirana njihova ukupna količina, jer je jedan dio tih spojeva iščezao od biopsije do trenutka smrzanja tkiva u tekućem dušiku. Svjesni toga, vrijeme od biopsije do uranjanja tkiva u dušik, što je urađeno već u operacijskoj sali, je skraćeno na najveću moguću mjeru, uigranom suradnjom kirurga, sestre instrumentarke i istraživača. U slučaju svih biopsija, to je vrijeme bilo standardizirano, kako bi utjecaj protoka vremena bio ujednačen kod svih uzoraka. U eksperimentima mjerenja ROS-a u metaboličkoj komorici, faza reperufuzije je oponašana *in vitro* korištenjem blokatora ATP-sintaze, oligomicina, dok je *in vivo* taj enzim u reperfuziji smanjeno aktivan zbog niske razine ADP-a u tkivu, kao posljedice prethodne ishemije. Iako postoji mogućnost kako prisutan ADP ima određeni utjecaj na proizvodnju ROS-a, glavni parametri koji dovode do reperfuzijskog porasta ROS-a; visoka koncentracija ubikvinola i visok protonski gradijent preko unutarne membrane mitohondrija su bili prisutni *in vitro*, kao što su i *in vivo*, zbog čega smatramo kako je naš model vjerodostojan.

6 ZAKLJUČCI

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrti u svijetu. Koronarna srčana bolest se ističe kao najčešći uzročnik kroničnog srčanog zatajenja. Terapijski pristup akutnim komplikacijama koronarne srčane bolesti (akutnom koronarnom sindromu) su metode revaskularizacije.

Da bi se spriječila nekroza kardiomiocita u periodu ishemije, nužno je uspostaviti ponovni dotok krvi u pogođeno područje. Međutim, prilikom revaskularizacije tkiva koje je prethodno bilo izloženo ishemiji dolazi do dodatnih oštećenja. Ukupno oštećenje tkiva koje je nastalo ovim putem nazivamo ishemijsko-reperfuzijskim oštećenjem. Glavni krivcem za njegov nastanak smatraju se reaktivne kisikove vrste.

Na temelju dobivenih rezultata u našem istraživanju možemo zaključiti:

1. Prilikom reperfuzije ishemičnog tkiva miokarda dolazi do porasta proizvodnje ROS-a, što je potvrđeno izlaganjem ventrikularnog mišića uvjetima simulirane reperfuzije *in vitro*. Ove uvjete obilježava visoko reducirani ubikvinol i visoki protonski gradijent preko unutarnje mitohondrijske membrane.
2. ROS se u fazi reperfuzije generira mehanizmom reverznog toka elektrona.
3. Porast proizvodnje ROS-a u uvjetima simulirane reperfuzije se smanjuje primjenom 1 mM metformina.
4. Kod pacijenata podvrgnutih aortokoronarnom premoštenju (jednoj od metoda revaskularizacije) dolazi do značajnog porasta ROS-a u fazi reperfuzije, i to kod skupine pacijenata koja nema razvijene kolateralne krvne žile. Prema tome, ovakvi bi pacijenti bili ciljana skupina za farmakološke intervencije kojima je cilj blokirati proizvodnju ROS-a (odnosno reverzni tok elektrona) u fazi reperfuzije.
5. Prema tome, otvara se mogućnost korištenja inhibitora kompleksa 1 respiracijskog lanca (poput metformina) u svrhu smanjenja ili sprječavanja razvoja reperfuzijske ozljede, primjerice prije podvrgavanja pacijenata nekoj od revaskularizacijskih metoda.

7 POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Criteria I of M (US) Con SSCD. Ischemic Heart Disease. U: Cardiovascular Disability: Updating the Social Security Listings [Internet]. National Academies Press (US); 2010 [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK209964/>
2. MSD Manual Professional Edition [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Atherosclerosis - Cardiovascular Disorders. Dostupno na: <https://www.msmanuals.com/professional/cardiovascular-disorders/arteriosclerosis/atherosclerosis>
3. Heart failure - Symptoms and causes - Mayo Clinic [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/heart-failure/symptoms-causes/syc-20373142>
4. Hrvatska P d o o S i M. MSD priručnik dijagnostike i terapije: Angina pectoris [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/kardiologija/koronarna-bolest/angina-pectoris>
5. Angina - StatPearls - NCBI Bookshelf [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557672/>
6. Singh A, Museedi AS, Grossman SA. Acute Coronary Syndrome. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459157/>
7. Hrvatska P d o o S i M. MSD priručnik dijagnostike i terapije: Akutni koronarni sindromi [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/kardiologija/koronarna-bolest/akutni-koronarni-sindromi>
8. Myocardial Infarction Treatment & Management: Approach Considerations, Prehospital Care and Initial Management, Emergency Department Care and In-Hospital Management [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/155919-treatment#d6>
9. Ahmad M, Mehta P, Reddivari AKR, Mungee S. Percutaneous Coronary Intervention. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556123/>
10. Deb S, Wijesundera HC, Ko DT, Tsubota H, Hill S, Fremes SE. Coronary artery bypass graft surgery vs percutaneous interventions in coronary revascularization: a systematic review. JAMA. 2013;310:2086-95.

