

# Utjecaj trimetazidina na srčanu mitohondrijsku oksidaciju metaboličkih supstrata kod pacijenata s ishemijskom bolesti srca

---

Ćavar Borić, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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:171:611120>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-08**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Čavar Borić, dr. med.**

**UTJECAJ TRIMETAZIDINA NA SRČANU  
MITOHONDRIJSKU OKSIDACIJU METABOLIČKIH  
SUPSTRATA KOD PACIJENATA S ISHEMIJSKOM  
BOLESTI SRCA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, Hrvatska 2017.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Čavar Borić, dr. med.**

**UTJECAJ TRIMETAZIDINA NA SRČANU  
MITOHONDRIJSKU OKSIDACIJU METABOLIČKIH  
SUPSTRATA KOD PACIJENATA S ISHEMIJSKOM  
BOLESTI SRCA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, Hrvatska 2017.**

## **PREDGOVOR**

Istraživanje provedeno u sklopu ove doktorske disertacije je provedeno na Zavodu za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu pod mentorstvom prof. dr.sc. Marka Ljubkovića u razdoblju od 2013 - 2016. godine.

Radna je hipoteza ovog istraživanja bila da primjena anti-anginalnog lijeka trimetazidina inhibira oksidaciju masnih kiselina u srčanom tkivu pacijenata oboljelih od ishemijske bolesti srca, što je praćeno povećanjem oksidacije ugljikohidrata u srčanom mišiću. Glavni rezultati studije su objavljeni u izvornom znanstvenom članku:

*Cavar M, Ljubkovic M, Bulat C, Bakovic D, Fabijanic D, Kraljevic J, Karanovic N, Dujic Z, Lavie CJ, Wisloff U and Marinovic J.*

*Trimetazidine does not alter metabolic substrate oxidation in cardiac mitochondria of target patient population.*

*British journal of pharmacology. 2016 May;173(9):1529-40.*

## ZAHVALA

U istraživanje na kojem se temelji ova doktorska disertacija su bili uključeni mnogi pojedinci koji su svojim radom, savjetom, znanjem i potporom doprinijeli uspješnom završetku projekta.

Iznimno sam zahvalna mojim mentorima prof. dr. sc. Marku Ljubkoviću i prof. dr. sc. Jasni Marinović Ljubković na strpljivosti, savjetima, nesebičnom prenošenju znanja i promišljenom vođenju kroz svijet stanične fiziologije.

Hvala svim članovima Zavoda za integrativnu fiziologiju, posebno prof. dr. sc. Željku Dujiću, prof. dr. sc. Dariji Baković Kramarić, prof. dr. sc. Zoranu Valiću i dipl. ing. Ivani Banić na pomoći u istraživanju, savjetima, entuzijazmu i svekolikoj potpori tijekom moga rada na Zavodu.

Posebna zahvala doc. dr. sc. Cristijanu Bulatu, osoblju Odjela kardiokirurgije i Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBC Split bez čije pomoći i suradnje ovo istraživanje ne bi bilo moguće provesti.

Zahvaljujem se članovima Stručnog povjerenstva – prof. dr. sc. Mladenu Bobanu, doc. dr. sc. Ivani Novak Nakir i prof. dr. sc. Mislavu Vrsaloviću na uloženom vremenu i savjetima kojima su doprinijeli kvaliteti ove disertacije.

Hvala mojoj obitelji na pruženoj podršci i razumijevanju.

## Sadržaj

POPIS OZNAKA I KRATICA .....	3
1. UVOD .....	5
1.1. Energetski metabolizam u zdravom srcu .....	5
1.1.1. Metabolizam masnih kiselina u miokardu .....	6
1.1.2. Metabolizam ugljikohidrata u miokardu .....	8
1.1.3. Krebsov ciklus i oksidativna fosforilacija .....	9
1.1.4. Povezanost oksidacije masnih kiselina i oksidacije ugljikohidrata.....	12
1.2. Metabolizam srčanog mišića u stanju ishemijske bolesti srca .....	13
1.3. Modulacija metabolizma u terapiji ishemijske bolesti srca.....	15
1.3.1. Mijenjanje dostupnosti cirkulirajućih energetskih supstrata .....	15
1.3.2. Tvari koje utječu na preuzimanje masnih kiselina u srcu .....	17
1.3.3. Zaustavljanje mitohondrijskog preuzimanja masnih kiselina .....	17
1.3.4. Inhibiranje mitohondrijske $\beta$ - oksidacije masnih kiselina.....	18
1.3.5. Poticanje oksidacije glukoze .....	23
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA.....	24
3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	25
3.1. Dizajn studije:.....	25
3.2. Ispitanici .....	26
3.3. Kirurški postupak uzimanja biopsije lijevog ventrikula.....	26
3.4. Eksperimentalne procedure za mjerenje mitohondrijske oksidacije supstrata .....	27
3.4.1. Priprema tkiva za mjerenje mitohondrijske respiracije.....	27
3.4.2. Mjerenje potrošnje kisika u mitohondrijima .....	27
3.4.3. Mjerenje aktivnosti citrat sintaze .....	28
3.4.4. Mjerenje aktivnosti piruvat dehidrogenaze .....	29
3.4.5. Mjerenje ekspresije proteina ( <i>Western blot</i> ) .....	29

3.4.6. Statistički postupci .....	30
4. REZULTATI.....	31
4.1. Opća zapažanja .....	31
4.2. Utjecaj kronične terapije trimetazidinom na mitohondrijsku oksidaciju masnih kiselina i ugljikohidrata .....	33
4.3. Učinak kronične terapije trimetazidinom na aktivnost i ekspresiju piruvat dehidrogenaze .....	37
4.4. Učinak akutne <i>in vitro</i> primjene trimetazidina na supstratnu oksidaciju .....	39
5. RASPRAVA .....	43
Ograničenja studije .....	47
6. ZAKLJUČCI.....	50
7. SAŽETAK .....	51
8. SUMMARY .....	52
9. LITERATURA .....	53
ŽIVOTOPIS .....	67

## POPIS OZNAKA I KRATICA

3-KAT - 3 -ketoacil CoA tiolaza

ADP - adenzin difosfat

ATP – adenzin trifosfat

CABG – operacija premoštenja koronarnih arterija graftom, engl. *coronary artery bypass grafting*

CAT - karnitin acilkarnitin translokaza

CPT1 - karnitin palmitoil transferaza 1

CPT2 - karnitin palmitoil transferaza 2

CTL – kontrolna skupina bolesnika, engl. *Control*

ESC - Europsko kardiološko društvo, engl. *European Society of Cardiology*

FABPpm - plazma membranska izoforma vežućeg proteina masnih kiselina, engl. *plasma membrane fatty acid binding protein*

FADH<sub>2</sub> - flavin adenin dinukleotid

FAT/CD36 - translokaza masnih kiselina, engl. *fatty acid translocase / cluster of differentiation 36*

FATP - tkivno specifični transportni protein masnih kiselina, engl. *fatty acid transport protein*

FCCP - (karbonil cijanid 4-(trifluorometoksi) fenilhidrazon

GIK - Glukoza-inzulin-kalij

GLUT1, GLUT4 - transmembranski glukozni transporteri 1 i 4

HDL - lipoprotein visoke gustoće, engl. *high density lipoprotein*

LAD - lijeva prednja silazna koronarna arterija, engl. *left anterior descending coronary artery*



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

LPL – lipoprotein lipaza

LV - lijevi ventrikul, engl. *left venticle*

LVEF – e젝cijska frakcija lijevog ventrikula, engl. *left ventricle ejection fraction*

mPTP - mitohodrijska permeabilizacijsko-tranzicijska pora

NADH - nikotinamid adenin dinukleotida

PBS - fosfatni pufer, engl. *phosphate buffer saline*

PDH - piruvat dehidrogenaza

PET - pozitronska emisijska tomografija

PPAR - receptori aktivirani peroksisomnim proliferatorom, engl. *peroxisome proliferator-activated receptor*

RCR - omjer respiratorne kontrole, engl. *respiratory control ratio*

RIPA – pufer, engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*

Rmax - maksimum mitohodrijske respiracije

SDS-PAGE gel - engl. *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*

SR - sarkoplazmatski retikul

SSP - sulfo-N–sukcinimidil-palmitat

SSO - sulfo-N–sukcinimidil-oleat

TAG – triacilglicerol

TMZ –[1-(2,3,4-trimetoksibenzil)-piperazin dihidroklorid], trimetazidin

UCP3 - mitohodrijski protein razdvajanja 3, engl. *uncoupling protein 3*

VLDL – lipoprotein vrlo male gustoće, engl. *very low density lipoprotein*

## 1. UVOD

Ishemijska bolest srca je jedan od glavnih uzroka morbiditeta i mortaliteta širom svijeta. Zbog velike učestalosti, značajnom utjecaju na smanjenje kvalitete i trajanja života oboljelih, utjecaja na radnu sposobnost i ostalih negativnih ishoda bolesti, neprestano se pokušavaju poboljšati stari i pronaći novi načini liječenja. Jedan od novijih dodataka terapiji liječenja ishemijske bolesti srca je farmakološko moduliranje srčanog staničnog metabolizma, s ciljem poboljšanja srčane funkcije. U sklopu ove doktorske disertacije, prikazat će se osnove zdravog staničnog srčanog metabolizma, metaboličke promjene koje nastaju u ishemijskoj bolesti srca te ciljevi primjene metaboličke terapije u ovoj bolesti. Nadalje, istraživanje provedeno u sklopu ove disertacije predstavlja doprinos spoznaji o mehanizmu djelovanja trimetazidina (TMZ), jednog od metaboličkih modulatora koji je sve više u upotrebi u liječenju ishemijske bolesti srca.

### 1.1. Energetski metabolizam u zdravom srcu

Srce je, u energetskom smislu, jedan od najzahtjevnijih organa u ljudskom tijelu (1). Kako bi se održala primjerena kontraktilna funkcija, bazalni metabolički procesi i ionska ravnoteža, potrebno je neprestano obnavljanje energetski bogatog fosfata – adenzin trifosfata (ATP). U odraslom srcu, više od 95% proizvodnje ATP-a se zbiva aerobnim putem – mitohondrijskom oksidativnom fosforilacijom, čime mitohondriji postaju glavne stanične „tvornice” energije. Bazalna količina ATP-a u srcu je niska (oko 5  $\mu\text{mol/g}$  tkiva), dok je visok postotak hidrolize istog supstrata (30  $\mu\text{mol/min}$  u mirovanju), što ukazuje da se u fiziološkim uvjetima gotovo sav proizvedeni ATP iskoristi za trenutne energetske potrebe stanice, dok je pohranjena količina ATP-a zanemariva. Uzmemo li se u obzir ove vrijednosti, dolazimo do izračuna da tijekom 24 sata, zdravo srce proizvede (i potroši) između 6 i 30 kg ATP-a (!), ovisno o stupnju tjelesne aktivnosti. Kako bi ispunio tako visoke energetske zahtjeve, srčani mišić koristi sve dostupne izvore za proizvodnju i stalnu obnovu ATP-a (2-5). Ipak, ukoliko se uspoređi korištenje pojedine vrste supstrata u proizvodnji stanične energije kroz duže vremensko razdoblje, vidljivo je da postoji značajna razlika u njihovoj zastupljenosti. U zdravom srcu odraslog čovjeka, 60-90% proizvedenog ATP-a se proizvede koristeći masne

kiseline kao izvor za sintezu energije u procesu  $\beta$ -oksidacije. Ostatak proizvedene energije (10-40%) dobije se aerobnom razgradnjom ugljikohidrata. U stanju homeostaze, zanemariv je postotak proizvedene energije iz drugih izvora (aminokiseline, laktati, ketonska tijela) i anaerobnog puta razgradnje glukoze (do 5%) (5, 6). Omjer iskorištavanja dvaju glavnih supstrata – masnih kiselina i ugljikohidrata, se mijenja u svakom trenutku te ovisi o nizu čimbenika. Jedan od glavnih je dostupnost pojedinog supstrata. Primjerice, nakon obroka bogatog ugljikohidratima, glavni izvor za proizvodnju energije će biti razgrađeni monosaharid – glukoza. S druge strane, u slučaju veće dostupnosti slobodnih masnih kiselina, one postaju glavni izvor za proizvodnju ATP-a.

Obzirom da iskorištavanje masnih kiselina u većem udjelu doprinosi stvaranju stanične energije, na regulaciju količine njihova korištenja, osim dostupnosti supstrata, utječe i niz drugih čimbenika. Tako energetski srčani zahtjevi, dostupnost kisika, alosterička kontrola preuzimanja i procesa razgradnje masnih kiselina od esterifikacije do aktivnosti vezanih za mitohondrijski lanac prijenosa elektrona, mogu u konačnici regulirati potrošnju tog supstrata. Također, regulacija transkripcije enzima uključenih u metabolizam masnih kiselina utječe dugoročnije na izbor određenog supstrata u srcu (3, 5, 7-9). U nastavku je pojednostavljeni prikaz procesa dobivanja energije iz masnih kiselina i ugljikohidrata u srcu te međusobna povezanost i razlike pojedinog metaboličkog puta (Slika 1).

### **1.1.1. Metabolizam masnih kiselina u miokardu**

Masne kiseline u cirkulaciji su u svom neaktivnom obliku vezane za albumin, triacilglicerol (TAG) iz hilomikrona ili VLDL lipoprotein (engl. *very low density lipoprotein*, VLDL) (10, 11). Otpuštanjem iz ovih kemijskih spojeva, slobodne masne kiseline postaju dostupne za korištenje srčanom mišiću. Trenutna razina dostupnih cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina u krvi ovisi o nutritivnom statusu, regulaciji autonomnog živčanog sustava (simpatička stimulacija hormon osjetljive lipaze masnog tkiva) te pratećim bolestima organizma (npr. šećerna bolest, pretilost – kronično povišena razina slobodnih masnih kiselina) (12). Glavni enzim odgovoran za proces otpuštanja slobodnih masnih kiselina s TAG-a je lipoprotein lipaza (LPL). Promjene u sintezi, aktivaciji, sekreciji, transportu i razgradnji ovog enzima su jedna mogućnost regulacije količine metabolizma masnih kiselina u srcu. Na primjer, u fazi gladovanja pojačana je aktivacija LPL s posljedičnim povećanjem

koncentracije cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina, koje postaju dostupne srčanom mišiću za preuzimanje. Slična endogena aktivacija ovog enzima nastaje i u šećernoj bolesti, što kao ukupan učinak produljene izloženosti velikoj količini masnih kiselina, koje postaju gotovo jedini supstrat za proizvodnju energije, može uzrokovati srčanu lipotoksičnost i razvoj kardiomiopatije. Iz navedenog se može zaključiti kako je regulacija aktivnosti lipoprotein lipaze prvi korak u cilju reguliranja količine metaboličkog iskorištavanja masnih kiselina kao supstrata za proizvodnju energije u srcu.

Cirkulirajuće slobodne masne kiseline u srčanu stanicu mogu ući pasivnom difuzijom ili preko proteina nosača (glavni mehanizam u *in vivo* uvjetima). Tri su glavna proteina nosača masnih kiselina: translokaza masnih kiselina (engl. *fatty acid translocase/cluster of differentiation 36*, FAT/CD36), plazma membranska izoforma vežućeg proteina masnih kiselina (engl. *plasma membrane fatty acid binding protein*, FABPpm) i tkivno specifični transportni protein masnih kiselina (engl. *fatty acid transport protein*, FATP) (13, 14). Prijenosom u citoplazmu, masne kiseline, pomoću aktivnosti citoplazmatske CoA sintetaze, postaju dugolančani esteri (dugolančani acil CoA) od kojih se oko 75% prenosi u mitohondrij, a ostatak ulazi u unutar srčanu zalihu TAG-a (2, 3, 15). Točan postotak iskorištavanja supstrata u mitohondriju ili pohrane u obliku tkivnog citoplazmatskog TAG ovisi o plazmatskoj koncentraciji slobodnih masnih kiselina (12). Ulazak masnih kiselina u mitohondrij kroz membranski dvosloj fosfolipida nije jednostavan, već je posredovan aktivnošću nekoliko enzima, čijom se regulacijom također može mijenjati stupanj aktivnosti metaboličkog puta razgradnje masnih kiselina. Prvi enzim ovog niza je karnitin palmitoil transferaza 1 (CPT1), koja na esterificirani acil CoA masnih kiselina pridodaje karnitin, stvarajući dugolančani acilkarnitin masnih kiselina. Ovako spojene, masne kiseline su pogodne za vezanje na karnitin acilkarnitin translokazu (CAT), enzim odgovoran za prijenos konjugiranih masnih kiselina preko unutrašnje mitohondrijske membrane. Unutar matriksa mitohondrija, karnitin palmitoil transferaza 2 (CPT2) ponovno pretvara acilkarnitin u dugolančani acil CoA, koji je prikladan oblik supstrata za ulazak u proces  $\beta$ -oksidacije.

Beta-oksidacija masnih kiselina je proces koji se odvija tijekom nekoliko međusobno ovisnih kemijskih reakcija kataliziranih četirima enzimima: acil CoA dehidrogenazom, enoil CoA hidratazom, L-3-hidroxiacil CoA dehidrogenazom i 3-ketoacil CoA tiolazom (3-KAT). Svaki ciklus  $\beta$ -oksidacije završava skraćivanjem dugolančanog acil-CoA za dva ugljikova atoma i proizvodnjom acetil-CoA, flavin adenin dinukleotida (FADH<sub>2</sub>) i nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). Proizvedeni spojevi mehanizmom negativne povratne sprege inhibiraju

aktivnost ključnih enzima njihova nastanka, što predstavlja oblik alosteričke kontrole. Najvažnija endogena regulacija  $\beta$ -oksidacije se postiže djelovanjem acetil-CoA na enzim 3-KAT. U stanjima niskih energetske staničnih potreba, gomilanje navedenog produkta će inhibirati daljnju  $\beta$ -oksidaciju. Osim regulacije produktima, enzimi  $\beta$ -oksidacije su također u visokom stupnju kontrolirani transkripcijom (16). Stanja koja pojačano aktiviraju  $\beta$ -oksidaciju su povezana s povećanjem ekspresije i aktivnosti enzima uključenih u navedeni proces i obrnuto (glavni do sada otkriveni medijatori ovog puta regulacije su PPAR  $\alpha$  i PGC-1  $\alpha$ ). Od spojeva koji nastaju kao proizvod  $\beta$ -oksidacije, acetil-CoA ulazi u Krebsov ciklus (ciklus limunske kiseline, trikarbonski ciklus), unutar kojega se nakon nekoliko kemijskih reakcija proizvodi još molekula NADH. Ovi elektronima bogati spojevi (NADH i FADH<sub>2</sub>) predaju mitohondrijskom respiracijskom lancu elektrone, pri čemu se kao posljednji korak stvara glavna proizvodnja ATP-a. Detaljniji opis procesa Krebsova ciklusa i oksidacijske fosforilacije se nalazi u odsječku 1.1.3.

### 1.1.2. Metabolizam ugljikohidrata u miokardu

Ulazak glukoze (glavnog monosaharida koji nastaje razgradnjom ugljikohidrata) u kardiomiocit se odvija niz koncentracijski gradijent, djelovanjem transmembranskih glukoznih transportera GLUT1 i GLUT4. Nakon ulaska u citoplazmu slijedi fosforilacija glukoze u glukoza-6 fosfat posredstvom enzima heksokinaze. U stanju energetske ravnoteže, fosforilirana glukoza se polimerizira u skladišni oblik – glikogen. Ukoliko postoji potreba za proizvodnjom energije, glukoza-6 fosfat ulazi u proces glikolize uz pomoć ključnog enzima – fosfofruktokinaze 1. Rezultat glikolitičkog puta razgradnje, koji je kataliziran pomoću nekoliko enzima i alosterički kontroliran, je nastajanje piruvata. Piruvat u aerobnim uvjetima sudjeluje u reakcijama Krebsova ciklusa i procesa oksidativne fosforilacije, dok se u anaerobnim uvjetima razgrađuje do laktata. U prvom slučaju, piruvat ulazi u mitohondrij uz pomoć proteinskog nosača. S unutarnje strane mitohondrijske membrane piruvat kemijski reagira s enzimom piruvat dehidrogenazom (PDH). Ovaj enzim dekarboksilira piruvat, pri čemu nastaje acetil-CoA koji se, kao što je slučaj i s acetil-CoA proizvedenom u procesu  $\beta$ -oksidacije, pridružuje reakcijama Krebsova ciklusa. Aerobni kapacitet zdravog srčanog mišića je velik, kao i volumni udio mitohondrija u stanici, pa je proizvodnja značajne količine laktata u zdravom srčanom mišiću odsutna. No, ukoliko u stanici vladaju anaerobni uvjeti ili ako je

zbog nekog razloga zaustavljena mitohondrijska oksidacija piruvata, citoplazmatska laktat dehidrogenaza katalizira pretvorbu piruvata u laktat, pri čemu se oslobađaju dvije molekule ATP-a. Iako u ukupnom udjelu proizvodnje stanične energije anaerobni put razgradnje glukoze čini manji dio, smatra se da ovako proizveden ATP ima važnu ulogu u održavanju ionske homeostaze unutar srčane stanice (17-19). Glavnina energetske proizvodnje ugljikohidrata se, ipak, ostvaruje aerobnom oksidacijom glukoze. Ključni regulirajući enzim intenziteta aerobnog oksidativnog metabolizma ugljikohidrata je ranije spomenuta PDH. To je multienzimski kompleks čije su dvije sastavnice važne za stupanj aktivnosti PDH kinaza i PDH fosfataza (20, 21). Aktivnost enzima je regulirana stupnjem fosforilacije te razinom enzimskih supstrata i produkata. Aktivacijom kinaze fosforilira se PDH, pri čemu se zaustavlja aktivnost enzima i smanjuje intenzitet metaboličkog puta iskorištavanja ugljikohidrata. Obrnuto, fosfataza defosforilira PDH, čime nestaje inhibicije i enzim ponovno postaje aktivan. Kinazna aktivnost je povišena u stanjima povećane količine produkata acetil-CoA i NADH, a smanjena kod povišene koncentracije supstrata; piruvata, slobodnog CoA i  $\text{NAD}^+$  (1). Fosfatazna aktivnost je prvenstveno potaknuta u stanjima povećanog ulaska kalcija u mitohondrij u slučaju povišene stimulacije katekolaminima (22).