11. Bachar BJ, Manna B. Coronary Artery Bypass Graft. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507836/>
12. Basit H, Malik A, Huecker MR. Non-ST Segment Elevation Myocardial Infarction. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513228/>
13. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS i sur. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation*. 2000;102:1193-209.
14. Ikhlas M, Atherton NS. Vascular Reperfusion Injury. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562210/>
15. Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C i sur. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab*. 2016;23:254-63.
16. Mitochondrial permeability transition pore. U: Wikipedia [Internet]. 2023 [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Mitochondrial_permeability_transition_pore&oldid=1150326831
17. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. 482-5.
18. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13659.
19. The Origin and Diversification of Mitochondria - ScienceDirect [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096098221731179X#sec1>
20. Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol*. 2017;27:R1177-92.

21. mitohondriji Hrvatska enciklopedija [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=41254>
22. Krebsov ciklus – Wikipedija [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: https://hr.wikipedia.org/wiki/Krebsov_ciklus
23. Deshpande OA, Mohiuddin SS. Biochemistry, Oxidative Phosphorylation. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/>
24. Oxidative phosphorylation Biology (article) Khan Academy [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/cellular-respiration-ap/a/oxidative-phosphorylation-etc>
25. Checa J, Aran JM. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res.* 2020;13:1057-73.
26. Lev N, Melamed E, Offen D. Toxic causes of parkinsonism. U: Koller WC, Melamed E, urednici. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2007 [citirano 09. srpanj 2023.]. str. 385–98. (Parkinson’s Disease and Related Disorders, Part II). Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0072975207840504>
27. Colpo GD, Ribeiro FM, Rocha NP, Teixeira AL. Chapter 42 - Animal Models for the Study of Human Neurodegenerative Diseases. U: Conn PM, urednik. Animal Models for the Study of Human Disease (Second Edition) [Internet]. Academic Press; 2017 [citirano 09. srpanj 2023.]. str. 1109-29. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128094686000425>
28. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation on JSTOR [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://www.jstor.org/stable/3431027>
29. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866:165768.
30. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia.* 2017;60:1566-76.
31. Metformin: its botanical background - Bailey - 2004 - Practical Diabetes International - Wiley Online Library [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pdi.606>

32. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60:1577-85.
33. Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 1996;30:359-71.
34. Metformin: Uses, Interactions, Mechanism of Action DrugBank Online [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00331>
35. Metformin - Wikipedia [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Metformin>
36. Lv Z, Guo Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:191.
37. Cardioprotective Effects of Metformin: *Journal of Cardiovascular Pharmacology* [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Abstract/2018/08000/Cardioprotective_Effects_of_Metformin.7.aspx
38. Feng X, Chen W, Ni X, Little PJ, Xu S, Tang L, i sur. Metformin, Macrophage Dysfunction and Atherosclerosis. *Front Immunol*. 2021;12:682853.
39. Triggle CR, Mohammed I, Bshesh K, Marei I, Ye K, Ding H i sur. Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? *Metabolism*. 2022;133:155223.
40. Lv Z, Guo Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:191.
41. Marinovic J, Mihanovic I, Maltar-Strmecki N, Bulat C, Zanchi J, Ljubkovic M. Coronary collateralization prevents myocardial ROS surge induced by revascularization after non-ST-elevation acute coronary syndrome: A pilot study. *Prog Cardiovasc Dis*. 2021;68:99-101.
42. Rentrop classification. (A) Example of Rentrop Grade 0 (left anterior... Download Scientific Diagram [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: https://www.researchgate.net/figure/Rentrop-classification-A-Example-of-Rentrop-Grade-0-left-anterior-descending-artery_fig1_277938819