### 1.1.3. Krebsov ciklus i oksidativna fosforilacija

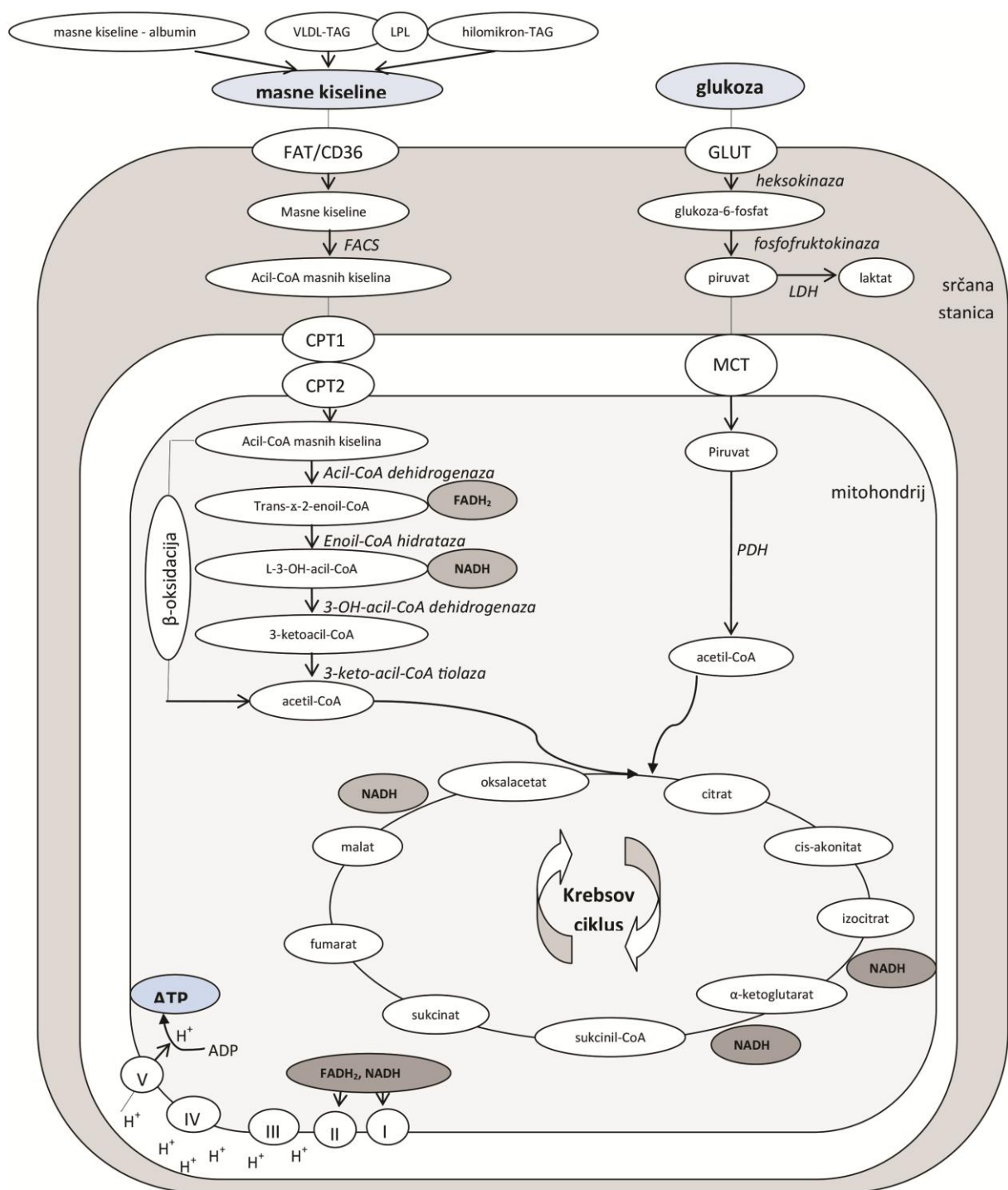
Krebsov ciklus (ciklus limunske kiseline, ciklus trikarboksilnih kiselina) ima važnu ulogu u završavanju procesa dekarboksilacije acetil-CoA nastalog katabolizmom ugljikohidrata, masti i proteina, pri čemu se oslobađa kemijska energija u obliku NADH. Cijeli proces se odvija u nekoliko kemijskih reakcija. Osnovni supstrat Krebsova ciklusa je acetil-CoA. Dvije molekule acetil-CoA se, nakon oslobađanja acetilnih skupina, spajaju s oksalacetatom formirajući limunsku kiselinu - citrat. Slijedi niz kemijskih reakcija u kojima nastaju supstrati koji u sljedećem koraku postaju reaktanti. Tako citrat prelazi u izocitrat, slijedi sinteza oksalsukcinata,  $\alpha$ -ketoglutarata, sukcinil-CoA, sukcinata, fumarata, malata te kao zadnji korak regeneracija oksaloctene kiseline slobodne za stupanje u novi kemijski ciklus i spajanje s acetil-CoA (23) (Slika 1). Tijek kemijskih reakcija Krebsova ciklusa je usko povezan sa sposobnošću mitohondrijskog respiracijskog lanaca za proizvodnju ATP-a u procesu koji slijedi – oksidativnoj fosforilaciji. Količina proizvedenog ATP-a ovisi o dostupnosti kisika, citosolnom omjeru ATP/ADP i omjeru NADH/NAD<sup>+</sup> u mitohondriju. U slučaju smanjene

stanične potrebe za ATP-om, kad je povišen omjer ATP/ADP te ukoliko nisu dostupni kofaktori oksidacije FAD i  $\text{NAD}^+$ , nastaje snažna inhibicija oba procesa (22).

Reducirani kofaktori NADH i  $\text{FADH}_2$  proizvedeni u procesu glikolize,  $\beta$ -oksidacije i Krebsova ciklusa, predaju elektrone nastale oksidacijom molekula prijenosnom lancu elektrona oksidativne fosforilacije. Prijenosni lanac elektrona čine enzimski kompleksi smješteni u ili vezani uz unutarnju mitohondrijsku membranu, na kojima se mogu odvijati oksidoredukcijski procesi. Označavaju se rimskim brojevima I-V. U slijedu prijenosa elektrona na molekulu kisika preko opisanih proteina, u zadnjem koraku se na kompleksu V generira ATP, zbog čega se ovaj enzimski kompleks dodatno naziva ATP-sintaza. Naime, tijekom ovog procesa elektroni se prenose od molekula donora (NADH i  $\text{FADH}_2$ ) na molekule primatelje (kisik) u nizu redoks reakcija pri čemu se stvara potencijalna kemijska energija potrebna za stvaranje elektrokemijskog protonskog gradijenta.

Mitohondrijska sinteza ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije je nužno povezana s održavanjem elektrokemijskog protonskog gradijenta između međumembranskog prostora i matriksa mitohondrija. Taj elektrokemijski gradijent nastaje izbacivanjem protona (najviše  $\text{H}^+$ ) preko kompleksa I, III i IV (24, 25) koristeći energiju oslobođenu od predanih elektrona. Ponovni povratak protona u matriks mitohondrija preko ATP sintaze daje energiju potrebnu za sintezu ATP-a u reakciji fosforilacije adenozin difosfata (26, 27).

Mitohondrijski proteini razdvajanja (engl. *uncoupling proteins*) su skupina mitohondrijskih transportnih proteina koji omogućavaju alternativni put povratka protona u matriks mitohondrija te tako elektrokemijski gradijent protona razdvajaju od povezanosti sa sintezom ATP-a (12). Sintetizirane kemijske tvari također mogu oponašati ulogu razdvajajućih proteina. Jedna od njih je i FCCP (karbonil cijanid 4-(trifluorometoksi) fenilhidrazon). Ukoliko postoji oštećenje na razini ATP sintaze, onemogućen je primjeren tijek protona u matriks mitohondrija, zbog čega se zaustavlja/usporava proizvodnja ATP-a. Zbog povećane količine pozitivnog naboja u međumembranskom prostoru, kompleksi I, III i IV ne mogu prebaciti nove protone za održavanje optimalnog elektrokemijskog gradijenta. Zbog toga se zaustavlja normalan prijenos elektrona sa NADH i  $\text{FADH}_2$ , s posljedičnim smanjenim trošenjem molekula kisika. Kako je mjerenje tkivne potrošnje kisika jedna od metoda procjene intenziteta metabolizma, može se pogrešno zaključiti da je određeni metabolički put smanjene aktivnosti. Primjena FCCP otklanja mogućnost takve pogreške.



**Slika 1.** Pojednostavljen prikaz metabolizma u srčanoj stanici. (Za oznaku kratica pogledati uvod.)



#### 1.1.4. Povezanost oksidacije masnih kiselina i oksidacije ugljikohidrata

Opisana dva glavna metabolička puta proizvodnje energije u srcu su međusobno povezana. Metabolički put razgradnje masnih kiselina je glavni regulator metabolizma ugljikohidrata u srčanoj stanici (22). Acetil-CoA nastao procesom  $\beta$ -oksidacije aktivira kinazu PDH, pri čemu se enzim fosforilira, a njegova aktivnosti smanjuje – smanjen je ulazak piruvata u Krebsov ciklus. S druge strane, prevladavanje acetil-CoA nastalog razgradnjom piruvata inhibira enzime CPT, čime se smanjuje ulazak masnih kiselina u mitohondrij. Također, nastaje inhibicija 3-KAT enzima  $\beta$ -oksidacije (28). Ova sprega između metabolizma masnih kiselina i ugljikohidrata u srcu se naziva *Randleov* ciklus, prema Philipu Randleu koji ga je prvi opisao (12, 13, 29, 30).

Iako međusobno povezani, metabolički putovi razgradnje masnih kiselina i ugljikohidrata imaju različit učinak na neke mjerljive stanične srčane parametre. Jedan od neizravnih pokazatelja srčane funkcije je omjer srčanog rada i utroška energije za taj rad (31). Kako se više od 95% ATP-a potrebnog za srčani rad u normalnim uvjetima stvara aerobnim oksidativnim putem, moguće je procijeniti utrošak energije u srcu mjerenjem potrošnje kisika (32, 33).

Za analizu učinkovitosti metaboličkih putova proizvodnje energije u srcu, važno je poznavati tri vrijednosti: količinu utrošenog supstrata, proizvedene energije i utrošenog kisika u tom procesu. Potpunom oksidacijom 1 mola palmitata (jedna od zastupljenijih masnih kiselina koju srčani mišić koristi kako supstrat) proizvede se 105 mola ATP-a i utroši 23 mola molekula kisika. Oksidacija 1 mola glukoze proizvede 31 mol ATP-a, pri čemu se utroši 6 mola molekula kisika (1). Iz ovih vrijednosti se može izračunati srčana učinkovitost kao mjera potrošnje kisika za ostvareni srčani rad (28). Vidljivo je kako su, uspoređujući samo količinu proizvedene energije, masne kiseline energetski bogatiji supstrat (34). No, ako usporedimo proizvedenu energiju i količinu kisika potrebnog za njezino stvaranje, metabolički put razgradnje glukoze je učinkovitiji (35, 36). Naime, za istu količinu proizvedenog ATP potrebno je utrošiti oko 15% manje kisika metabolizirajući glukozu kao supstrat, u usporedbi s metaboliziranjem palmitata (37). U stanjima povećanih metaboličkih zahtjeva, primijećen je pomak prema većem iskorištavanju glukoze (22), što je u skladu s trenutno prihvaćenom spoznajom o većoj učinkovitosti iskorištavanja ugljikohidrata.

Moguće objašnjenje smanjene učinkovitosti masnih kiselina u proizvodnji energije leži u nedavnom otkriću kako preko mitohondrijskog proteina razdvajanja 3 (engl. *uncoupling protein 3*, UCP3) masne kiseline mogu prijeći u intermembranski prostor gdje se vežu s protonom nakon čega ga vraćaju u matriks mitohondrija bez da se isti iskoristio za proizvodnju ATP-a – nastaje efekt „*curenja protona*” (38, 39). Iako ovi razlozi djelom objašnjavaju opisanu problematiku, potrebno je daljnje istraživanje razlika u učinkovitosti oba metabolička puta.

## 1.2. Metabolizam srčanog mišića u stanju ishemijske bolesti srca

Ishemija miokarda označava stanje nemogućnosti koronarne cirkulacije za zadovoljenjem trenutne stanične potrebe za kisikom. Osim potpunog prestanka opskrbe krvlju u stanjima potpune ishemijske, važni su učinci i hipoksije – nedovoljne opskrbe srčanog mišića kisikom. Prvotni učinak ishemijske/hipoksije je nedovoljna opskrba kisikom i hranjivim tvarima te smanjeno odstranjivanje metaboličkih nusproizvoda iz pogođenog dijela. U stanjima povećanog srčanog rada, veći su energetske zahtjevi za održavanjem primjerene srčane kontrakcije, zbog čega je veći i utrošak kisika u procesima oksidativnog metabolizma. Simptomi ishemijske bolesti srca će ovisiti o prirodi i ozbiljnosti trenutne ishemijske epizode i brzini uspostavljanja ravnoteže između energetske zahtjeva i opskrbe kisikom. Ishemijska bolest srca obuhvaća spektar stanja koja variraju od stabilne angine pectoris, razvijenog akutnog infarkta miokarda pa sve do ishemijskog srčanog zatajenja te osim funkcijskih promjena uključuje i promjene metabolizma. U zdravom srcu, kako je ranije opisano, postoji skladan odnos između metabolizma masnih kiselina i ugljikohidrata. Ishemija uzrokuje poremećaj ravnoteže metaboliziranja supstrata oksidativnog puta.

Kako je kisik nezamjenjiv čimbenik u aerobnim staničnim metaboličkim procesima, hipoksija uzrokuje brz pad u proizvodnji ATP-a. Aktivacijom simpatičkog živčanog sustava tijekom akutne ishemijske pojačava se aktivnost tkivne lipaze i smanjuje izlučivanje inzulina iz gušterače, s posljedičnim porastom koncentracije cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina. Tako u razdoblju ishemijske, masne kiseline miokardu postaju dostupniji izvor energije (40, 41). S druge strane, nastaje preusmjerenje razgradnje piruvata prema laktatu i porast udjela anaerobnog puta u proizvodnji energije (42). Iako se ovim načinom proizvede ograničena količina ATP-a, važna za preživljene stanice u ishemijskim uvjetima, kao štetna posljedica

nastaje unutarstanični porast koncentracije laktata i  $H^+$  iona, što uzrokuje daljnju ionsku neravnotežu s posljedičnim slabljenjem kontraktilne funkcije. Zbog toga, iako anaerobni put početno stvori određenu količinu ATP-a, ista se povećano troši na ponovno uspostavljanje ionske ravnoteže.

Zaustavljanjem oksidacijske fosforilacije na mitohondrijskom prijenosnom lancu elektrona nastaje akumulacija reducirajućih molekula NADH i  $FADH_2$  (43). Ovi spojevi inhibiraju aktivnost nekoliko enzima  $\beta$ -oksidacije, pri čemu dolazi do gomilanja intermedijarnih spojeva masnih kiselina u različitim staničnim odjeljcima, uključujući matriks mitohondrija i sam citosol stanice. Akumulacija acil karnitina i acil-CoA estera potiče razaranje mitohondrijskih krista i formaciju amorfnih unutarmitohondrijskih denziteta, s promjenama mitohondrijske funkcije koja može potrajati i nakon reperfuzije (44).

U razdoblju reperfuzije također je zabilježen porast u iskorištavanju masnih kiselina kao supstrata za proizvodnju energije (45, 46). No, dominacija ovog metaboličkog puta u razdoblju ponovno uspostavljene krvne opskrbe doprinosi daljnjem razdvajanju glukoznog metabolizma, s većim udjelom glikolitičkog puta, što ponovno uzrokuje stanični ionski nesklad i razvoj stanične acidoze.

Smanjena proizvodnja ATP-a tijekom ishemije uzrokuje inhibiciju  $Na^+/K^+$ -ATP-aze, važnog proteina u održavanju membranskog potencijala mirovanja (47). Posljedica je porast unutarstanične koncentracije natrija. Smanjena aktivnost  $Ca^{2+}$ -ATP-aze, koja je odgovorna za povrat kalcija u sarkoplazmatski retikul (SR) nakon kontrakcije, uzrokuje slabljenje kontraktilne funkcije (48). Unutarstanična acidoza utječe na kontraktilnu funkciju djelovanjem na vezna mjesta za kalcij kontraktilnih vlakana. Sve navedeno, ne samo u razdoblju ishemije, već i u razdoblju reperfuzije, uzrokuje slabljenje kontraktilnosti stanice, mitohondrijsku disfunkciju, aktivaciju o kalciju ovisnih proteaza i poticanje programirane stanične smrti. Sve navedeno je razlog slabe mogućnosti oporavka srčane funkcije i učinkovitosti (12).

Iz opisanog se može zaključiti kako odabir masnih kiselina kao metaboličkog supstrata u razdoblju hipoksije/ishemije i nakon reperfuzije može doprinijeti oštećenju srčane funkcije te se prvenstveno smatra štetnim prilagodnim staničnim mehanizmom. Stoga novi pristup liječenju ishemijske bolesti srca uključuje metaboličku manipulaciju opisanim negativnim srčanim procesima.

### 1.3. Modulacija metabolizma u terapiji ishemijske bolesti srca

U patološkim uvjetima poput srčanog zatajenja ili ishemijske bolesti srca, promjene u srčanom energetske metabolizmu doprinose daljnjem slabljenju srčane funkcije i učinkovitosti. Sve je više dokaza kako se terapijskim moduliranjem srčanog metabolizma može doprinijeti očuvanju funkcije srčanog mišića (1).

Modulacija srčanog energetske metabolizma, koja posebno uključuje preusmjeravanje izbora supstrata od korištenja masnih kiselina prema većem iskorištavanju glukoze kao oksidativnog goriva, je novi terapijski pristup osmišljen u svrhu očuvanja srčane funkcije i učinkovitosti u raznim oblicima ishemijske srčane bolesti i srčanog zatajenja. Farmakološke tvari koji djelomično inhibiraju metabolizam masnih kiselina u srčanom mišiću i potiču iskorištavanje glukoze kao goriva od nedavno su postali središte novog terapijskog pristupa (6, 49-55). Navedena promjena se može ostvariti djelovanjem na metaboličke procese na više razina. Neki od do sada proizvedenih farmakoloških pripravaka su već u kliničkoj upotrebi, dok se drugi za sad koriste samo u istraživačke svrhe. Glavne razine djelovanja na metabolizam uključuju mijenjanje dostupnost cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina, inhibiciju staničnog i mitohondrijskog preuzimanja masnih kiselina te moduliranje procesa  $\beta$ -oksidacije izravno ili neizravno potičući oksidaciju piruvata.

#### 1.3.1. Mijenjanje dostupnosti cirkulirajućih energetskih supstrata

Kako je u uvodnom dijelu naznačeno, srčani odabir i preuzimanje određene vrste hranjive tvari koja će se iskoristiti za dobivanje energije u kardiomiocitima je prvenstveno određen njenom dostupnošću. Nekoliko je do sada istraženih i klinički primijenjenih sredstava za manipuliranje ovim korakom staničnog metabolizma.

**Glukoza-inzulin-kalij (GIK) infuzija** je jedan od prvih pokušaja vanjskog oblikovanja staničnog metabolizma. Većom dostupnošću glukoze u odnosu na krvnu koncentraciju slobodnih masnih kiselina potiče se metabolički put razgradnje ugljikohidrata (56). Nedostatak ovog pristupa je u tome što hiperglikemija uzrokuje pogoršanje ishemijske ozljede srčanog mišića poticanjem apoptoze i oslobađanjem slobodnih kisikovih radikala (57, 58). Također, hiperglikemija ima proupalni i protrombotski učinak (59). Gledano u cjelini, ovi

neželjeni prateći učinci hiperglikemije mogu biti posebno štetni u uvjetima akutne ishemije te moguća korist od smanjenja iskorištavanja cirkulirajućim masnih kiselina nije veća od mogućeg oštećenja svim navedenim mehanizmima. Nekoliko kliničkih randomiziranih istraživanja nije pronašlo koristan učinak GIK infuzije u stanjima ishemije miokarda. Također, pojedine kliničke studije su bile prekinute ranije od planiranog zbog uočene veće smrtnosti u GIK skupini (60-62).

**PPAR** (receptori aktivirani peroksisomnim proliferatorom) su skupina hormonalnih receptora u staničnoj jezgri koji imaju značajan utjecaj na metabolizam lipida, posebno na regulaciju  $\beta$ -oksidacije i pohrane masnih kiselina – uključeni su u lipogenezu i procese razgradnje masti. Postoje tri izoforme PPAR receptora:  $\alpha$ ,  $\gamma$ , i  $\beta/\delta$ . PPAR  $\alpha$  potiče izvansrčanu  $\beta$ -oksidaciju i smanjuje razinu cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina što utječe na smanjenje srčane  $\beta$ -oksidacije. Farmakološki ligandi ove skupine receptora su fibrati (gemfibrozil, klofibrat i fenobibrat). Ligandi PPAR  $\gamma$  receptora su tiazolindindioni, lijekovi koji se koriste u antidijabetičkoj terapiji (pioglitazon, troglitazon, roziglitazon). Ovi lijekovi aktivacijom PPAR $\gamma$  receptora smanjuju cirkulirajuću razinu TAG i slobodnih masnih kiselina te potiču preuzimanje glukoze i glukoznu oksidaciju u srcu (63, 64). Teoretski su ovo prikladni lijekovi u metaboličkoj modulaciji, no u nedavnim kliničkim istraživanjima se pokazala povećana učestalost akutnog infarkta miokarda i povećana smrtnost kod pacijenata koji su primjenjivali ligande PPAR $\gamma$  receptora, što zahtjeva daljnja istraživanja prije sustavne primjene u metaboličkoj terapiji (65, 66). PPAR  $\beta/\delta$  ligandi također potiču izvansrčanu oksidaciju masnih kiselina u skeletnim mišićima i masnom tkivu (67), što smanjuje srčanu  $\beta$ -oksidaciju s mogućim pozitivnom učinkom.

**Nikotinska kiselina** smanjuje razinu cirkulirajućih lipoproteina vrlo male gustoće (VLDL) i lipoproteina niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*, LDL) te povisuje koncentraciju lipoproteina visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*, HDL). Također sudjeluje u stabilizaciji aterosklerotskog plaka s pozitivnim učinkom na bolesnike s ishemijskom bolesti srca. Nikotinskom kiselinom se može mijenjati energetska metabolizam zaustavljanjem lipolize u masnom tkivu te pratećim smanjenjem dostupnih cirkulirajućih slobodnim masnih kiselina srcu (68).

**$\beta$ -adrenoreceptorski agonisti** (propranolol) ostvaruju pozitivne učinke smanjivanjem srčanih energetska zahtjeva – negativno inotropnim i negativnim kronotropnim učinkom.

Također umanjuju stupanj katekolaminima potaknute lipolize uz smanjenje dostupnost slobodnih masnih kiselina (69).

### 1.3.2. Tvari koje utječu na preuzimanje masnih kiselina u srcu

Sulfo-N-sukcinimidil esteri dugolančanih masnih kiselina: sulfo-N-sukcinimidil-palmitat (SSP) i sulfo-N-sukcinimidil-oleat (SSO) su inhibitori FAT/CD36 proteina odgovornog za stanično preuzimanje masnih kiselina (70). Korištenjem ovih tvari nastaje zaustavljanje procesa  $\beta$ -oksidacije (71). Za sada se navedeni spojevi koriste samo eksperimentalno te se šira klinička primjena još ne očekuje.

### 1.3.3. Zaustavljanje mitohondrijskog preuzimanja masnih kiselina

Lijekovi ove skupine prvenstveno inhibiraju CPT1 – glavni regulirajući enzim mitohondrijskog preuzimanja masnih kiselina. Nekoliko je farmakoloških pripravaka korištenih za ovu namjenu: perheksilin, etomoksir i oksfenicin (12).

**Etomoksir** je ireverzibilni inhibitor CPT1 koji uzrokuje prevladavanje ugljikohidratnog puta oksidacije zaustavljanjem ulaska masnih kiselina u mitohondrij. Mala klinička studija primijenjena na petnaest pacijenata NYHA klase II pokazala je poboljšanje u ejekcijskoj frakciji lijevog ventrikula i kliničkom statusu nakon tri mjeseca primjene lijeka (72). Druga klinička studija je zabilježila porast jetrenih enzima u pacijenata koji su koristili etomoksir, što je moglo nastati zbog ireverzibilne inhibicije CPT1 (73). Lijek je još u kliničkim ispitivanjima.

**Perheksilin** je lijek koji se 70-ih godina prošlog stoljeća koristio u liječenju angine pectoris, no povučen je iz kliničke upotrebe nekoliko godina nakon početka primjene zbog hepatotoksičnosti i periferne neuropatije. Ove nuspojave su nastale zbog ireverzibilne inhibicije CPT1 enzima lijekom. Novija istraživanja su pokazala kako je srčana forma CPT1 proteina osjetljivija na puno niže doze lijeka od onih koje su se upotrebljavale, zbog čega je otvorena mogućnost ponovne primjene nižih doza perheksilina kod ishemijske bolesti srca (74).

### 1.3.4. Inhibiranje mitohondrijske $\beta$ - oksidacije masnih kiselina

#### 1.3.4.1. *Ranolazin*

Ranolazin je antianginalni lijek odobren u SAD-u za liječenje stabilne angine pektoris (75). Pokazano je kako lijek inhibira  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina u štakorskom srčanom i skeletnom mišiću, što je praćeno razmjernim porastom oksidacije glukoze (povezano s indirektnom aktivacijom PDH) (76, 77). Iako nema izravnih dokaza o mehanizmu djelovanja kod ljudi, kliničke studije su pokazale kako ranolazin značajno smanjuje razinu HbA1c proteina (78), što bi govorilo u prilog povećanom iskorištavanju glukoze. Također, ranolazin sudjeluje u očuvanju mitohondrijske strukture, smanjuje nepovoljni unutarstanični omjer kalcija te smanjuje učestalost reperfuzijske ventrikularne fibrilacije (79). Ranolazin smanjuje konačnu veličinu infarkta nakon akutnog koronarnog sindroma (80). Slično kao i mehanizam djelovanja TMZ, smanjenje oksidacije masnih kiselina i prateće povećanje oksidacije ugljikohidrata dovodi do proizvodnje veće količine ATP-a za istu količinu utrošenog kisika. Dodatno, štedi se proizvedena energija koja bi se utrošila za ispravljanje unutarstaničnog ionskog nesklada. Također, pokazano je kako povoljan učinak na srce nastao primjenom ranolazina nije jedino vezan za moduliranje izbora supstrata u metabolizmu, već i za druge alternativne mehanizme djelovanja, poput inhibiranja kasne struje natrija u stanici i prevencije nepovoljnog unutarstaničnog porasta razine kalcija (81, 82).

#### 1.3.4.2. *Trimetazidin*

Trimetazidin [1-(2,3,4-trimetoksibenzil)-piperazin dihidroklorid] je antiishemijski srčani metabolički modulator (55) koji ima antianginalni učinak usporediv s propranololom. Srčana frekvencija, umnožak frekvencije i tlaka u mirovanju, kao i na vrhuncu tjelovježbe, ostaju nepromijenjeni uz korištenje lijeka, stoga TMZ ima povoljan hemodinamski antiishemijski učinak (83, 84).

Lijek je proizvela francuska farmaceutska tvrtka *Servier* te je u kliničkoj upotrebi od 1965. Trimetazidin je isprva bio namijenjen za liječenje vrtoglavice i tinitusa, no naknadno se ustanovio i njegov antianginalni učinak. Lijek je trenutno u upotrebi u Europi i više od 90

zemalja širom svijeta (85). Unatoč relativno dugoj primjeni i danas je dosta proturječnosti oko njegove kliničke učinkovitosti (zbog čega TMZ još nije odobrila američka Agencija za hranu i lijekove, engl. *the Food and Drug Administration*, FDA) i mehanizma djelovanja. S obzirom na trajanje kliničke primjene lijeka u antianginalne svrhe, malo je objavljenih kliničkih studija koje su potvrdile povoljne klinički mjerljive učinke.

### **Studije o kliničkoj učinkovitosti**

Prva klinička randomizirana studija - „*Combination treatment in stabile effort angina using trimetazidine and metoprolol: results od a randomized, double, blind, multicentre study (TRIMPOL II). TRIMetazidine in POLand.*”, provedena na 426 pacijenta je pokazala kako dodatak TMZ metoprololu kroz 12 tjedana značajno poboljšava toleranciju napora i smanjuje kliničke simptome bez negativnog utjecaja na hemodinamiku (86).

Dvostruko slijepa, randomizirana, placebo-kontrolirana studija – Sellier i sur. na uzorku od 223 pacijenta je pokazala kako dodatak TMZ atenololu kroz 8 tjedana značajno poboljšava pokazatelje podnošenja napora, ukupno trajanje tjelovježbe tijekom ergometrije, ukupan srčani rad i subjektivno stanje pacijenta (87).

Najveća randomizirana, placebo kontrolirana, dvostruko slijepa studija – „*Efficacy of trimetazidine on functional capacity in symptomatic patients with stabile exertional angina – the VASCO-angina study*”, provedena na 1962 pacijenta, je testirala učinak TMZ u usporedbi s placebom kod simptomatskih i asimptomatskih bolesnika s ishemijskom bolesti srca. Analizirajući ove dvije skupine, istraživači nisu pronašli učinak primjene lijeka na ergometrijske pokazatelje kao niti poboljšanje bolesnikova subjektivnog stanja. No, analizirajući podgrupu simptomatskih bolesnika (n=1574), *post hoc* analiza je pokazala kako primjena TMZ značajno produljuje trajanje tjelovježbe i odgađa pojavu anginalnih smetnji tijekom opterećenja (88).

Nekoliko manjih kliničkih studija je pokazalo učinkovitost TMZ u stanjima angine pectoris, akutnog infarkta miokarda te srčanog zatajenja. Klinički mjerljiv antiishemijski učinak TMZ uključuje produženo vrijeme do trenutka snižavanja ST spojnice u EKG do vrijednosti od 1 mm tijekom ergometrije uz smanjenje učestalosti korištenja kratkodjelujućih nitrata (49). U stanjima akutnog infarkta miokarda, kardioprotektivnost TMZ se očituje u



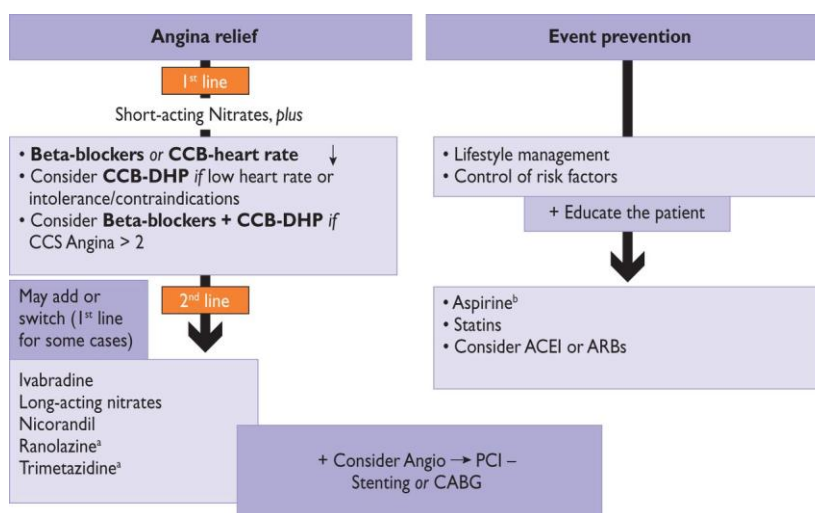
smanjenju broja reperfuzijskih aritmija i bržem povratu ST elevacije (89, 90). Dodatak TMZ standardnoj terapiji poboljšava NYHA klasu, dijastolički volumen lijevog ventrikula (LV, eng. *left venticle*) i ejekcijsku frakciju u oboljelih od srčanog zatajenja i ishemijske kardiomiopatije (91, 92), kao i u stanju idiopatske dilatativne kardiomiopatije (55). Trimetazidin pridodan  $\beta$ -blokatorima smanjuje naporom potaknutu ishemiju srčanog mišića. Kod dijabetičara, primjena TMZ je poboljšala status glikemije i razinu HbA1c proteina uz povećanje preuzimanja glukoze iz krvi (93).

### **Farmakodinamika i farmakokinetika lijeka**

Trimetazidin je povoljnog farmakodinamskog i farmakokinetičkog profila. Nakon *per os* aplikacije, lijek se brzo apsorbira, postičući vršnu plamatsku koncentraciju nakon dva sata (primjenom 20 mg lijeka maksimalna koncentracija u plazmi je oko 55  $\mu\text{g/l}$ ). Vrijeme postizanja stabilne plazmatske koncentracije lijeka nakon višestrukog uzimanja je između 24-36 sati te je koncentracija stabilna tijekom vremena korištenja TMZ. Volumen distribucije iznosi 4,8 l/kg uz podjednaku raspodjelu u svim organima. Afinitet vezanja za plazmatske proteine je slab, 16% u *in vitro* uvjetima. Glavnina lijeka se odstranjuje bubrežnim izlučivanjem, dok se ostatak izluči jetrom. Poluvrijeme odstranjivanja iznosi šest sati (94). Nuspojave TMZ su dispepsija, mučnina, glavobolja i poremećaji pokreta (95). Lijek je kontraindiciran kod bolesnika oboljelih od Parkinsonove bolesti i diskinezija te kod značajnog oštećenja bubrežne funkcije.

### **Kliničke indikacije primjene trimetazidina**

Prema smjernicama liječenja stabilne angine pektoris Europskog kardiološkog društva (ESC) iz 2013., (95) lijekovi koji smanjuju srčanu frekvenciju poput  $\beta$ -blokatora su prva terapijska linija. Dihidropiridinski blokatori kalcijevih kanala, dugodjelujući nitrati, nikorandil i metabolički agenti poput TMZ ili ranolazina se preporučuju koristiti kao druga linija terapije: zasebno kod nepodnošenja terapije prve linije lijekova ili kao njihova dopuna (slika 2).



**Slika 2.** Preuzeto iz smjernica za liječenje angine pektoris Europskog kardiološkog društva iz 2013. (95)

Prema ESC smjernicama, TMZ je svrstan u IIB klasu preporuke, što označava da dokazi o korisnosti/učinkovitosti lijeka nisu čvrsto etablirani, no dozvoljeno ga je primjenjivati u kliničkoj praksi. Razina dokaza B označava da su podaci na kojima se temelji učinkovitost lijeka prikupljeni iz pojedinačnih randomiziranih kliničkih studija ili većih nerandomiziranih studija (95).

### Mehanizam djelovanja trimetazidina

Najviše proturječnosti oko TMZ potaknulo je pitanje mehanizma djelovanja lijeka. Prema široko prihvaćenom mišljenju u medicinskoj zajednici, TMZ je metabolički modulator koji kompetitivno inhibira 3-KAT enzim  $\beta$ -oksidacije (53, 96). Smanjivanjem oksidacije masnih kiselina nastaje razmjerno povećanje oksidacije ugljikohidrata (9, 96). Izbor učinkovitijeg metaboličkog puta proizvodnje energije u stanju ograničene dostupnosti kisika pridonosi boljem podnošenju hipoksičnih/ishemičnih uvjeta. Također, pratećim smanjenjem proizvoda anaerobnog puta metabolizma glukoze smanjuje se unutarstanična proizvodnja vodikovih iona nastala zbog neusklađenosti glikolize i glukozne oksidacije.

Prvo istraživanje koje je potaknulo razvoj teorije o metaboličkom učinku TMZ je ono Fantinija i sur. (97) iz 1994., u kojemu je primijećeno kako tijekom hipoksije srčanog mišića

TMZ smanjuje oksidaciju palmitoilkarnitina. Inhibitorni učinak TMZ na oksidaciju masnih kiselina je dalje potvrđen u studijama o ishemiji/reperfuziji na izoliranom štakorskom srcu; ishemijom izazvan porast razine acil karnitina (pokazatelj stupnja  $\beta$ -oksidacije) je bio značajno manji uz dodatak TMZ, uz povoljniju unutarstaničnu razinu pH tijekom ishemije (98). Također, koristeći drugi model - podvezivanje lijeve prednje silazne koronarne arterije (engl. *left anterior descending coronary artery*, LAD) na psećem srcu, Mody i sur. su pokazali kako primjena TMZ povećava iskorištavanje glukoze, što je bilo mjereno pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) (99). Moguć izravni učinak na CPT1 je isključen u istraživanju Kennedyja i Horowitza, zbog slabe inhibicije enzima trimetazidinom (100).

Najčvršći dokaz mehanizma djelovanja TMZ je iznio Kantor i sur. u istraživanju na izoliranom štakorskom srcu, u kojem je pokazao kako primjena TMZ smanjuje srčanu oksidaciju masnih kiselina, što je bilo praćeno značajnim smanjenjem aktivnosti dugolančane izoforme 3-KAT enzima mitohondrijske  $\beta$ -oksidacije (96). Nedugo nakon objavljivanja tog istraživanja, skupina autora predvođena MacInnesom iznosi negativnu studiju u kojoj autori nisu uspjeli pronaći inhibitorni učinak TMZ na 3-KAT u štakorskim mitohondrijima, kao niti inhibiciju bilo koje enzimske sastavnice  $\beta$ -oksidacije u proteinima izoliranim iz humanih srčanim staničnim linijama (101). Objašnjenje nezamjećivanja inhibicije lijekom iznosi Lopaschuk i sur. u radu koji je uslijedio kao odgovor na MacInnesovo istraživanje. Prema toj skupini autora, u negativnoj studiji je korištena previsoka koncentracija supstrata, zbog čega se nije niti mogla zamijetiti kompetitivna inhibicija 3-KAT enzima samim lijekom (53).

Nastavila su se daljnja mehanicistička istraživanja TMZ s raznolikim, ponekad i suprotnim rezultatima o promjeni različitih staničnih funkcija. Tako je istraživanje Saeedi i sur. pokazalo da primjena TMZ smanjuje glikolizu te uzrokuje vrlo male promjene oksidativnog metabolizma (102). Drugo je istraživanje pokazalo kako primjena jedne doze TMZ uzrokuje povećanje preuzimanja radioaktivno obilježene glukoze u štakorskom mozgu (103). Dodatak TMZ perfuzatu prije ishemije je značajno smanjilo neutrofilima izazvanu srčanu reperfuzijsku ozljedu (104). Moguć učinak lijeka na moduliranje otvaranja mitohondrijske permeabilizacijsko-tranzicijske pore (mPTP) je istražio Arguad i sur. (105). Pokazali su kako korištenje TMZ na zečjem modelu smanjuje otvaranje mPTP, smanjuje konačnu površinu infarktne zone, uz niže biljege apoptoze nakon ishemije/reperfuzije. Nekoliko je istraživanja pratilo promjene u ionskoj neravnoteži u raznim stanjima srca te utjecaj TMZ na njih. Tako je pokazano da TMZ smanjuje patološki stupanj unutarstanične

acidoze te poremećaje u koncentraciji natrija i kalcija tijekom ishemije i naknadne reperfuzije, zbog čega se poboljšava oporavak postishemične srčane funkcije (106-108). TMZ također utječe na reguliranje koncentracije staničnog kalcija djelovanjem na aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aze sarkoplazmatskog retikula (109), čime se smanjuje potreba za ATP-om u ispravljanju neravnoteže kalcija nakon ishemije. U nedavno objavljenoj studiji, Zhanga i sur. su pokazali kako rana primjena TMZ usporava razvoj dijabetičke kardiomiopatije (životinjski model, štakor) ublažavanjem fibroze, snižavanjem apoptoze te poticanjem autofagije (110).

Raznolikost mogućih ciljeva na koje TMZ djeluje ukazuje na potrebu za nastavkom istraživanja zbog razumijevanja točnog mehanizma djelovanja lijeka.

### **1.3.5. Poticanje oksidacije glukoze**

Za razliku od neizravnog poticanja glukoze oksidacije TMZ i ranolazinom, dikloroacetat potiče aktivnost mitohondrijske PDH izravnom inhibicijom kinazne aktivnosti (12). Iako su kliničke studije s primjenom dikloroacetata malobrojne, pokazano je da primjena lijeka povisuje udarni volumen lijevog ventrikula, poboljšava srčanu učinkovitost i povećava iskorištavanje laktata (111).

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Hipoteza postavljena na početku istraživanja provedenog u svrhu ove doktorske disertacije glasi: *Trimetazidin, primijenjen akutno ili kronično, inhibira mitohondrijsku oksidaciju masnih kiselina, što je praćeno razmjernim povećanjem oksidacije ugljikohidrata u srčanom tkivu pacijenata oboljelih od ishemijske bolesti srca i pratećim promjenama u ekspresiji proteina koji sudjeluju u navedenim procesima.*

U svrhu uspješnog testiranja postavljene hipoteze, istraživanje provedeno u sklopu predložene doktorske disertacije je podijeljeno u dva cilja:

Cilj 1: Ispitivanje učinka kronične terapije TMZ (*in vivo*) na metabolizam mitohondrijskih supstrata.