43. Berg K, Ericsson M, Lindgren M, Gustafsson H. A High Precision Method for Quantitative Measurements of Reactive Oxygen Species in Frozen Biopsies. *PLoS One*. 2014;9:e90964.
44. Electron paramagnetic resonance - Wikipedia [Internet]. [citirano 09. srpanj 2023.]. Dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_paramagnetic_resonance
45. Gotham JP, Li R, Tipple TE, Lancaster JR, Liu T, Li Q. Quantitation of spin probe-detectable oxidants in cells using electron paramagnetic resonance spectroscopy: To probe or to trap? *Free Radical Biology and Medicine*. 2020;154:84-94.
46. ResearchGate [Internet]. [citirano 10. srpanj 2023.]. Figure 1. Principle of the Amplex Red assay of HDL function. 1. The... Dostupno na: https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-the-Amplex-Red-assay-of-HDL-function-1-The-acute-phase-AP-reaction_fig8_267813996
47. Karakuzu O, Cruz MR, Liu Y, Garsin DA. Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans*. *Bio Protoc*. 2019;9:e3409.
48. LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr Rev*. 2020;42:77-96.
49. Fontaine E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:753.
50. Stepanova A, Konrad C, Guerrero-Castillo S, Manfredi G, Vannucci S, Arnold S, i sur. Deactivation of mitochondrial complex I after hypoxia–ischemia in the immature brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39:1790-802.
51. Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De OLIVEIRA F, Fontaine E i sur. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J*. 2004;382:877-84.

Cilj istraživanja: Ispitati stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva u ljudskom miokardu nakon terapijskog postavljanja aorto-koronarne prenosnice i mogućnosti njihovog smanjenja.

Materijali i metode: U svrhu usporedbe razine proizvedenih reaktivnih kisikovih vrsta kod skupine pacijenata koji imaju razvijene koronarne kolateralne krvne žile i skupine koji ih nemaju, uzeti su uzorci od ukupno 11 pacijenata. Tijekom izvođenja operativnog zahvata postavljanja srčane prenosnice bez upotrebe stroja za izvantjelesnu oksigenaciju krvi (tzv. *off-pump CABG metoda*) sakupljeni su uzorci tkiva subepikardijalnog miokarda lijevog ventrikula metodom iglene biopsije u dva navrata - prije postavljanja prenosnice (dakle u fazi ishemije) i 5 minuta nakon ugradnje prenosnice (u fazi reperfuzije). Razvoj koronarnih kolateralnih krvnih žila se procijenio korištenjem koronarne angiografije, a ocijenio Rentropovim sustavom. Neposredno nakon uzimanja, uzorci su uronjeni u tekući dušik, što je omogućilo kvantifikaciju ROS-a koja je bila prisutna *in situ* u tom trenutku. Potom su napravljena mjerenja metodom elektronske paramagnetne rezonance (EPR). Da bi se putem EPR-a izmjerila razina ROS-a u uzorak se dodaje CMH indikator (1-hidroksi-3-metoksikarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirolidin) koji se mijenja u reakciji s ROS-om, pri čemu nastaje stabilni paramagnetski CM• (3-metoksikarbonil-proksil nitroksid) kojeg detektira EPR uređaj. U podgrupi od 5 pacijenata u fazi ishemije (prije postavljanja prenosnice) je uzet dodatni uzorak tkiva za potrebe analize proizvodnje ROS-a *in vitro*. Ti su uzorci odmah uronjeni u kardioplegičnu otopinu te dopremljeni u laboratorij gdje su se pripremili za eksperiment u uređaju za homogenizaciju tkiva (u koji je dodana i respiracijska otopina). Tako pripremljeni homogenat je prebačen u eksperimentalnu komoricu (uređaja za mjerenje mitohondrijskih funkcija) uz dodatak metaboličkih supstrata i Amplex Red-a (detekcijskog sustava koji omogućuje procjenu stvaranja ROS-a). Amplex Red veže vodikov peroksid pri čemu se formira produkt rezorufin koji ima fluorescencijsku sposobnost koju detektiramo u sustavu i iz koje računamo razinu proizvedenog peroksida.

Rezultati: Metodom EPR-a izmjerena je razina ROS-a na temelju proporcionalnosti paramagnetnom CM•. Kada su svi pacijenti uključeni u statističku analizu nije pronađena statistički značajna razlika u porastu stvaranja ROS-a. No, pri analizi skupine pacijenata koji nemaju razvijene kolateralne krvne žile (Rentrop ocjena = 0) ustanovljeno je da je reperfuzija dovela do 56% porasta razine ROS-a, $P < 0.05$. S druge strane, kod pacijenata koji imaju razvijene kolateralne krvne žile (Rentrop ocjena ≥ 2) nisu utvrđene promjene razine ROS-a. U metaboličkoj komori za mjerenje mitohondrijske funkcije prvo je izmjerena dinamika stvaranja ROS-a za vrijeme oksidativne fosforilacije, koja se pokazala relativno niskom.