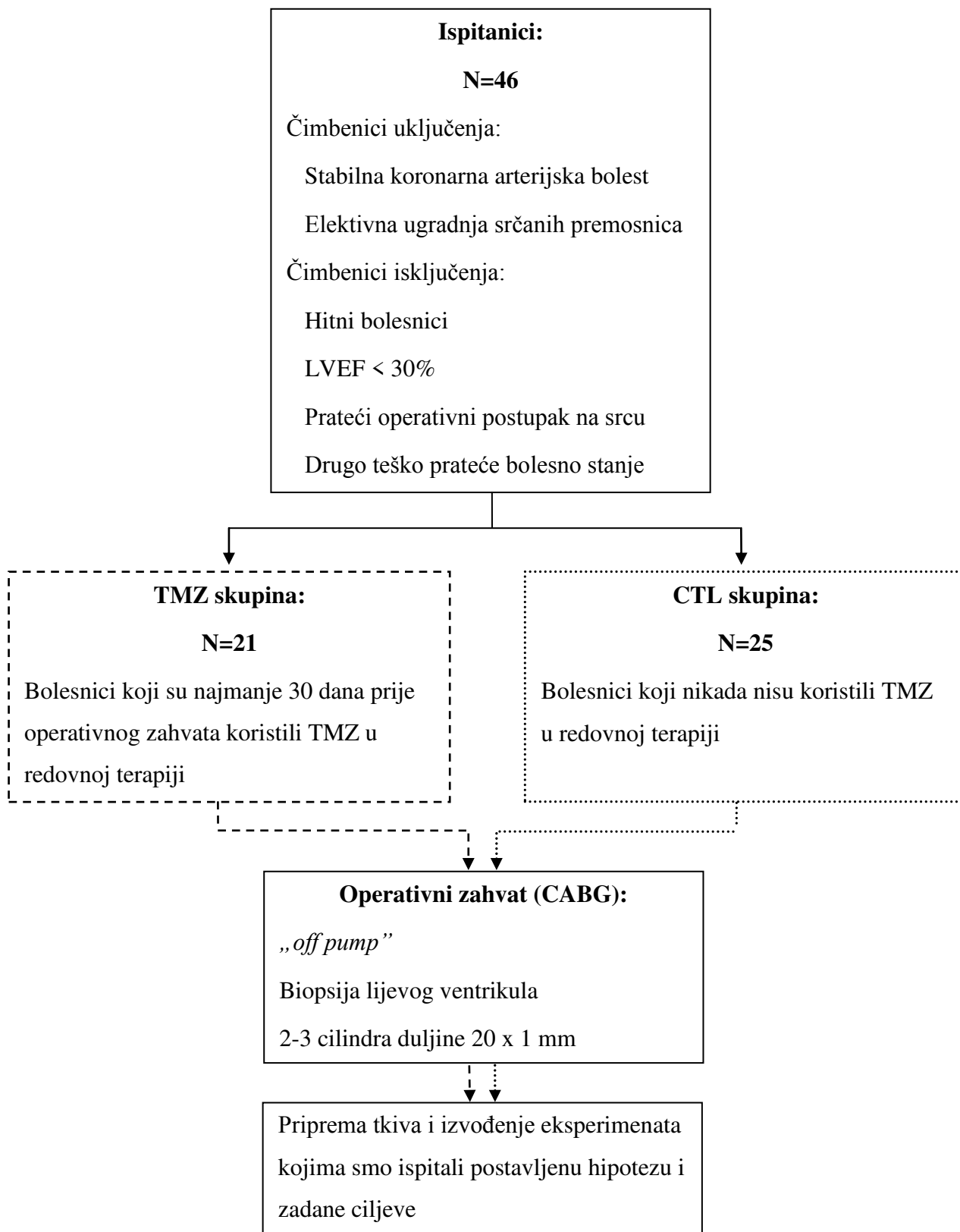
- a. Izravno mjerenje mitohondrijskog korištenja masnih kiselina i ugljikohidrata u biopsijskim uzorcima lijevog ventikula bolesnika koji su u kroničnoj terapiji koristili TMZ te usporedba s bolesnicima koji ga nisu koristili
- b. Ispitivanje ekspresije i aktivnosti ključnih enzima mitohondrijske oksidacije supstrata
- c. Ispitivanje ekspresije važnih mitohondrijskih funkcionalnih proteina

Cilj 2: Ispitivanje akutnog učinka TMZ primijenjenog *in vitro* na oksidaciju mitohondrijskih supstrata.

- a. Izravno mjerenje mitohondrijskog korištenja masnih kiselina u srčanom tkivu sa i bez *in vitro* primijenjenog TMZ
- b. Izravno mjerenje mitohondrijskog metabolizma masnih kiselina uz *in vitro* primjenu različitih doza TMZ
- c. Izravno mjerenje metabolizma masnih kiselina sa ili bez *in vitro* dodatka TMZ, uz primjenu različitih koncentracija masnih kiselina

### 3. ISPITANICI I POSTUPCI

#### 3.1. Dizajn studije:



### 3.2. Ispitanici

U studiju su uključeni bolesnici oboljeli od ishemijske bolesti srca planirani za operativno liječenje ugradnjom srčanih prenosnica (engl. *coronary artery bypass grafting*, CABG) u Kliničkom bolničkom centru Split. Hitni bolesnici, bolesnici čija je sistolička ejectiveska frakcija bila niža od 30%, bolesnici kojima se u istoj operaciji planirala izvesti i zamjena srčanih zalistaka te bolesnici s ozbiljnim bubrežnim, jetrenim ili plućnim bolestima su bili isključeni iz studije. Bolesnici s kriterijima uključenja i bez kriterija isključenja koji su pristali na sudjelovanje u istraživanju potpisavši informirani pristanak, su bili uključeni u daljnji postupak. Ovisno o korištenju terapije TMZ prije operacije, bolesnici su svrstani u dvije skupine:

- a. Trimetazidinska skupina – bolesnici koji su najmanje 30 dana prije operacije imali uključen TMZ u redovnu medikamentnu terapiju (2x35mg), (95).
- b. Kontrolna skupina (CTL) – bolesnici koji nikada nisu bili izloženi lijeku prije operativnog zahvata.

### 3.3. Kirurški postupak uzimanja biopsije lijevog ventrikula

Operativni zahvat se izveo na Odjelu za kardiokirurgiju Kliničkog bolničkog centra Split, čije je Etičko povjerenstvo izdalo dozvolu i Odobrenje za provođenje ove studije. Na kraju operativnog zahvata premoštenja koronarnih arterija venskim ili arterijskim *graftom*, izvedenoga bez korištenja kardiopulmonalnog premoštenja i kardioplegije (engl., *off pump*”), kirurg je standardnom biopsijskom iglom uzeo dva do tri cilindrična biopsijska uzorka iz anteroseptalnog dijela lijevog ventrikula (prosječna duljina biopsijskog cilindra je iznosila 20x1 mm). Uzorak tkiva je zatim uronjen u prethodno pripremljenu hladnu (4 °C) prezervacijsku otopinu (*Otopina S*, izraženo u mmol/l: 2.77 CaK<sub>2</sub>EGTA, 7.23 K<sub>2</sub>EGTA, 6.56 MgCl<sub>2</sub>, 5.7 Na<sub>2</sub>ATP, 15 fosfokreatin, 20 imidazol, 20 taurin, 0.5 ditiotreitol, 50 K-metanesulfonat, pH 7.1 pri 0 °C; slobodan Ca<sup>2+</sup> 100 nmol/l) u kojoj se uzorak na ledu premjestio u laboratorij kroz 15 minuta. Dostavljeni biopsijski uzorci su se dalje obradili u Laboratoriju za staničnu fiziologiju Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Jedan dio tkiva smo odmah zamrznuli u tekućem dušiku i kasnije koristili za mjerenje enzimske aktivnosti i ekspresije proteina, dok se ostatak koristio za mjerenja mitohondrijske respiracije. Postupak uzimanja biopsije je izveden od strane iskusnog kirurga

koji je imao iskustva s navedenim postupkom, pri čemu je rizik komplikacija za bolesnika bio malen. Navedeni postupak se izvodi i u drugim centrima te je siguran za bolesnika (112-114). Bolesnici su bili obaviješteni o cijelom postupku tijekom predoperativnog razgovora i potpisivanja informiranog pristanka.

### **3.4. Eksperimentalne procedure za mjerenje mitohondrijske oksidacije supstrata**

#### **3.4.1. Priprema tkiva za mjerenje mitohondrijske respiracije**

Dobivene biopsijske uzorke smo uz pomoć lupe disecirali na ledu u *Otopini S*. Tako pripremljene smo ih premjestili u otopinu koja je sadržavala detergent *saponin* (50 µg/ml) i permeabilizirali tijekom 30 minuta na 4 °C (115). Uslijedilo je desetominutno ispiranje tkiva od *saponina* u *Otopini S*. Deset minuta prije respiracijskih mjerenja, tkivo smo premjestili u respiracijsku otopinu (*Otopina R*, izraženo u mmol/l: 2.77 CaK<sub>2</sub>EGTA, 7.23 K<sub>2</sub>EGTA, 1.38 MgCl<sub>2</sub>, 3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 imidazol, 20 taurin, 0.5 ditiotreitol, 90 K-metanesulfonat, 10 Na-metanesulfonat, 0.2% albumin goveđeg seruma, pH 7.1; 100 nmol/l slobodnog Ca<sup>2+</sup>, 1 mmol/l slobodnog Mg<sup>2+</sup>), nakon čega je smješteno u 2-mililitarsku respiracijsku komoricu ispunjenju istom otopinom s ciljem mjerenja mitohondrijske oksidacije supstrata.

#### **3.4.2. Mjerenje potrošnje kisika u mitohondrijima**

Potrošnja kisika u mitohondrijima, kao mjera mitohondrijske oksidacije pojedinih supstrata, odnosno intenziteta metabolizma pojedinog metaboličkog puta, se mjerila na 30 °C koristeći „Clarkovu elektrodu” (Oxygraph, Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Oksidacija masnih kiselina u pripremljenim biopsijskim uzorcima je mjerena u prisutnosti palmitoilkarnitina kao glavnog supstrata (40 µmol/l uz dodatak 5 mmol/l malata), dok je oksidacija ugljikohidrata mjerena opskrbljujući mitohondrije piruvatom (10 mmol/l) i malatom (5 mmol/l). Tkivnu potrošnju kisika smo mjerili u prisutnosti samo supstrata (Faza 2 respiracije) te nakon dodavanja 2.5 mmol/l adenzin difosfata (ADP), u svrhu poticanja tzv. Faze 3 respiracije. Dodavanjem u sustav trifluorokarbonilcianid fenilhidrazona (FCCP, 1



$\mu\text{mol/l}$ ), razdvojena je mitohondrijska potrošnja kisika od proizvodnje ATP-a, čime su se otklonila moguća ograničenja od strane fosforilirajućeg aparata u prethodno napravljenim mjerenjima (Uvod – 1.1.3.). Mitohondrijski omjer respiratorne kontrole (engl. *respiratory control ratio*, RCR), pokazatelj sprege između fosforilacije ADP-a i potrošnje kisika, se izračunao za svaki pojedini metabolički supstrat kao omjer Faze 3/Faza 2 respiracije. Razina dostupnog kisika tijekom cijelog protokola snimanja održavala se iznad  $210 \mu\text{mol/l}$ , kako bi se u vlaknima izbjeglo difuzijsko ograničenje kisikom (116). Količina potrošnje kisika u vlaknima je izražena u  $\text{pmolO}_2/\text{s/ miligramu vlažnog tkiva}$ . S obzirom na moguće razlike u sadržaju mitohondrija u biopsijskim uzorcima (ponekad moguće i u srcu istog bolesnika), oksidacija različitih metaboličkih supstrata je izračunata u odnosu na maksimum mitohondrijske respiracije ( $R_{\text{max}}$ ), koja se postigla dodavanjem u sustav i ugljikohidrata i masne kiseline, uz prisutan glutamat ( $10 \text{ mmol/l}$ ) i sukcinat ( $15 \text{ mmol/l}$ ).

### 3.4.3. Mjerenje aktivnosti citrat sintaze

Prethodno zamrznuto tkivo smo homogenizirali uz pomoć tkivnog homogenizatora, volumena  $0.2 \text{ ml}$  (*Micro tissue grinder*, Wheaton, Millville, NJ, USA) u hladnoj otopini fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffer saline*, PBS), uz dodatak proteaznih inhibitora (P8340, Sigma-Aldrich).

Proteine smo izdvojili koristeći  $15\%$  detergentsku otopinu *Lauril maltozida* (ab109858, Abcam, Cambridge, UK), a njihovu koncentraciju smo odredili proteinskim testom po *Lowry*-u (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Aktivnost citrat sintaze smo mjerili pomoću komercijalno dostupnog seta (CS0720, Sigma-Aldrich) pri temperaturi od  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , u reakcijskoj otopini koja je sadržavala  $15 \mu\text{g}$  tkivnih proteina. Dodavanjem  $10 \text{ mmol/l}$  oksaloctene kiseline aktivirao se enzim, nakon čega smo apsorbanciju mjerili spektrofotometrom na  $412 \text{ nm}$  (DU 800, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Nakon oduzimanja pozadinske apsorbancije, enzimsku aktivnost smo izračunali koristeći ekstincijski koeficijent ( $13.6 \text{ (mmol/l/cm)}$ ) te dobivenu vrijednost izrazili u međunarodnim jedinicama (engl. *International Units*, U) aktivnosti citrat sintaze po miligramu tkivnih proteina (U/mg).

#### 3.4.4. Mjerenje aktivnosti piruvat dehidrogenaze

Tkivo lijevog ventrikula smo homogenizirali u PBS-u koristeći tkivni homogenizator uz dodatak koktela proteaznih inhibitora (P8340), 20 mmol/l natrijeva fluorida (fosfatazni inhibitor) i 1% apiraze (sustav za uklanjanje ATP-a, 400 U/ml) u omjeru težine prema volumenu 1/10. Nakon homogenizacije i proteinske ekstrakcije za mjerenje aktivnosti piruvat dehidrogenaze smo koristili komercijalno dostupni set (AAMT008-1KIT, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany). Apsorbancija otopine s dodatkom 40 µg proteina se mjerila na 450 nm koristeći mikročitač (EL808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) pri temperaturi od 30 °C. Endogenu aktivnost piruvat dehidrogenaze smo izrazili kao mjeru promjene apsorbancije (mOD/min/mg proteina), također nakon oduzimanja pozadinskog signala.

#### 3.4.5. Mjerenje ekspresije proteina (*Western blot*)

Smrznuto tkivo lijevog ventrikula smo homogenizirali uz pomoć tkivnog homogenizatora u modificiranom *RIPA* puferu (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*), uz dodatak proteaznih i fosfataznih inhibitora. Proteini homogenata lijevog ventrikula su zatim razdvojeni na 10% SDS-PAGE gelu (engl. *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*). Nakon elektroforeze proteina i transfera, nitroceluloznu membranu smo inkubirali s mješavinom protutijela na četiri podjedinice piruvat dehidrogenaze (ab110416, Abcam, Cambridge, UK) i mješavinom protutijela na strukturne komponente pet mitohondrijskih respiratornih kompleksa (Mitoprofile Total OXPHOS antibody cocktail MS601, MitoSciences, Eugene, OR, USA). Nakon inkubacije s odgovarajućim sekundarnim protutijelom i supstratom za kemiluminiscenciju (Supersignal West Pico, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, SAD) vizualizirali smo i snimili specifičan signal koristeći Chemidoc slikovni sustav (Bio-Rad). Za kontrolu kvalitete postupka smo koristili β-aktin („kontrola punjenja”). Analizom gustoće pojedinih signala na dobivenim snimkama smo usporedili TMZ s CTL skupinom (normalizirano prema uzorku standarda i kontroli punjenja) koristeći Image Lab 3.0 software.

### 3.4.6. Statistički postupci

Koristeći dostupne statističke alate, izračunali smo kako će uz snagu istraživanja od 80%,  $\alpha=0.05$  i  $\beta=0.2$ , uzorak od 21 ispitanika po grupi omogućiti otkrivanje 15% razlike u intenzitetu metabolizma masnih kiselina, koju smo odredili pretraživanjem dostupne literature (117). *Pearsonov hi-kvadrat* test smo koristili za uspoređivanje kategorijskih varijabli (dob, spol, korištenje lijekova, komorbiditeti) između trimetazidinske i kontrolne skupine bolesnika. Nezavisni *Studentov t-test* smo koristili za uspoređivanje metričkih vrijednosti razine metabolizma između TMZ i CTL skupine bolesnika, dok smo zavisni *Studentov t-test* koristili za uspoređivanje razlika u metričkim varijablama unutar iste skupine bolesnika u mjerenju sa i bez *in vitro* primijenjenog trimetazidina. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom. Za statističku analizu smo koristili aplikaciju *Statistica 8.0* uz vrijednost  $P<0.05$  kao granicu statističke značajnosti.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Opća zapažanja

Anamnestički i klinički podaci sakupljeni prije operativnog zahvata (CABG) se nisu značajnije razlikovali između CTL i TMZ skupine (Tablica 1). Svim bolesnicima koji su bili uključeni u studiju je uspješno izveden operativni zahvat bez komplikacija povezanih s biopsijom lijevog ventrikula.

Tablica 1. Anamnestički i klinički podaci bolesnika

	CTL (n=25)	TMZ (n=21)	P-vrijednost
Ženski spol; n (%)	5 (20)	5 (24)	0.76
Dob; prosjek ± SD	66 ± 8.2	67 ± 6.6	0.73
Euroscore II; prosjek ±SD	2.71 ± 2.1	2.53 ± 1.7	0.76
LV EF >50%; n (%)	22 (88)	18 (86)	0.82
LAD okluzija >70 %; n (%)	19 (76)	16 (76)	0.74
Broj tjednih anginalnih napada; prosjek ±SD	2.3 ± 0.9	2.1 ± 1.1	0.67
Tjedno korištenje NTG; prosjek ±SD	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.6	0.75
<i>Komorbiditet; n (%)</i>			
Prethodni akutni koronarni sindrom	13 (52)	11 (52)	0.98
Angina pektoris	7 (28)	7 (33)	0.70
Prethodni infarkt miokarda	5 (20)	5 (24)	0.76
Hipertenzija	16 (64)	12 (57)	0.64
Bolest perifernih arterija	1 (4)	4 (19)	0.10
Šećerna bolest	6 (24)	7 (33)	0.71
KOPB	2 (8)	1 (5)	0.66

<b>Medikamentna terapija; n (%)</b>			
<b>Statini</b>	17 (68)	18 (86)	0.16
<b>Antagonisti kalcijevih kanala</b>	4 (16)	2 (10)	0.52
<b>Beta blokatori</b>	19 (76)	16 (76)	0.99
<b>ACE/ATII inhibitori</b>	16 (64)	12 (57)	0.64
<b>Diuretici</b>	11 (44)	6 (29)	0.28
<b>Acetilsalicilna kiselina</b>	22 (88)	18 (86)	0.82
<b>Klopidogrel</b>	14 (56)	11 (52)	0.81
<b>Organski nitrati</b>	7 (28)	4 (19)	0.48
<b>Metformin</b>	4 (16)	4 (19)	0.91
<b>Sulfonilurea</b>	4 (16)	1 (5)	0.22
<b>Inzulin</b>	2 (8)	2 (10)	0.86
<b>LWMH</b>	5 (20)	6 (29)	0.50
<b>Omega-3 masne kiseline</b>	4 (16)	5 (24)	0.51
<b>Biokemijski čimbenici; prosjek ± SD</b>			
<b>Preoperativni troponin C (ng/ml)</b>	1.16 ± 3.63	0.04 ± 0.05	0.21
<b>Postoperativni troponin C<sup>a</sup> (ng/ml)</b>	3.44 ± 5.65	1.04 ± 0.87	0.09
<b>HbA1c</b>	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.12	0.35
<b>CK-MB (U/l)</b>	9.62 ± 11.12	9.81 ± 4.82	0.95

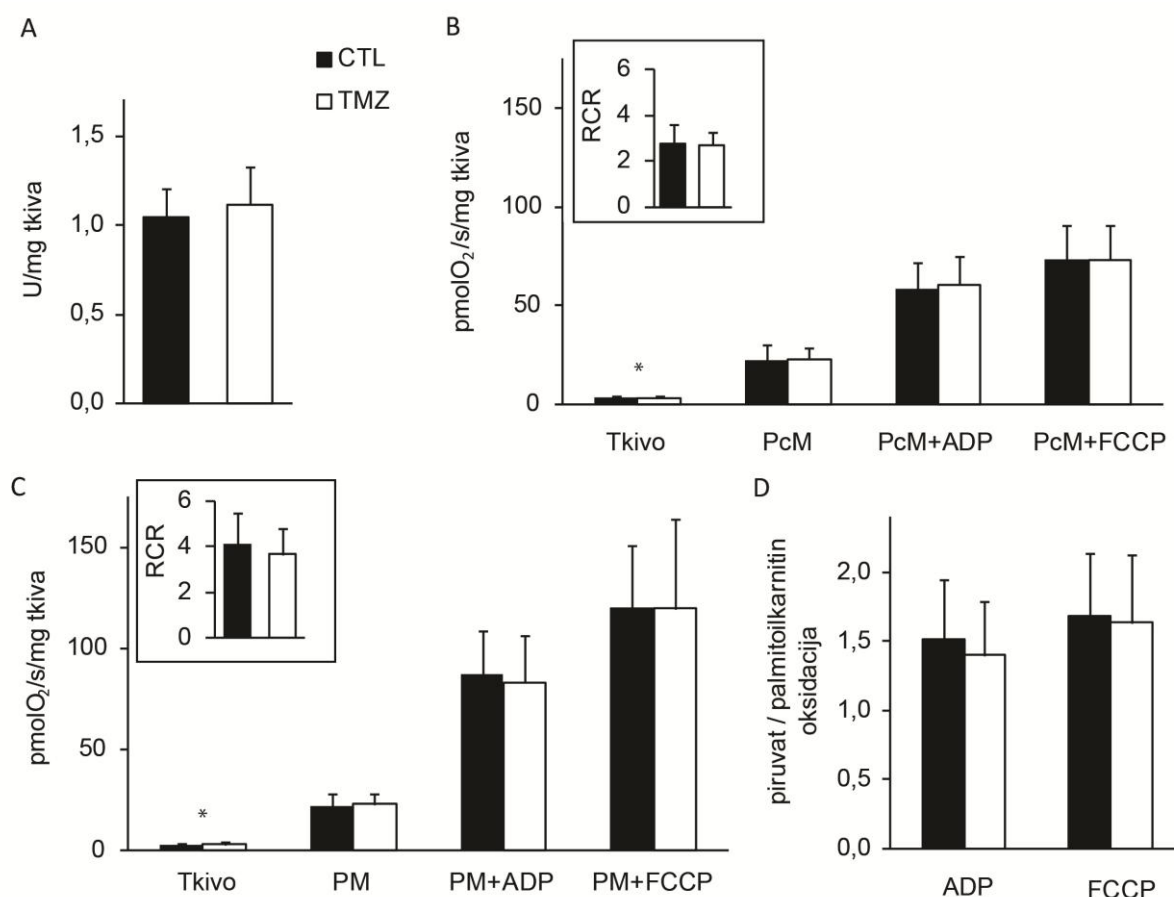
<sup>a</sup> Mjereno 24 sata nakon završetka operacije.

Vrijednosti su izražene kao n (%); prosjek ± SD.

CTL = kontrolna skupina bolesnika koji nisu nikada bili izloženi trimetazidinu; TMZ = bolesnici koji su koristili trimetazidin u redovnoj terapiji; LV EF = ežekcijska frakcija lijevog ventrikula; LAD okluzija = postotak okluzije lumena prednje lijeve silazne grane koronarne arterije; NTG = nitroglicerina; KOPB = kronična opstruktivna bolest pluća; ACE = angiotenzin konvertirajući enzim; ATII = angiotenzin II receptor; LWMH = niskomolekularni heparin (engl. *low molecular weight heparin*); HbA1c = glikozilirani hemoglobin; CK-MB = MB tip kreatin kinaze.

#### 4.2. Utjecaj kronične terapije trimetazidinom na mitohondrijsku oksidaciju masnih kiselina i ugljikohidrata

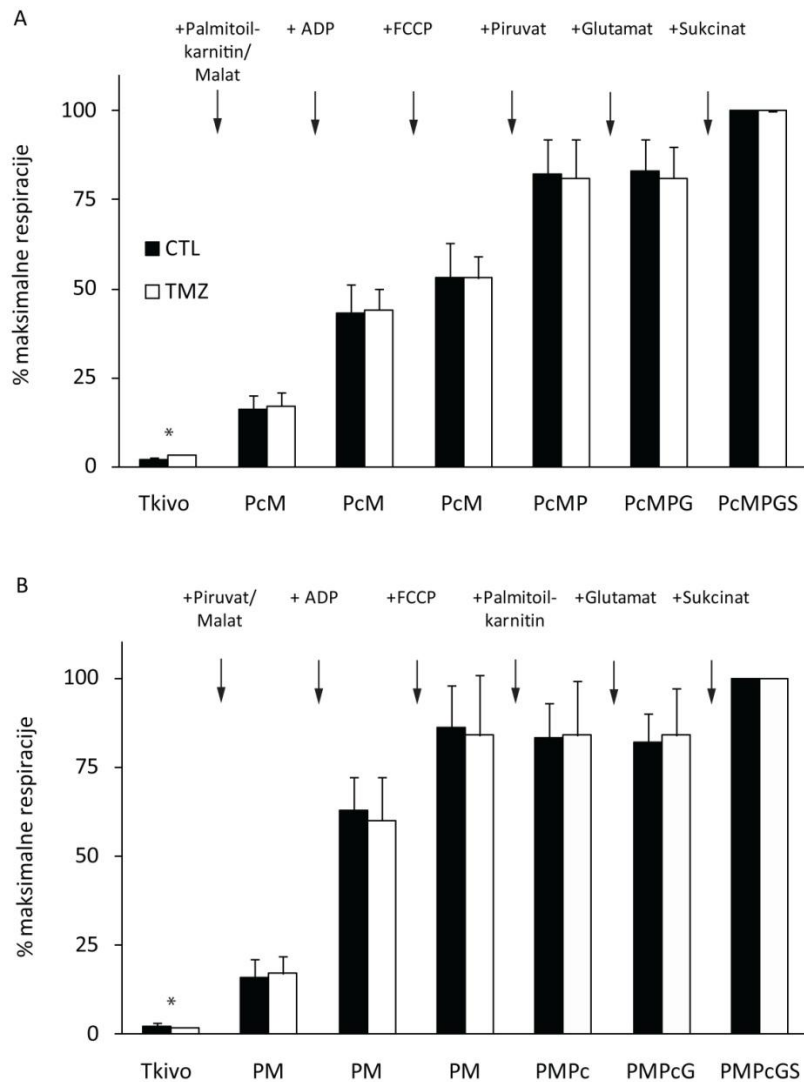
Enzimaska aktivnost citrat sintaze, pokazatelja mitohondrijskog sadržaja u tkivu, nije se razlikovala između dvije skupine bolesnika (Slika 3A). Također, izravnim mjerenjem ADP-om potaknute respiracije u lijevom ventrikulu nije zapažena značajna razlika u oksidaciji palmitoilkarnitina (40  $\mu\text{mol/l}$ ) između dvije skupine bolesnika (Slika 3B). Slično smo zapazili nakon dodavanja FCCP-a (Slika 3B). Mjerenjem oksidacije piruvata, specifičnog supstrata ugljikohidratnog metabolizma, također nismo pronašli bitnu razliku između CTL i TMZ skupine bolesnika (Slika 3C). Dodatak FCCP-a je u jednakoj mjeri povećao stupanj potrošnje kisika u obje skupine. Također, nismo pronašli razliku između skupina u vrijednostima RCR palmitoilom ili piruvatom potaknute respiracije (umetnuti dijelovi slika 3B i 3C), kao niti u omjeru oksidacije ugljikohidrata i masnih kiselina (Slika 3D).



**Slika 3.** Mitohondrijska oksidacija masnih kiselina i piruvata u bolesnika koji su u terapiji koristili trimetazidin (TMZ) i onih kontrolne skupine koji nisu bili izloženi lijeku (CTL). (A)

Aktivnost citrat sintaze, markera mitohondrijskog sadržaja. (B) Mitohondrijska respiracija samog tkiva (tkivo), u prisutnosti palmitoilkarnitina (Pc, 40  $\mu\text{mol/l}$ ) te nakon dodavanja saturirajuće količine ADP-a (2.5 mmol/l) i FCCP-a (1  $\mu\text{mol/l}$ ). (C) Mitohondrijska oksidacija piruvata, specifičnog supstrata ugljikohidratnog metabolizma. Nisu uočene razlike između bolesnika na kroničnoj terapiji trimetazidinom i kontrolne skupine. Omjer respiratorne kontrole (RCR) je prikazan u umetnutim grafikonima. (D) Omjer mitohondrijske oksidacije ugljikohidrata i masnih kiselina snimljen u jednakim eksperimentalnim uvjetima se nije razlikovao između CTL i TMZ skupine. M, malat; n=21 u TMZ skupini i n=25 u CTL skupini. \*P<0.05 u odnosu na respiraciju nakon dodatka supstrata u obje eksperimentalne skupine. U, međunarodna jedinica (engl. *International Unit*).

Stupanj oksidacije ugljikohidrata i masnih kiselina mjeren u odnosu na maksimalnu mitohondrijsku respiraciju ( $R_{\text{max}}$ , potaknutu dodavanjem obaju supstrata u sustav – masnih kiselina i ugljikohidrata, uz glutamat (10  $\mu\text{mol/l}$ ) i sukcinat (15  $\mu\text{mol/l}$ ) (116)) je prikazan na Slici 4. ADP-om potaknuta oksidacija palmitoila prikazana u odnosu na maksimalnu mitohondrijsku respiraciju, koja se dodatno povećala dodatkom FCCP-a, nije se razlikovala između CTL i TMZ skupine. Također, nije bilo značajne razlike u oksidaciji piruvata prikazano u odnosu na  $R_{\text{max}}$  (Slika 4B).

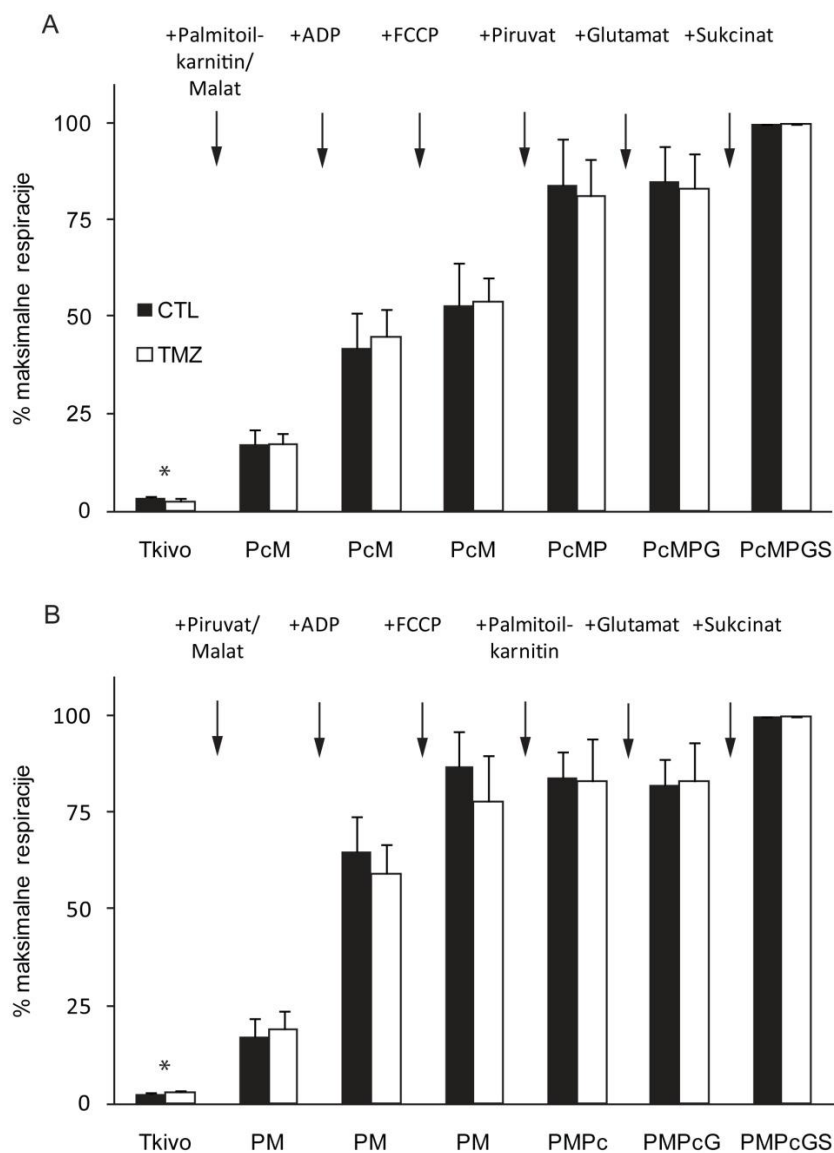


**Slika 4.** Mitohondrijska oksidacija masnih kiselina i piruvata prikazana u odnosu na maksimalnu mitohondrijsku respiraciju. Maksimalna potrošnja kisika se postigla dodajući glutamat (G) i sukcinat (S) u sustav za mjerenje oksidacije. Vrijednosti oksidacije masnih kiselina (A) i oksidacije piruvata (B) se nisu razlikovale između TMZ i CTL skupine. Strelice označavaju slijed dodavanja pojedinog supstrata tijekom protokola snimanja. M, malat; Pc, palmitoilkarnitin; P, piruvat; n=21 u TMZ skupini i N=25 u kontrolnoj skupini. \*P<0.05 u odnosu na respiraciju nakon dodatka supstrata u obje eksperimentalne skupine.

Kako su šećerna bolest i kronično srčano zatajenje čimbenici koji također mogu samostalno izmijeniti srčani stanični metabolizam (12), odvojeno smo analizirali mitohondrijsku oksidaciju supstrata kod bolesnika bez šećerne bolesti i s očuvanom



sistoličkom funkcijom (LVEF $\geq$ 50%, n=9 u TMZ skupini i n=14 u CTL skupini). Također, nismo pronašli razlike između dvije skupine bolesnika, u odnosu na korištenje TMZ (Slika 5).

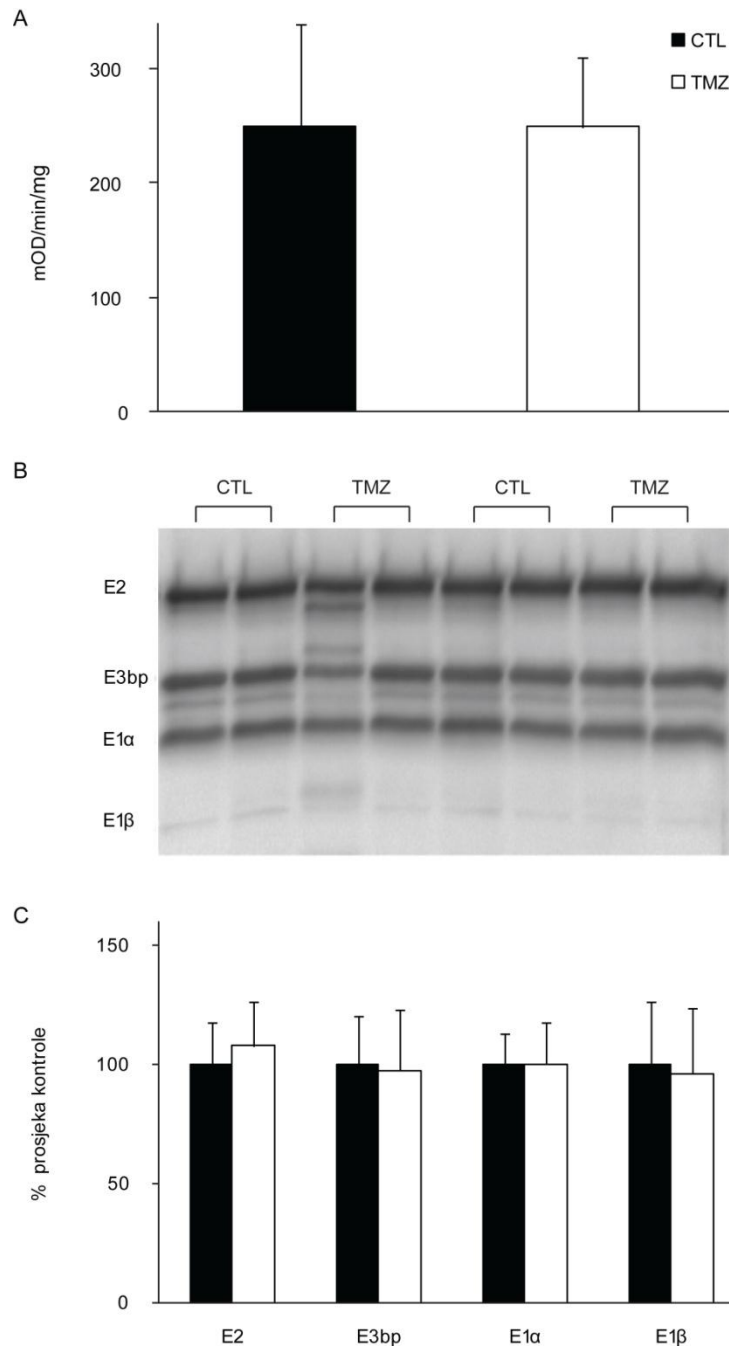


**Slika 5.** Mitohondrijska oksidacija supstrata u tkivu bolesnika očuvane srčane sistoličke funkcije koji nisu oboljeli od šećerne bolesti. Kako bismo isključili mogući učinak srčanog zatajenja i šećerne bolesti na tumačenje dobivenih rezultata, napravili smo dodatnu analizu podskupine bolesnika koji nisu oboljeli od šećerne bolesti i s ejekcijskom frakcijom lijevog ventrikula većom od 50%. (A) Mitohondrijska respiracija u samom tkivu (tkivo), u prisutnosti palmitoilkarnitina (Pc, 40  $\mu$ mol/l) te nakon dodavanja ADP-a (2.5 mmol/l) i FCCP-a (1  $\mu$ mol/l). (B) Mitohondrijska oksidacija piruvata (P). M, malat; G, glutamat; S, sukcinat; n=9 u

TMZ skupini i n=14 u CTL skupini. \*P<0.05 u odnosu na respiraciju nakon dodatka supstrata u obje eksperimentalne skupine.

#### **4.3. Učinak kronične terapije trimetazidinom na aktivnost i ekspresiju piruvat dehidrogenaze**

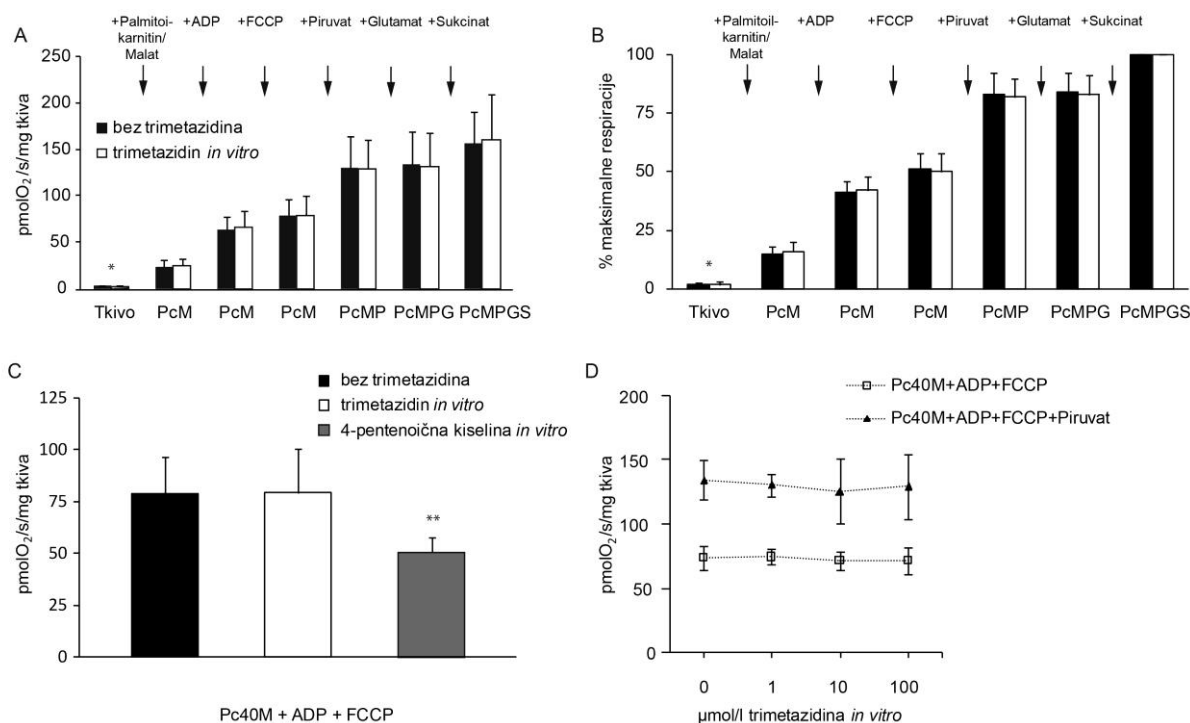
S ciljem dodatnog ispitivanja predloženog mehanizma djelovanja TMZ na srčani metabolizam, analizirali smo aktivnost PDH, ključnog enzima regulacije ugljikohidratnog metabolizma u mitohondriju. Očuvanje endogenog (prisutnog *in vivo*) stupnja fosforilacije PDH, kao glavnog pokazatelja stupnja aktivnosti enzima, smo postigli zamrzavanjem tkiva odmah nakon biopsije, uz naknadni dodatak fosforilacijskih i fosfataznih inhibitora u eksperimentalnu otopinu. U našim mjerenjima, nismo pronašli značajnu razliku u aktivnosti PDH u mišiću lijevog ventrikula između CTL i TMZ skupine bolesnika (Slika 6A). Nadalje, mjerenjem ekspresije određenih podjedinica PDH kompleksa u srčanom tkivu nismo pronašli razliku između dvije skupine (Slika 6B i 6C).



**Slika 6.** Učinak terapije TMZ na aktivnost i ekspresiju srčane piruvat dehidrogenaze (PDH). (A) Aktivnost PDH, ključnog regulatornog enzima ugljikohidratnog metabolizma je prikazana kao stupanj promjene absorbancije na 450 nm (OD) normalizirane prema tkivnoj masi. (B) Slika reprezentativnog SDS-PAGE *blota* izloženog monoklonalnom mišjem koktelu antitijela usmjerenih na E1 ( $\alpha$  i  $\beta$ ), E2 i E3 podjedinice PDH kompleksa. (C) Intenzitet kemiluminiscencije je izražen u odnosu na prosjek kontrolne grupe (nakon normalizacije prema kontroli punjenja), koja je postavljena na 100% (za svaku podjedinicu). n=21 u TMZ i n=25 u CTL skupini.