Potom je tkivo miokarda izloženo metaboličkim uvjetima simulirane reperfuzije (od kojih su glavni visokoreducirani ubikvinol i visok protonski gradijent preko unutarnje mitohondrijske membrane) tijekom koje je proizvodnja ROS-a bila značajno povećana. Kada se uzorak izložio istim uvjetima simulirane reperfuzije, ali u prisutnosti metformina, proizvodnja ROS-a je bila značajno niža.

Zaključci: Prilikom reperfuzije ishemičnog tkiva dolazi do porasta proizvodnje ROS-a mehanizmom reverznog toka elektrona. Porast proizvodnje ROS-a u uvjetima simulirane reperfuzije se smanjuje primjenom metformina. Kod pacijenata podvrgnutih aortokoronarnom premoštenju dolazi do značajnog porasta ROS-a u fazi reperfuzije kod one skupine koja nema razvijene kolateralne krvne žile. Prema tome, otvara se mogućnost korištenja metformina u svrhu profilakse razvoja reperfuzijske ozljede, idealno prije podvrgavanja pacijenata nekoj od revaskularizacijskih metoda, od čega će najveću korist imati oni pacijenti koji nemaju razvijenu koronarnu kolateralnu cirkulaciju.

9 SUMMARY

Research aim: Investigate the generation of reactive oxygen species in human myocardium after its revascularization by coronary artery bypass graft surgery and probe the possibilities of their reduction.

Materials and methods: In order to compare the level of reactive oxygen species produced in the group of patients with developed coronary artery collaterals and the group without them, samples were taken from a total of 11 patients. During the performance of the off-pump CABG, tissue samples of the subepicardial myocardium of the left ventricle were collected by the needle biopsy method on two occasions - before the installation of the bypass (thus in the phase of ischemia) and 5 minutes later after installation of the bypass (in the reperfusion phase). The development of coronary collaterals was assessed using coronary angiography, and evaluated by the Rentrop system. Immediately after collection, the samples were immersed in liquid nitrogen, which allowed the quantification of ROS present *in situ* at that time. Measurements were then made using the electron paramagnetic resonance (EPR) method. In order to measure the level of ROS via EPR, a CMH indicator (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine) was added to the sample, which changes in the reaction with ROS, resulting in stable paramagnetic CM• (3-methoxycarbonyl-proxyl nitroxide) detected by EPR device. In a subgroup of 5 patients in the phase of ischemia (before bypass placement), an additional tissue sample was taken for the analysis of ROS production *in vitro*. These samples were immediately immersed in the cardioplegic solution and delivered to the laboratory where they were prepared for the experiment in the tissue homogenization device (to which the respiratory solution was added). The homogenate thus prepared was transferred to an experimental chamber (in a device for measuring mitochondrial functions) with the addition of metabolic substrates and the Amplex Red (a detection system that enables the assessment of ROS formation). Amplex Red binds hydrogen peroxide, forming the product resorufin, which has a fluorescence ability that we detect in the system and from which we calculate the level of produced peroxide.

Results: Using the EPR method, the level of ROS was measured based on proportionality with paramagnetic CM•. There was no difference in ROS between ischemia and reperfusion when all patients were pooled together. However, in group of patients with no collaterals (Rentrop = 0), reperfusion induced 56% increase in ROS ($P < 0.05$). In patients with developed collaterals (Rentrop ≥ 2), no change in ROS levels was found. In the metabolic chamber for measuring mitochondrial function, the dynamics of ROS generation during oxidative phosphorylation was first measured, which turned out to be relatively low.

The myocardial tissue was then exposed to the metabolic conditions of simulated reperfusion (the main ones being highly reduced ubiquinol and a high proton gradient across the inner mitochondrial membrane) during which ROS production was significantly increased. When the sample was exposed to the same conditions of simulated reperfusion, but in the presence of metformin, ROS production was significantly lower.

Conclusions: During reperfusion of ischemic tissue, there is an increase in the production of ROS by the mechanism of reverse electron transfer. The increase in ROS production under conditions of simulated reperfusion is reduced by the administration of metformin. In patients undergoing CABG, there is a significant increase in ROS in the reperfusion phase in the group that does not have developed collateral blood vessels. Therefore, the possibility of using metformin for the purpose of prophylaxis of the development of reperfusion injury opens up, ideally before subjecting patients to revascularization methods, from which those patients who do not have developed coronary collateral circulation will benefit the most.