#### 4.4. Učinak akutne *in vitro* primjene trimetazidina na supstratnu oksidaciju

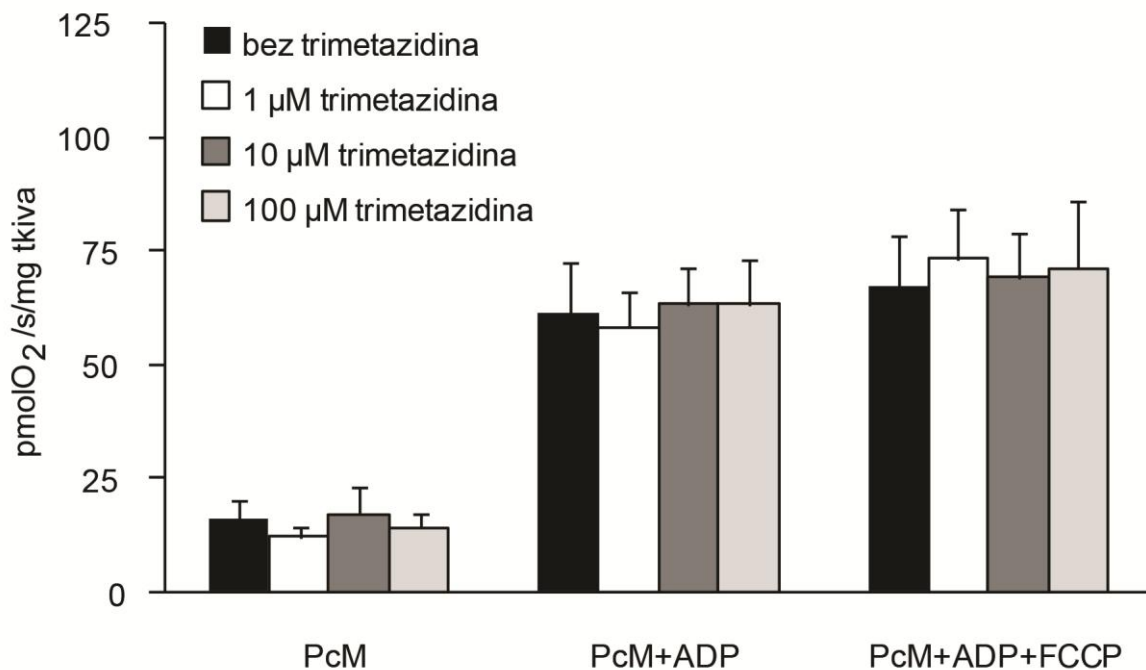
Kako bismo isključili mogućnost da je izostanak učinka lijeka u prvoj skupini eksperimenata posljedica ispiranja TMZ iz tkiva u tijeku procesa pripreme za mjerenja, napravili smo dodatna ispitivanja mitohondrijske supstratne oksidacije uz akutno, *in vitro*, izlaganje permeabiliziranih vlakana miokarda trimetazidinu. U tu smo svrhu izložili tkivo lijeku (10  $\mu\text{mol/l}$ ) trideset minuta prije mjerenja oksidacije supstrata. Kao što je prikazano na slikama 7A i 7B, nije bilo razlike u mitohondrijskoj oksidaciji palmitoilkarnitina (40  $\mu\text{mol/l}$ ), neovisno o dodatku TMZ u eksperimentalnu otopinu ( $n=46$ ). Dodatak 4-pentenoične kiseline (100  $\mu\text{mol/l}$ ), poznatog inhibitora  $\beta$ -oksidacije (96), koju smo koristili kao pozitivnu kontrolu ( $n=6$ ), uzrokovao je smanjenje stupnja oksidacije palmitoilkarnitina (Slika 7C). Također smo ispitali dvije dodatne koncentracije TMZ (1 i 100  $\mu\text{mol/l}$ ), pod istim eksperimentalnim uvjetima, koristeći srčano tkivo šestero bolesnika očuvane sistoličke funkcije i bez šećerne bolesti, koji nikada nisu bili izloženi lijeku. Ponovno, *in vitro* dodatak TMZ nije imao utjecaj na mitohondrijsku oksidaciju masnih kiselina i ugljikohidrata (Slika 7D).



**Slika 7.** Učinak *in vitro* dodanog trimetazidina (TMZ) na srčanu oksidaciju masnih kiselina. (A) Mitohondrijska oksidacija palmitoilkarnitina (Pc, 40  $\mu\text{mol/l}$ ) snimljena uz postupni

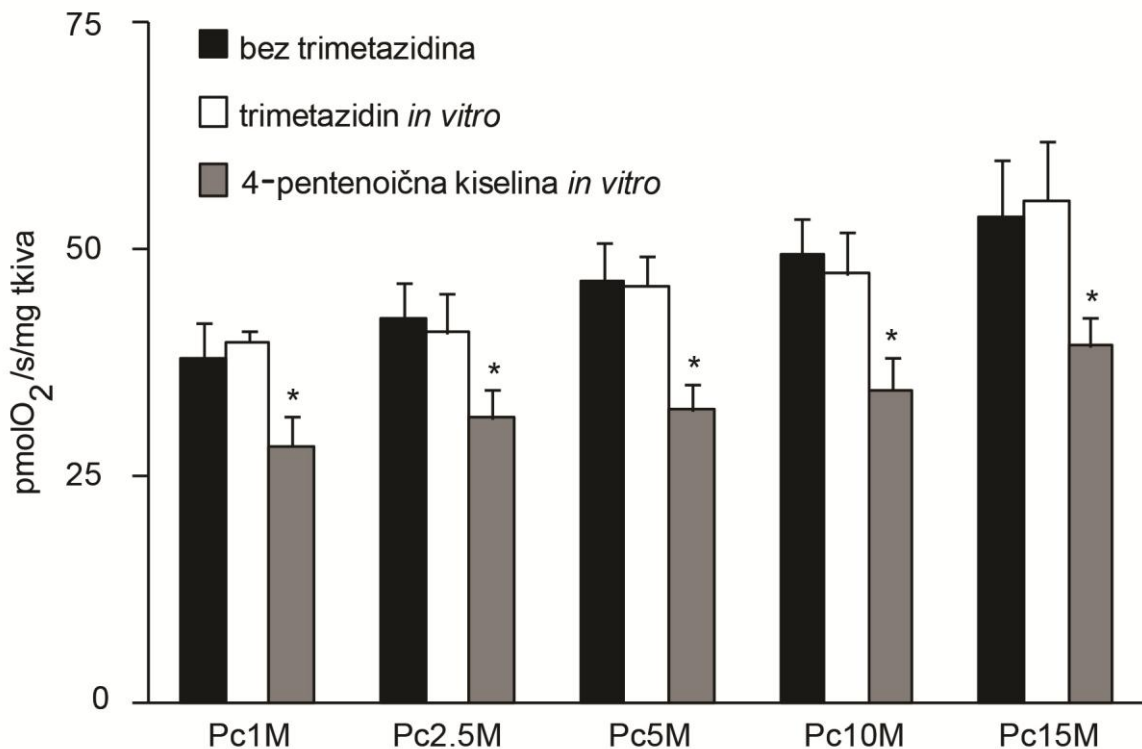
dodatak ADP-a i FCCP-a je bila sličnih vrijednosti neovisno o prisutnost TMZ (10  $\mu\text{mol/l}$ ) u respiracijskoj otopini. Postupnim dodavanjem ostalih supstrata nastao je sličan porast u stupnju oksidacije (n=46). (B) Stupanj respiracije prikazan u odnosu na maksimalnu mitohondrijsku respiraciju. U dva odvojena dodatna testiranja (n=6 pacijenata u svakom eksperimentu), oksidacija masnih kiselina je mjerena u prisutnosti inhibitora  $\beta$ -oksidacije, 4-pentenoične kiseline (C) i uz dodatak dviju dodatnih koncentracija TMZ (D). Pc40, palmitoilkarnitin 40  $\mu\text{mol/l}$ ; M, malat; P, piruvat; G, glutamat; S, sukcinat; \*P<0.05 u odnosu na respiraciju nakon dodatka supstrata u obje eksperimentalne skupine. \*\*P<0.05 u odnosu na respiraciju bez TMZ i uz dodatak lijeka u respiracijski medij *in vitro*.

Teoretski, detergent *saponin*, kojega smo koristili u postupku pripreme srčanih mišićnih vlakana za eksperimente, mogao je interferirati s učinkom TMZ na enzim 3-KAT. Stoga smo, u dodatnoj skupini eksperimenata, mjerili oksidaciju palmitoilkarnitina u homogenatu srčanog tkiva (čime smo izbjegli korištenje saponina) i to u grupi od 6 bolesnika koji ranije nisu bili izloženi TMZ, koji su imali očuvanu sistoličku funkciju te nisu bolovali od šećerne bolesti. Koristeći ovaj pristup, nismo zamijetili značajnu razliku u mitohondrijskoj oksidaciji masnih kiselina uz dodatak TMZ (koncentracije 1, 10 i 100  $\mu\text{mol/l}$ ) (Slika 8).



**Slika 8.** Mitohondrijska oksidacija masnih kiselina snimljena u srčanim homogenatima. Mogući učinak saponina korištenog tijekom permeabilizacije vlakana na stupanj oksidacije palmitoilkarnitina (Pc, 40  $\mu\text{mol/l}$ ) je izbjegnut drugačijom pripremom tkiva. Stupanj mitohondrijske respiracije mjereno nakon dodatka ADP-a i FCCP nije bio značajno promijenjen, neovisno o korištenoj koncentraciji TMZ. M, malat; n=6 bolesnika.

Prema istraživanju Lopaschuka i sur., inhibicija  $\beta$ -oksidacije trimetazidinom ovisi o koncentraciji dostupnog supstrata (53). Stoga smo proveli dodatna mjerenja na tkivu šestoro pacijenata koji su imali očuvanu srčanu sistoličku funkciju, bez šećerne bolesti i koji nisu bili ranije izloženi lijeku. Koristili smo nekoliko različitih nižih koncentracija palmitoilkarnitina (od 1 do 15  $\mu\text{mol/l}$ ). Trimetazidin dodan *in vitro* nije snizio stupanj oksidacije masnih kiselina, neovisno o njihovoj koncentraciji u sustavu za mjerenje (Slika 9). Za razliku od TMZ, dodatak 4-pentenoične kiseline (100  $\mu\text{mol/l}$ ) (pozitivna kontrola) je statistički značajno inhibirao  $\beta$ -oksidaciju palmitoilkarnitina.



**Slika 9.** Ispitivanje učinka trimetazidina (TMZ) primijenjenog u *in vitro* uvjetima na oksidaciju masnih kiselina u srčanim stanicama koristeći različite manje koncentracije

palmitoilkarnitina (1-15  $\mu\text{mol/l}$ ). Mitohondrijska oksidacija masnih kiselina je mjerena u prisutnosti ADP-a i FCCP-a. Nije bilo promjena u stupnju oksidacije uz akutno primijenjen TMZ (10  $\mu\text{mol/l}$ ) uz bilo koju testiranu koncentraciju supstrata – palmitoilkarnitina (Pc). M, malat; n=6. Postupno povećavanje koncentracije Pc uzrokovalo je značajan porast u potrošnji kisika unutar iste eksperimentalne skupine ( $P < 0.05$ ), \* $P < 0.05$  u odnosu na oksidaciju masnih kiselina bez TMZ u respiracijskom mediju i uz primjenu TMZ *in vitro*.

## 5. RASPRAVA

Provedenom studijom smo pokazali kako TMZ ne utječe na oksidaciju masnih kiselina niti ugljikohidrata u lijevom ventrikulu bolesnika oboljelih od ishemijske bolesti srca liječenih, između ostalog, i operativnom metodom (CABG). Usporedbom mitohondrijskog iskorištavanja supstrata u srcu CTL i TMZ skupine bolesnika, nismo pronašli učinak kronične terapije TMZ. Iz toga zaključujemo da lijek ne uzrokuje promjenu mitohondrijskog bioenergetskog ustroja. Štoviše, akutnim izlaganjem srčanog tkiva trimetazidinu u *in vitro* uvjetima (čime se izbjegao potencijalni učinak ispiranja lijeka), također se nije pronašao utjecaj lijeka na mitohondrijsku supstratnu oksidaciju. Navedeni rezultati studije su suprotni od ranije objavljenih podataka o mehanizmu djelovanja TMZ. Naime, prema općeprihvaćenoj hipotezi o mehanizmu djelovanja lijeka, pozitivan klinički učinak TMZ je povezan sa srčanim metaboličkim preusmjeravanjem od metaboliziranja masnih kiselina prema učinkovitijem metaboličkom putu iskorištavanja glukoze. Važno je istaknuti kako je predloženi mehanizam djelovanja lijeka utemeljen na neizravnim mjerenjima ili studijama izvedenim na životinjskom modelu (53, 96). Stoga je prednost ove studije što je hipoteza o učinku TMZ na metabolizam ispitana u srčanom tkivu ciljane populacije, bolesnicima oboljelim od ishemijske bolesti srca, kojima je terapija trimetazidinom prvenstveno propisana.

Kako je već spomenuto u uvodnom dijelu (29), djelomična inhibicija oksidacije masnih kiselina uzrokuje razmjerno povećanje aktivnosti ugljikohidratnog metaboličkog puta, što je prema rezultatima istraživanja Kantora (96) i Lopaschucka (53) osnovni mehanizam djelovanja TMZ koji je odgovoran za povoljne kliničke učinke. Usporedbom srčane oksidacije supstrata kod bolesnika oboljelih od ishemijske bolesti srca koji su kronično u terapiji koristili TMZ s onim bolesnicima koji nikada nisu bili izloženi lijeku, htjeli smo istražiti potiče li TMZ u srcu metaboličko reprogramiranje. Ukoliko je ta pretpostavka točna, učinci izazvani trimetazidinom bi trebali biti prisutni neovisno o mogućem ispiranju lijeka iz srčanog tkiva u razdoblju između uzimanja biopsije i mjerenja. Naši rezultati su pokazali kako kronična primjena TMZ nije utjecala na oksidaciju masnih kiselina (palmitoilkarnitina) niti na oksidaciju ugljikohidrata (piruvat). Dodatno, endogena aktivnost i ekspresija PDH, glavnog enzima regulacije metabolizma ugljikohidrata, također nije bila izmijenjena kroničnom terapijom trimetazidinom. Dobiveni rezultati dodatno podupiru podatke prikupljene mjerenjem mitohondrijske oksidacije, budući da je nekoliko studija pokazalo kako je



povećano preuzimanje i oksidacija glukoze u mitohondrijima praćena povišenom aktivnosti PDH (118).

Rezultati ove studije se razlikuju od onih objavljenih u istraživanju Kantora i sur. u kojoj su autori pronašli povećanje aktivne forme PDH u izoliranom štakorskom srcu izloženom TMZ (96). Suprotno tome, prema istraživanju Fantini i sur. (također na štakorskom modelu), oksidacija piruvata nije bila povišena u izoliranim srčanim mitohondrijima TMZ izloženih štakora, kao niti nakon *in vitro* dodavanja lijeka. U istom istraživanju su autori uočili smanjenje oksidacije palmitoilkarnitina (97). U našem istraživanju, akutna *in vitro* primjena TMZ (10  $\mu\text{mol/l}$  - koncentracija temeljena na prethodnim mehanicističkim istraživanjima (96, 101)) nije uzrokovala inhibiciju mitohondrijske  $\beta$ -oksidacije. Slične smo rezultate dobili mjerenjem oksidacije masnih kiselina u prisutnosti dviju dodatnih koncentracija TMZ (testirano u podgrupi bolesnika (1 i 100  $\mu\text{mol/l}$ )). Ovi se rezultati ne slažu s rezultatima nekih istraživačkih skupina koje su pokazale kako akutna primjena TMZ smanjuje/zaustavlja mitohondrijsku respiraciju masnih kiselina. Primjerice, dodatak TMZ respiracijskoj otopini (istraživanje provedeno na izoliranim srčanim mitohondrijima *Wistar* štakora), uzrokovalo je 40%-tno smanjenje oksidacije palmitoilkarnitina (97). U istraživanju Dedkove i sur. (117), premda je kardioprotektivni učinak TMZ prvenstveno pripisan nemetaboličkim učincima lijeka, autori su pronašli 15%-tno smanjenje oksidacije masnih kiselina u permeabiliziranim zečjim srčanim stanicama *in vitro* izloženim TMZ koncentracije 1  $\mu\text{mol/l}$ .

Eksperimentalni pristup kojeg smo koristili u našem istraživanju za ispitivanje mitohondrijske oksidacije supstrata – mjerenje mitohondrijske respiracije u srčanim vlaknima permeabiliziranim saponinom, ima mnoge prednosti pred analizom na izoliranim mitohondrijima. Ovom je metodom pripreme tkiva očuvana prirodna cjelovitost staničnog sustava kakva je prisutna u stvarnim *in vivo* uvjetima (115). Neke od mogućih metodoloških manjkavosti, poput razlika u mitohondrijskom sadržaju u biopsijskim uzorcima, su uklonjeni normaliziranjem dobivenih oksidacijskih vrijednosti u odnosu na maksimalnu mitohondrijsku respiraciju (112). Štoviše, aktivnost enzima markera mitohondrijskog sadržaja – citrat sintaze, mjerena u području odakle je biopsijski uzorak uzet, nije se razlikovala između CTL i TMZ skupine. Dodatno, skupina respirometrijskih mjerenja je provedena i u homogenatu lijevog ventrikula (umjesto u vlaknima permeabiliziranim saponinom) te se rezultati nisu značajno razlikovali od prethodnih mjerenja. Također, niti u ovoj skupini eksperimenata, nije pronađen inhibitorni učinak TMZ na oksidaciju masnih kiselina. Konačno, ispitali smo osjetljivost našeg eksperimentalnog sustava za otkrivanje malih, značajnih promjena u oksidaciji masnih

kiselina postupnim povećanjem koncentracije palmitoilkarnitina te koristeći pozitivnu kontrolu. Pokazali smo kako je korišten sustav za mjerenje osjetljiv za bilježenje malih promjena nastalih primjenom lijeka na oksidaciju supstrata (97, 117).

Posebnost eksperimentalnog pristupa korištenog u ovoj studiji je eksperimentalni model. Naime, sva mjerenja su provedena na ljudskom srčanom tkivu lijevog ventrikula te moguće razlike među biološkim vrstama mogu ponuditi objašnjenje dobivenim razlikama u rezultatima. Zaista, MacInnes i sur. (101) također nisu opazili učinak akutne primjene TMZ na  $\beta$ -oksidaciju u humanoj staničnoj kulturi (*Girardi* stanice). Autori su podatke dopunili izravnim mjerenjem aktivnosti dugolančane 3-KAT izolirane iz rekombiniranog humanog trifunkcionalnog enzima, što je prema mehanicističkim studijama predloženi ciljni enzim djelovanja lijeka. Nije zapažen inhibitorni učinak primjene različitih koncentracija TMZ na enzim. Glavna zamjerka MacInnesovoj studiji je bila da su u istraživanju koristili vrlo visoke koncentracije supstrata za 3-KAT enzim (53). U istraživanju koje je uslijedilo, Lopaschuk i sur. su pokazali (ponovno koristeći animalni model) kako postupno dodavanje supstrata u koncentraciji višoj od 15  $\mu\text{mol/l}$  može nadići inhibitorni učinak TMZ na  $\beta$ -oksidaciju, zaključujući kako je učinak TMZ ostvaren kompetitivnom inhibicijom dugolančane 3-KAT. Koristeći manje koncentracije supstrata (2.5 – 10  $\mu\text{mol/l}$ ), autori su opisali sniženu aktivnosti enzima u prisutnosti TMZ u sustavu za mjerenje. Kako bismo još dopunili naše rezultate, uzimajući u obzir rezultate prethodnih studija, osmislili smo dodatnu skupinu eksperimenata u kojima smo vlakna lijevog ventrikula izložili različitim nižim koncentracijama supstrata (palmitoilkarnitin, 1-15  $\mu\text{mol/l}$ ). No, ponovno, nismo pronašli učinak *in vitro* primijenjenog TMZ na mitohondrijsku oksidaciju masnih kiselina.

Važno je naglasiti kako svrha našeg istraživanja nije bila vrednovanje kliničkog učinka lijeka, budući da naš eksperimentalni pristup nije uključivao prospektivno mjerenje srčane funkcije prije i nakon terapije TMZ. Kardioprotektivni učinak lijeka je pokazan u brojnim studijama (86, 88, 119). Rezultati našeg istraživanja o izostanku učinka TMZ na mitohondrijsku supstratnu oksidaciju također neizravno podupiru rezultate nekih kliničkih istraživanja. Primjerice, primjena TMZ se pokazala učinkovitom u određenim srčanim bolestima u kojima glavna patofiziološka podloga ne uključuje ishemiju. Prema tim istraživanjima, glavni poremećaj u staničnoj fiziologiji kojega primjena TMZ ispravlja je povećanje učinkovitosti proizvodnje ATP-a boljim usklađivanjem glikolize s glukoznom oksidacijom (120-122). Druga klinička studija je pokazala poboljšanje srčane funkcije nakon tromjesečne terapije TMZ kod bolesnika oboljelih od idiopatske dilatativne kardiomiopatije

(55). Koristeći PET, autori su zamijetili samo 10%-tno smanjenje u srčanom preuzimanju masnih kiselina, zbog čega zaključuju kako je povoljan klinički učinak TMZ vjerojatnije posljedica mehanizama neovisnih o energetske moduliranju u srcu.

Za ranolazin, još jedan antianginalni lijek iz skupine metaboličkih modulatora, se također isprva smatralo kako povoljni klinički učinci nastaju inhibicijom  $\beta$ -oksidacije (76). No, nedavne studije su pokazale kako ranolazin inhibira kasnu struju natrija (82), što je mnogo povoljniji mehanizam djelovanja u stanici (prevencija preopterećenja stanica kalcijem koja nastaje zbog citosolnog porasta u koncentraciji natrija (80, 82)). Važno je istaknuti kako su mogući štetni učinci terapije koja inhibira oksidaciju masnih kiselina u srcu povećana akumulacija lipida u stanici (123), što može uzrokovati patološko remodeliranje i daljnje slabljenje srčane funkcije (124). Opisana štetnost najvjerojatnije nadilazi moguće povoljne učinke koje lijek može ostvariti na srčani energetske metabolizam.

Provedeno je nekoliko istraživanja o mogućim drugim mehanizmima djelovanja trimetazidina. Koristeći životinjski model srčanog zatajenja (zec, izolirane srčane stanice), zapažen je zaštitni učinak TMZ koji je pripisan smanjenju aktiviranja mPTP i manjom proizvodnjom slobodnih kisikovih radikala preko utjecaja na aktivnost kompleksa II i mitohondrijske NOS. Dodatno, u istom istraživanju, primjena drugog 3-KAT inhibitora - 4-bromotiglične kiseline, nije imala kardioprotektivni učinak (117). Smanjenje stvaranja slobodnih kisikovih radikala je također opaženo u studijama Iskesena i sur. (125), Liu i sur. (126) te Dehine i sur. (127). Povoljan učinak lijeka (očuvanje mitohondrijske strukture i kardioprotekcija) je zabilježen već četiri dana od početka *per os* primjene lijeka u modelu akutne ishemije (životinjski model - svinja).

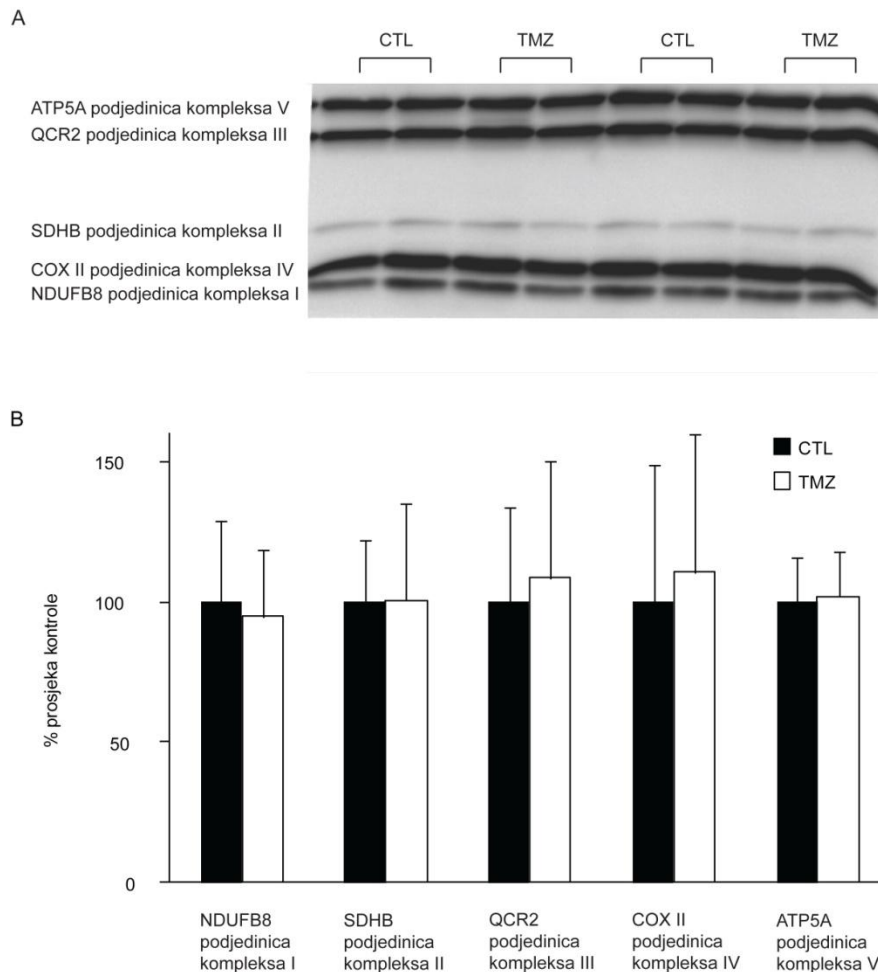
Mogući alternativni mehanizam učinka TMZ uključuje već spomenuto djelovanje na mPTP (105). U istraživanju Argaud i sur. je pokazano kako primjena TMZ prije postupka ishemije/reperfuzije (model - NZW kunić) smanjuje učestalost otvaranja mPTP nakon provedenog postupka. Nadalje, Tritto i sur. (104) su pokazali kako je trimetazidinom potaknuto očuvanje kontraktilne funkcije u izoliranom štakorskom srcu tijekom ishemije/reperfuzije povezano s inhibicijom aktivacije neutrofila, dok su Chen i sur. (128). pokazali inhibiciju makrofazima posredovanog proupalnog odgovora u miševa tretiranih TMZ prije endotoksinom izazvane kardiomiopatije. Iz svega navedenog, možemo zaključiti kako TMZ vjerojatno djeluje i preko drugih, izvanmitohondrijskih, čak i izvansrčanih mehanizama, što su predložile i nedavne studije o učinku TMZ na endotelnu funkciju (129) i ukupnu

tjelesnu osjetljivost na inzulin (55). Neki od ovih učinaka neovisnih o metaboličkoj modulaciji su u skladu s kliničkim poboljšanjem povezanim s primjenom lijeka.

## Ograničena studije

Nekoliko je ograničena provedena studije na koje je važno ukazati. Bolesnici oboljeli od ishemijske bolesti srca su i dalje raznovrsna skupina unutar koje se izdvajaju razlike u komorbiditetima i korištenim lijekovima. Usporedbom različitih kliničkih i biokemijskih čimbenika između dviju skupina bolesnika koje smo uključili u ovu studiju (Tablica 1), pokazali smo kako su skupine dobro usklađene. Bitno je kod tumačenja rezultata znati kako neke od pratećih bolesti (poput šećerne bolesti i srčanog zatajenja), mogu neovisno utjecati na srčani metabolizam (12, 22). Kako bismo isključili mogućnost da je mogući učinak TMZ terapije prikriven metaboličkom modulacijom uzrokovanom navedenim bolestima, napravili smo odvojenu analizu svih mjerenja, isključujući bolesnike sa šećernom bolesti i sistoličkom disfunkcijom.

Osnovna metoda ispitivanja mitohondrijskog metabolizma masnih kiselina i ugljikohidrata je bilo izravno mjerenje potrošnje kisika u mitohondrijima opskrbljenim supstratom tipičnim za pojedini metabolički put. U stanju kronične ishemijske bolesti srca nastaje oštećenje mitohondrija. Jedno od mogućih mjesta oštećenja je fosforilacijski aparat (112). Kako je u stanjima smanjene aktivnosti ATP sintaze ili adenin nukleotid translokatora usporen tok elektrona preko mitohondrijskog prijenosnog lanca, nastaje smanjeno iskorištavanje kisika (vrijednost koju smo bilježili sustavom za mjerenje), što bi moglo uzrokovati pogrešno tumačenje rezultata. Zbog toga smo u protokol snimanja mitohondrijske respiracije uključili FCCP, koji odvaja povezanost mitohondrijske potrošnje kisika i stvaranje ATP, čime smo otklonili mogući inhibitorni učinak oštećenja fosforilacijskog aparata. Nadalje, razlike u ekspresiji proteina respiracijskog lanca elektrona bi također mogle utjecati na dobivene rezultate. Kako bismo otklonili i ovu mogućnost, napravili smo *Western blot* analizu reprezentativnih podjedinica svih pet kompleksa respiracijskog lanca te ona, također, nije pokazala razlike između dviju ispitivanih skupina (Slika 10).



**Slika 10.** Ekspresija proteinskih podjedinica kompleksa respiracijskog lanca elektrona (ETC) u bolesnika koji su koristili trimetazidin u terapiji (TMZ) i kontrolne skupine bolesnika (CTL). (A) Slika reprezentativnog *Western blota* pokazuje signale koji odgovaraju određenim podjedinicama mitohondrijskih respiratornih kompleksa I, II, III, IV i V. (B) Prosjek intenziteta kemiluminiscencije normaliziran prema kontroli punjenja i izražen u odnosu na prosjek CTL skupine koji je postavljen na 100% (za svaku podjedinicu). Kronična primjena lijeka u terapiji nije izmijenila izražaj podjedinica ETC. N=21 u TMZ skupini i 25 bolesnika u kontrolnoj skupini.

Još jedan mogući metodološki problem je mogućnost ispiranja lijeka tijekom pripreme tkiva bolesnika koji su u redovnoj terapiji koristili TMZ. Postoje mnogi primjeri dugotrajnijih učinaka lijeka koji nastaju njegovom kroničnom primjenom i postoje neovisno o mogućem ispiranju: kardioprotekcija u farmakološkom prekondicioniranju (npr. hlapljivi anestetici čiji se učinak bilježi i nakon eliminacije lijeka - prvi te čak i drugi period prekondicioniranja se

bilježi nakon otprilike 24 sata) (130). Kako bismo otklonili i ovu moguću zamjerku, u dodatnim eksperimentima smo mjerili učinak uz akutnu *in vitro* primjenu TMZ.

Na kraju, važno je istaknuti kako je biopsija miokarda izvedena tijekom postupka „*off-pump*” operacijskog pristupa, zbog čega su otklonjeni mogući metabolički učinci srčane ishemije te različite kardioplegijske intervencije koje se koriste tijekom operativnog pristupa izvedenog uz korištenje uređaja za kardio-pulmonarno premoštenje.

## 6. ZAKLJUČCI

Uzimajući u obzir rezultate našeg istraživanja, nismo pronašli dokaze akutnog ili kroničnog učinka TMZ na srčanu oksidaciju masnih kiselina i ugljikohidrata, što se smatra glavnim mehanizmom odgovornim za antianginalni učinak lijeka. U skladu sa sve većim brojem kliničkih studija koje povezuju povoljne kliničke učinke primjene TMZ u skupini bolesnika oboljelih od ishemijske bolesti srca, ali i drugih, s ishemijom nepovezanih, stanja, studija provedena u sklopu ove doktorske disertacije je ukazala na potrebu za daljnjim translacijskim istraživanjima kojima će se odrediti točan unutarstanični mehanizam odgovoran za kardioprotektivni učinak lijeka.

## 7. SAŽETAK

**Pozadina istraživanja:** Metabolički modulator trimetazidin (TMZ) je antianginalni lijek koji se koristi u liječenju stabilne bolesti koronarnih arterija (engl. *coronary artery disease*, CAD). Prema pretpostavljenom mehanizmu djelovanja lijeka, povoljan klinički učinak se ostvaruje izmjenom srčanog metabolizma: preusmjerenjem mitohondrijskog iskorištavanja supstrata ka većem korištenju ugljikohidrata, zbog čega se povećava učinkovitost proizvodnje ATP-a. Nekoliko nedavno objavljenih studija provedenih uglavnom na životinjskim modelima su preispitale točnost predloženog mehanizma djelovanja lijeka. Cilj provedenog istraživanja je bio dobiti izravan uvid u učinak TMZ na mitohondrijsku oksidaciju supstrata u lijevom ventrikulu bolesnika oboljelih od CAD.

**Eksperimentalni pristup:** Mitohondrijska oksidacija masnih kiselina (palmitoilkarnitin) i ugljikohidrata (piruvat) je mjerena u permeabiliziranim vlaknima lijevog ventrikula dobivenim biopsijom tijekom operativnog premoštenja koronarnih arterija (engl. *coronary artery bypass grafting*, CABG) kod bolesnika oboljelih od CAD koji su koristili TMZ (TMZ skupina) ili ga nisu imali u redovnoj terapiji – kontrolna skupina.

**Glavni rezultati:** Nije zabilježena razlika između dviju skupina u oksidaciji palmitoilkarnitina i piruvata, kao niti u omjeru oksidacije ugljikohidrata i masnih kiselina. Aktivnost i ekspresija piruvat dehidrogenaze, glavnog regulirajućeg enzima ugljikohidratnog metabolizma, se nije razlikovala među skupinama. Konačno, izlaganje srčanog tkiva u *in vitro* uvjetima različitim koncentracijama TMZ također nije imalo značajan utjecaj na stupanj oksidacije masnih kiselina.

**Zaključak:** koristeći srčano tkivo ciljane populacije CAD bolesnika nismo pronašli učinak TMZ primijenjenog kronično *in vivo* niti akutno *in vitro* na oksidaciju masnih kiselina i ugljikohidrata, iz čega zaključujemo kako su povoljni klinički učinci TMZ prvenstveno posljedica drugih, još nedovoljno poznatih mehanizama.



## 8. SUMMARY

**Background and purpose:** Trimetazidine, known as a metabolic modulator, is an anti-anginal drug used for treatment of stable coronary artery disease (CAD). It is proposed to act *via* modulation of cardiac metabolism: shifting the mitochondrial substrate utilization towards carbohydrates, thus increasing the efficiency of adenosine triphosphate production. This mechanism was recently challenged, however using indirect approaches and animal models, making the conclusions of these studies questionable. The goal of the current study was to directly assess the effect of trimetazidine on mitochondrial substrate oxidation in left ventricular myocardium from CAD patients.

**Experimental approach:** Mitochondrial fatty acid (palmitoylcarnitine) and carbohydrate (pyruvate) oxidation was measured in permeabilized left ventricular fibres obtained during coronary artery bypass grafting surgery from CAD patients, which either had trimetazidine included in their therapy (TMZ group) or not (Control).

**Key results:** There was no difference found between the two groups in either oxidation of palmitoylcarnitine or pyruvate, as well as in the ratio of carbohydrate-to-fatty acid oxidation. Activity and expression of pyruvate dehydrogenase, the key regulator of carbohydrate metabolism, was also not different. Lastly, the acute *in vitro* exposure of myocardial tissue to different concentrations of trimetazidine did not affect myocardial oxidation of fatty acid.

**Conclusion and implications:** Using myocardial tissue from a target CAD patient population, we found no effect of trimetazidine (applied chronically *in vivo* or acutely *in vitro*) on cardiac fatty acid and carbohydrate oxidation, suggesting that clinical effects of trimetazidine are unlikely due to its metabolic effects, but rather to yet unidentified intracardiac mechanism.

## 9. LITERATURA

1. Fillmore N, Lopaschuk GD. Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure. *Biochimica et biophysica acta*. 2013 Apr;1833(4):857-65. PubMed PMID: 22960640.
2. Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schonekess BO. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1994 Aug 4;1213(3):263-76. PubMed PMID: 8049240.
3. Neely JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu Rev Physiol*. 1974;36:413-59. PubMed PMID: 19400669.
4. Opie LH. Metabolism of the heart in health and disease. I. *American heart journal*. 1968 Nov;76(5):685-98. PubMed PMID: 4235250.
5. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovascular research*. 1997 Feb;33(2):243-57. PubMed PMID: 9074687.
6. Lee L, Horowitz J, Frenneaux M. Metabolic manipulation in ischaemic heart disease, a novel approach to treatment. *European heart journal*. 2004 Apr;25(8):634-41. PubMed PMID: 15084367.
7. Dyck JR, Berthiaume LG, Thomas PD, Kantor PF, Barr AJ, Barr R, et al. Characterization of rat liver malonyl-CoA decarboxylase and the study of its role in regulating fatty acid metabolism. *The Biochemical journal*. 2000 Sep 1;350 Pt 2:599-608. PubMed PMID: 10947976. Pubmed Central PMCID: 1221289.
8. Dyck JR, Lopaschuk GD. Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002 Sep;34(9):1099-109. PubMed PMID: 12392882.
9. Saddik M, Lopaschuk GD. Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *The Journal of biological chemistry*. 1991 May 5;266(13):8162-70. PubMed PMID: 1902472.

10. Hauton D, Bennett MJ, Evans RD. Utilisation of triacylglycerol and non-esterified fatty acid by the working rat heart: myocardial lipid substrate preference. *Biochimica et biophysica acta*. 2001 Sep 28;1533(2):99-109. PubMed PMID: 11566447.
11. Niu YG, Hauton D, Evans RD. Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat heart: routes of uptake and metabolic fates. *The Journal of physiology*. 2004 Jul 1;558(Pt 1):225-37. PubMed PMID: 15121801. Pubmed Central PMCID: 1664916.
12. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews*. 2010 Jan;90(1):207-58. PubMed PMID: 20086077.
13. Koonen DP, Glatz JF, Bonen A, Luiken JJ. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta*. 2005 Oct 1;1736(3):163-80. PubMed PMID: 16198626.
14. Su X, Abumrad NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Mar;20(2):72-7. PubMed PMID: 19185504. Pubmed Central PMCID: 2845711.
15. Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Mayr M. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with <sup>14</sup>C-labeled substrates in humans. *The Journal of clinical investigation*. 1987 Feb;79(2):359-66. PubMed PMID: 3805273. Pubmed Central PMCID: 424073.
16. Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circulation research*. 2007 Aug 17;101(4):335-47. PubMed PMID: 17702980.
17. Opie LH. Metabolism of free fatty acids, glucose and catecholamines in acute myocardial infarction. Relation to myocardial ischemia and infarct size. *The American journal of cardiology*. 1975 Dec;36(7):938-53. PubMed PMID: 1106170.
18. Weiss JN, Lamp ST. Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *The Journal of general physiology*. 1989 Nov;94(5):911-35. PubMed PMID: 2512370. Pubmed Central PMCID: 2228974.
19. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport. *Circulation research*. 1995 Jul;77(1):88-97. PubMed PMID: 7788886.
20. Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *The Biochemical journal*. 2001 Aug 15;358(Pt 1):69-77. PubMed PMID: 11485553. Pubmed Central PMCID: 1222033.

21. Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 May;284(5):E855-62. PubMed PMID: 12676647.
22. Nagoshi T, Yoshimura M, Rosano GM, Lopaschuk GD, Mochizuki S. Optimization of cardiac metabolism in heart failure. *Current pharmaceutical design.* 2011 Dec;17(35):3846-53. PubMed PMID: 21933140. Pubmed Central PMCID: 3271354.
23. Barnes SJ, Weitzman PD. Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster. *FEBS letters.* 1986 Jun 9;201(2):267-70. PubMed PMID: 3086126.
24. Hinkle PC. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta.* 2005 Jan 7;1706(1-2):1-11. PubMed PMID: 15620362.
25. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta.* 2003 Jun 5;1604(2):77-94. PubMed PMID: 12765765.
26. Schultz BE, Chan SI. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure.* 2001;30:23-65. PubMed PMID: 11340051.
27. Boyer PD. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual review of biochemistry.* 1997;66:717-49. PubMed PMID: 9242922.
28. Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochimica et biophysica acta.* 2011 Jul;1813(7):1333-50. PubMed PMID: 21256164.
29. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963 Apr 13;1(7285):785-9. PubMed PMID: 13990765.
30. Randle PJ, Newsholme EA, Garland PB. Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *The Biochemical journal.* 1964 Dec;93(3):652-65. PubMed PMID: 4220952. Pubmed Central PMCID: 1214024.
31. Bing RJ, Michal G. Myocardial efficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1959 Feb 6;72(12):555-8. PubMed PMID: 13627939.
32. Hutter JF, Schweickhardt C, Piper HM, Spieckermann PG. Inhibition of fatty acid oxidation and decrease of oxygen consumption of working rat heart by 4-bromocrotonic acid. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 1984 Jan;16(1):105-8. PubMed PMID: 6699916.

33. Korvald C, Elvenes OP, Myrnes T. Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000 Apr;278(4):H1345-51. PubMed PMID: 10749732.
34. Lopaschuk GD. Treating ischemic heart disease by pharmacologically improving cardiac energy metabolism. *The American journal of cardiology*. 1998 Sep 3;82(5A):14K-7K. PubMed PMID: 9737481.
35. Rosano GM, Fini M, Caminiti G, Barbaro G. Cardiac metabolism in myocardial ischemia. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(25):2551-62. PubMed PMID: 18991672.
36. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews*. 2005 Jul;85(3):1093-129. PubMed PMID: 15987803.
37. Abozguia K, Shivu GN, Ahmed I, Phan TT, Frenneaux MP. The heart metabolism: pathophysiological aspects in ischaemia and heart failure. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(8):827-35. PubMed PMID: 19275646.
38. Garlid KD, Jaburek M, Jezek P. Mechanism of uncoupling protein action. *Biochemical Society transactions*. 2001 Nov;29(Pt 6):803-6. PubMed PMID: 11709078.
39. Jezek P, Engstova H, Zackova M, Vercesi AE, Costa AD, Arruda P, et al. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1998 Jun 10;1365(1-2):319-27. PubMed PMID: 9693744.
40. Christensen NJ, Videbaek J. Plasma catecholamines and carbohydrate metabolism in patients with acute myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*. 1974 Aug;54(2):278-86. PubMed PMID: 4847245. Pubmed Central PMCID: 301555.
41. Kurien VA, Oliver MF. Free fatty acids during acute myocardial infarction. *Progress in cardiovascular diseases*. 1971 Jan;13(4):361-73. PubMed PMID: 5212391.
42. Dennis SC, Gevers W, Opie LH. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1991 Sep;23(9):1077-86. PubMed PMID: 1658348.
43. Neely JR, Feuvray D. Metabolic products and myocardial ischemia. *The American journal of pathology*. 1981 Feb;102(2):282-91. PubMed PMID: 7008624. Pubmed Central PMCID: 1903670.
44. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual review of medicine*. 1991;42:225-46. PubMed PMID: 2035969.

45. McVeigh JJ, Lopaschuk GD. Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. *The American journal of physiology*. 1990 Oct;259(4 Pt 2):H1079-85. PubMed PMID: 2221115.
46. Taniguchi M, Wilson C, Hunter CA, Pehowich DJ, Clanachan AS, Lopaschuk GD. Dichloroacetate improves cardiac efficiency after ischemia independent of changes in mitochondrial proton leak. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001 Apr;280(4):H1762-9. PubMed PMID: 11247790.
47. Bers DM, Barry WH, Despa S. Intracellular Na<sup>+</sup> regulation in cardiac myocytes. *Cardiovascular research*. 2003 Mar 15;57(4):897-912. PubMed PMID: 12650868.
48. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiological reviews*. 1999 Apr;79(2):609-34. PubMed PMID: 10221990.
49. Ciapponi A, Pizarro R, Harrison J. Trimetazidine for stable angina. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2005 (4):CD003614. PubMed PMID: 16235330.
50. Dyck JR, Cheng JF, Stanley WC, Barr R, Chandler MP, Brown S, et al. Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation. *Circulation research*. 2004 May 14;94(9):e78-84. PubMed PMID: 15105298.
51. Lam A, Lopaschuk GD. Anti-anginal effects of partial fatty acid oxidation inhibitors. *Current opinion in pharmacology*. 2007 Apr;7(2):179-85. PubMed PMID: 17307396.
52. Lee L, Campbell R, Scheuermann-Freestone M, Taylor R, Gunaruwan P, Williams L, et al. Metabolic modulation with perhexiline in chronic heart failure: a randomized, controlled trial of short-term use of a novel treatment. *Circulation*. 2005 Nov 22;112(21):3280-8. PubMed PMID: 16301359.
53. Lopaschuk GD, Barr R, Thomas PD, Dyck JR. Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase. *Circulation research*. 2003 Aug 8;93(3):e33-7. PubMed PMID: 12869392.
54. Stanley WC. Partial fatty acid oxidation inhibitors for stable angina. *Expert opinion on investigational drugs*. 2002 May;11(5):615-29. PubMed PMID: 11996644.
55. Tuunanen H, Engblom E, Naum A, Nagren K, Scheinin M, Hesse B, et al. Trimetazidine, a metabolic modulator, has cardiac and extracardiac benefits in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2008 Sep 16;118(12):1250-8. PubMed PMID: 18765391.

56. Sodi-Pallares D, Testelli MR, Fishleder BL, Bisteni A, Medrano GA, Friedland C, et al. Effects of an intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report. *The American journal of cardiology*. 1962 Feb;9:166-81. PubMed PMID: 13914751.
57. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000 Aug;85(8):2970-3. PubMed PMID: 10946914.
58. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *Jama*. 2006 Apr 12;295(14):1681-7. PubMed PMID: 16609090.
59. Pandolfi A, Giaccari A, Cilli C, Alberta MM, Morviducci L, De Filippis EA, et al. Acute hyperglycemia and acute hyperinsulinemia decrease plasma fibrinolytic activity and increase plasminogen activator inhibitor type 1 in the rat. *Acta diabetologica*. 2001;38(2):71-6. PubMed PMID: 11757804.
60. Diaz R, Goyal A, Mehta SR, Afzal R, Xavier D, Pais P, et al. Glucose-insulin-potassium therapy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Jama*. 2007 Nov 28;298(20):2399-405. PubMed PMID: 18042917.
61. Timmer JR, Ottervanger JP, de Boer MJ, Dambrink JH, Hoorntje JC, Gosselink AT, et al. Hyperglycemia is an important predictor of impaired coronary flow before reperfusion therapy in ST-segment elevation myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 Apr 5;45(7):999-1002. PubMed PMID: 15808754.
62. van der Horst IC, Zijlstra F, van 't Hof AW, Doggen CJ, de Boer MJ, Suryapranata H, et al. Glucose-insulin-potassium infusion in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction: the glucose-insulin-potassium study: a randomized trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 Sep 3;42(5):784-91. PubMed PMID: 12957421.
63. Yue TL, Bao W, Gu JL, Cui J, Tao L, Ma XL, et al. Rosiglitazone treatment in Zucker diabetic Fatty rats is associated with ameliorated cardiac insulin resistance and protection from ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *Diabetes*. 2005 Feb;54(2):554-62. PubMed PMID: 15677515.
64. Zhu P, Lu L, Xu Y, Schwartz GG. Troglitazone improves recovery of left ventricular function after regional ischemia in pigs. *Circulation*. 2000 Mar 14;101(10):1165-71. PubMed PMID: 10715264. Pubmed Central PMCID: 3633448.

65. Lindenfeld J, Masoudi FA. Fluid retention with thiazolidinediones: does the mechanism influence the outcome? *Journal of the American College of Cardiology*. 2007 Apr 24;49(16):1705-7. PubMed PMID: 17448372.
66. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *The New England journal of medicine*. 2007 Jun 14;356(24):2457-71. PubMed PMID: 17517853.
67. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2):159-70. PubMed PMID: 12705865.
68. Lassers BW, Wahlqvist ML, Kaijser L, Carlson LA. Effect of nicotinic acid on myocardial metabolism in man at rest and during exercise. *Journal of applied physiology*. 1972 Jul;33(1):72-80. PubMed PMID: 5037413.
69. Brisse B, Tetsch P, Jacobs W, Bender F. Beta-adrenoceptor blockade in stress due to oral surgery. *British journal of clinical pharmacology*. 1982;13(Suppl 2):421S-7S. PubMed PMID: 6125195. Pubmed Central PMCID: 1402143.
70. Campbell SE, Tandon NN, Woldegiorgis G, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Aug 27;279(35):36235-41. PubMed PMID: 15161924.
71. Coort SL, Willems J, Coumans WA, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF, et al. Sulfo-N-succinimidyl esters of long chain fatty acids specifically inhibit fatty acid translocase (FAT/CD36)-mediated cellular fatty acid uptake. *Molecular and cellular biochemistry*. 2002 Oct;239(1-2):213-9. PubMed PMID: 12479588.
72. Schmidt-Schweda S, Holubarsch C. First clinical trial with etomoxir in patients with chronic congestive heart failure. *Clinical science*. 2000 Jul;99(1):27-35. PubMed PMID: 10887055.
73. Holubarsch CJ, Rohrbach M, Karrasch M, Boehm E, Polonski L, Ponikowski P, et al. A double-blind randomized multicentre clinical trial to evaluate the efficacy and safety of two doses of etomoxir in comparison with placebo in patients with moderate congestive heart failure: the ERGO (etomoxir for the recovery of glucose oxidation) study. *Clinical science*. 2007 Aug;113(4):205-12. PubMed PMID: 17319797.
74. Kennedy JA, Unger SA, Horowitz JD. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 in rat heart and liver by perhexiline and amiodarone. *Biochemical pharmacology*. 1996 Jul 26;52(2):273-80. PubMed PMID: 8694852.



75. Scirica BM. Ranolazine in patients with coronary artery disease. Expert opinion on pharmacotherapy. 2007 Sep;8(13):2149-57. PubMed PMID: 17714067.
76. McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. Circulation. 1996 Jan 1;93(1):135-42. PubMed PMID: 8616920.
77. Clarke B, Wyatt KM, McCormack JG. Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts: evidence for an indirect mechanism. Journal of molecular and cellular cardiology. 1996 Feb;28(2):341-50. PubMed PMID: 8729066.
78. Chaitman BR. Efficacy and safety of a metabolic modulator drug in chronic stable angina: review of evidence from clinical trials. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics. 2004 Sep;9 Suppl 1:S47-64. PubMed PMID: 15378131.
79. Gralinski MR, Chi L, Park JL, Friedrichs GS, Tanhehco EJ, McCormack JG, et al. Protective Effects of Ranolazine on Ventricular Fibrillation Induced by Activation of the ATP-Dependent Potassium Channel in the Rabbit Heart. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics. 1996 Apr;1(2):141-8. PubMed PMID: 10684411.
80. Hale SL, Leeka JA, Kloner RA. Improved left ventricular function and reduced necrosis after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits treated with ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2006 Jul;318(1):418-23. PubMed PMID: 16617168.
81. Wang P, Fraser H, Lloyd SG, McVeigh JJ, Belardinelli L, Chatham JC. A comparison between ranolazine and CVT-4325, a novel inhibitor of fatty acid oxidation, on cardiac metabolism and left ventricular function in rat isolated perfused heart during ischemia and reperfusion. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2007 Apr;321(1):213-20. PubMed PMID: 17202401.
82. Sossalla S, Wagner S, Rasenack EC, Ruff H, Weber SL, Schondube FA, et al. Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts--role of late sodium current and intracellular ion accumulation. Journal of molecular and cellular cardiology. 2008 Jul;45(1):32-43. PubMed PMID: 18439620.
83. Detry JM, Sellier P, Pennaforte S, Cokkinos D, Dargie H, Mathes P. Trimetazidine: a new concept in the treatment of angina. Comparison with propranolol in patients with stable angina. Trimetazidine European Multicenter Study Group. British journal of clinical pharmacology. 1994 Mar;37(3):279-88. PubMed PMID: 8198938. Pubmed Central PMCID: 1364760.

84. El-Kady T, El-Sabban K, Gabaly M, Sabry A, Abdel-Hady S. Effects of trimetazidine on myocardial perfusion and the contractile response of chronically dysfunctional myocardium in ischemic cardiomyopathy: a 24-month study. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2005;5(4):271-8. PubMed PMID: 15984909.
85. Parang P, Singh B, Arora R. Metabolic modulators for chronic cardiac ischemia. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2005 Dec;10(4):217-23. PubMed PMID: 16382258.
86. Szwed H, Sadowski Z, Elikowski W, Koronkiewicz A, Mamcarz A, Orszulak W, et al. Combination treatment in stable effort angina using trimetazidine and metoprolol: results of a randomized, double-blind, multicentre study (TRIMPOL II). *TRIMetazidine in POLand. European heart journal*. 2001 Dec;22(24):2267-74. PubMed PMID: 11728147.
87. Sellier P, Broustet JP. Assessment of anti-ischemic and antianginal effect at trough plasma concentration and safety of trimetazidine MR 35 mg in patients with stable angina pectoris: a multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2003;3(5):361-9. PubMed PMID: 14728070.
88. Vitale C, Spoletini I, Malorni W, Perrone-Filardi P, Volterrani M, Rosano GM. Efficacy of trimetazidine on functional capacity in symptomatic patients with stable exertional angina--the VASCO-angina study. *International journal of cardiology*. 2013 Sep 30;168(2):1078-81. PubMed PMID: 23200272.
89. Papadopoulos CL, Kanonidis IE, Kotridis PS, Papayannis IL, Savatis SC, Missopoulou-Kokka AI, et al. The effect of trimetazidine on reperfusion arrhythmias in acute myocardial infarction. *International journal of cardiology*. 1996 Jul 26;55(2):137-42. PubMed PMID: 8842782.
90. Steg PG, Grollier G, Gallay P, Morice M, Karrillon GJ, Benamer H, et al. A randomized double-blind trial of intravenous trimetazidine as adjunctive therapy to primary angioplasty for acute myocardial infarction. *International journal of cardiology*. 2001 Feb;77(2-3):263-73. PubMed PMID: 11182191.
91. Fragasso G, Pallosi A, Puccetti P, Silipigni C, Rossodivita A, Pala M, et al. A randomized clinical trial of trimetazidine, a partial free fatty acid oxidation inhibitor, in patients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006 Sep 5;48(5):992-8. PubMed PMID: 16949492.

92. Fragasso G, Perseghin G, De Cobelli F, Esposito A, Palloshi A, Lattuada G, et al. Effects of metabolic modulation by trimetazidine on left ventricular function and phosphocreatine/adenosine triphosphate ratio in patients with heart failure. *European heart journal*. 2006 Apr;27(8):942-8. PubMed PMID: 16510466.
93. Fragasso G, Piatti Md PM, Monti L, Palloshi A, Setola E, Puccetti P, et al. Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy. *American heart journal*. 2003 Nov;146(5):E18. PubMed PMID: 14597947.
94. Dezsi CA. Trimetazidine in Practice: Review of the Clinical and Experimental Evidence. *American journal of therapeutics*. 2016 May-Jun;23(3):e871-9. PubMed PMID: 25756467. Pubmed Central PMCID: 4856171.
95. Task Force M, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *European heart journal*. 2013 Oct;34(38):2949-3003. PubMed PMID: 23996286.
96. Kantor PF, Lucien A, Kozak R, Lopaschuk GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circulation research*. 2000 Mar 17;86(5):580-8. PubMed PMID: 10720420.
97. Fantini E, Demaison L, Sentex E, Grynberg A, Athias P. Some biochemical aspects of the protective effect of trimetazidine on rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1994 Aug;26(8):949-58. PubMed PMID: 7799450.
98. El Banani H, Bernard M, Cozzone P, James F, Feuvray D. Ionic and metabolic imbalance as potential factors of ischemia reperfusion injury. *The American journal of cardiology*. 1998 Sep 3;82(5A):25K-9K. PubMed PMID: 9737483.
99. Mody FV, Singh BN, Mohiuddin IH, Coyle KB, Buxton DB, Hansen HW, et al. Trimetazidine-induced enhancement of myocardial glucose utilization in normal and ischemic myocardial tissue: an evaluation by positron emission tomography. *The American journal of cardiology*. 1998 Sep 3;82(5A):42K-9K. PubMed PMID: 9737485.
100. Kennedy JA, Horowitz JD. Effect of trimetazidine on carnitine palmitoyltransferase-1 in the rat heart. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 1998 Sep;12(4):359-63. PubMed PMID: 9825181.
101. MacInnes A, Fairman DA, Binding P, Rhodes J, Wyatt MJ, Phelan A, et al. The antianginal agent trimetazidine does not exert its functional benefit via inhibition of

mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circulation research*. 2003 Aug 8;93(3):e26-32. PubMed PMID: 12869391.

102. Saeedi R, Grist M, Wambolt RB, Bescond-Jacquet A, Lucien A, Allard MF. Trimetazidine normalizes postischemic function of hypertrophied rat hearts. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005 Jul;314(1):446-54. PubMed PMID: 15840766.

103. Nowak P, Zagzil T, Konecki J, Szczerbak G, Szkilnik R, Niwinski J, et al. Trimetazidine increases [3H]glucose uptake in rat brain. *Pharmacological reports : PR*. 2006 Jul-Aug;58(4):559-61. PubMed PMID: 16963803.

104. Tritto I, Wang P, Kuppusamy P, Giraldez R, Zweier JL, Ambrosio G. The anti-anginal drug trimetazidine reduces neutrophil-mediated cardiac reperfusion injury. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2005 Jul;46(1):89-98. PubMed PMID: 15965360.

105. Argaud L, Gomez L, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Loufouat J, Robert D, et al. Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia-reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2005 Dec;39(6):893-9. PubMed PMID: 16243351.

106. Clanachan AS. Contribution of protons to post-ischemic Na(+) and Ca(2+) overload and left ventricular mechanical dysfunction. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2006 May;17 Suppl 1:S141-S8. PubMed PMID: 16686669.

107. Monti LD, Allibardi S, Piatti PM, Valsecchi G, Costa S, Pozza G, et al. Triglycerides impair postischemic recovery in isolated hearts: roles of endothelin-1 and trimetazidine. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001 Sep;281(3):H1122-30. PubMed PMID: 11514278.

108. Renaud JF. Internal pH, Na<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> regulation by trimetazidine during cardiac cell acidosis. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 1988 Mar;1(6):677-86. PubMed PMID: 3154332.

109. Meng D, Feng L, Chen XJ, Yang D, Zhang JN. Trimetazidine improved Ca<sup>2+</sup> handling in isoprenaline-mediated myocardial injury of rats. *Experimental physiology*. 2006 May;91(3):591-601. PubMed PMID: 16469819.

110. Zhang L, Ding WY, Wang ZH, Tang MX, Wang F, Li Y, et al. Early administration of trimetazidine attenuates diabetic cardiomyopathy in rats by alleviating fibrosis, reducing apoptosis and enhancing autophagy. *Journal of translational medicine*. 2016 Apr 27;14(1):109. PubMed PMID: 27121077. Pubmed Central PMCID: 4848862.

111. Wargovich TJ, MacDonald RG, Hill JA, Feldman RL, Stacpoole PW, Pepine CJ. Myocardial metabolic and hemodynamic effects of dichloroacetate in coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 1988 Jan 1;61(1):65-70. PubMed PMID: 3337018.
112. Lemieux H, Semsroth S, Antretter H, Hofer D, Gnaiger E. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011 Dec;43(12):1729-38. PubMed PMID: 21871578.
113. Slagsvold KH, Moreira JB, Rognmo O, Hoydal M, Bye A, Wisloff U, et al. Remote ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and activates pro-survival protein kinase Akt in the left ventricle during cardiac surgery: a randomized trial. *International journal of cardiology*. 2014 Dec 15;177(2):409-17. PubMed PMID: 25456576.
114. Stride N, Larsen S, Hey-Mogensen M, Sander K, Lund JT, Gustafsson F, et al. Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. *European journal of heart failure*. 2013 Feb;15(2):150-7. PubMed PMID: 23115323.
115. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature protocols*. 2008;3(6):965-76. PubMed PMID: 18536644.
116. Gnaiger E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009 Oct;41(10):1837-45. PubMed PMID: 19467914.
117. Dedkova EN, Seidlmayer LK, Blatter LA. Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013 Jun;59:41-54. PubMed PMID: 23388837. Pubmed Central PMCID: 3670593.
118. Lauritzen MH, Laustsen C, Butt SA, Magnusson P, Sogaard LV, Ardenkjaer-Larsen JH, et al. Enhancing the [13C]bicarbonate signal in cardiac hyperpolarized [1-13C]pyruvate MRS studies by infusion of glucose, insulin and potassium. *NMR in biomedicine*. 2013 Nov;26(11):1496-500. PubMed PMID: 23794521.
119. Fragasso G, Rosano G, Baek SH, Sisakian H, Di Napoli P, Alberti L, et al. Effect of partial fatty acid oxidation inhibition with trimetazidine on mortality and morbidity in heart failure: results from an international multicentre retrospective cohort study. *International journal of cardiology*. 2013 Mar 10;163(3):320-5. PubMed PMID: 23073279.

120. Aygen B, Celiker H, Dogukan A, Ilhan N. The effects of trimetazidine on lipid peroxidation in patients with end-stage renal disease. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2008 Dec;30(10):757-60. PubMed PMID: 19271025.
121. Ferraro E, Giammarioli AM, Caldarola S, Lista P, Feraco A, Tinari A, et al. The metabolic modulator trimetazidine triggers autophagy and counteracts stress-induced atrophy in skeletal muscle myotubes. *The FEBS journal*. 2013 Oct;280(20):5094-108. PubMed PMID: 23953053.
122. Onbasili AO, Yeniceriglu Y, Agaoglu P, Karul A, Tekten T, Akar H, et al. Trimetazidine in the prevention of contrast-induced nephropathy after coronary procedures. *Heart*. 2007 Jun;93(6):698-702. PubMed PMID: 17065180. Pubmed Central PMCID: 1955192.
123. Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004 Nov;18(14):1692-700. PubMed PMID: 15522914.
124. Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 Mar;1801(3):311-9. PubMed PMID: 19818871. Pubmed Central PMCID: 2823976.
125. Iskesen I, Saribulbul O, Cerrahoglu M, Var A, Nazli Y, Sirin H. Trimetazidine reduces oxidative stress in cardiac surgery. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2006 Sep;70(9):1169-73. PubMed PMID: 16936431.
126. Liu X, Gai Y, Liu F, Gao W, Zhang Y, Xu M, et al. Trimetazidine inhibits pressure overload-induced cardiac fibrosis through NADPH oxidase-ROS-CTGF pathway. *Cardiovascular research*. 2010 Oct 1;88(1):150-8. PubMed PMID: 20534773.
127. Dehina L, Vaillant F, Tabib A, Bui-Xuan B, Chevalier P, Dizerens N, et al. Trimetazidine demonstrated cardioprotective effects through mitochondrial pathway in a model of acute coronary ischemia. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2013 Mar;386(3):205-15. PubMed PMID: 23263451.
128. Chen J, Lai J, Yang L, Ruan G, Chaugai S, Ning Q, et al. Trimetazidine prevents macrophage-mediated septic myocardial dysfunction via activation of the histone deacetylase sirtuin 1. *British journal of pharmacology*. 2016 Feb;173(3):545-61. PubMed PMID: 26566260. Pubmed Central PMCID: 4728416.
129. Rehberger-Likoza A, Sebestjen M. Influence of trimetazidine and ranolazine on endothelial function in patients with ischemic heart disease. *Coronary artery disease*. 2015 Dec;26(8):651-6. PubMed PMID: 26049922.

130. Feng J, Lucchinetti E, Fischer G, Zhu M, Zaugg K, Schaub MC, et al. Cardiac remodelling hinders activation of cyclooxygenase-2, diminishing protection by delayed pharmacological preconditioning: role of HIF1 alpha and CREB. *Cardiovascular research*. 2008 Apr 1;78(1):98-107. PubMed PMID: 18218685.

## ŽIVOTOPIS

### Marija Ćavar Borić

**Adresa zaposlenja:** Zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju, Klinički bolnički centar Split, Spinčićeva 1, 21000 Split

**E-mail:** [marija.cavar@mefst.hr](mailto:marija.cavar@mefst.hr)

**Datum rođenja:** 10. listopada 1987.

**Mjesto rođenja:** Dubrovnik, Hrvatska

#### Radno iskustvo :

- 2015 – : Specijalizantica Kliničke radiologije u Kliničkom bolničkom centru Split
- 2014 – 2015: Asistentica na Zavodu za fiziologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
- 2012 – 2013: Pripravnički staž u Kliničkom bolničkom centru Split

#### Obrazovanje:

- 2012 – 2015: poslijediplomski doktorski studij „Klinička medicina utemeljena na dokazima”
- 2006 - 2012: doktor medicine - Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; *Diplomski rad: Analiza mogućih uzroka iznimnog i izrazitog povećanja smrtnosti od akutnog infarkta miokarda godine 1996. u Splitsko-dalmatinskoj županiji*

#### Istraživačko iskustvo:

Sudjelovanje u znanstvenim projektima

1. „Myocardial energetics as a target for treatment of ischemic heart disease: A translational approach from patient to mitochondria“, znanstveni projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (02.05-48), voditeljica prof. dr. sc. Jasna Marinović.
2. „Investigating Pathological Processes in Ischemic Human Myocardium; Basic Science Tools for Major Health Problem“ znanstveni projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa, voditeljica prof. dr. sc. Darija Baković Kramarić.



### **Radovi u indeksirani časopisima (CC, SCI, SSCI):**

1. Trimetazidine does not alter metabolic substrate oxidation in cardiac mitochondria of target patient population. Cavar M, Ljubkovic M, Bulat C, Bakovic D, Fabijanic D, Kraljevic J, Karanovic N, Dujic Z, Lavie CJ, Wisloff U, Marinovic J. Br J Pharmacol. 2016 Feb 4. doi: 10.1111/bph.13454.
2. Bain AR, Ainslie PN, Hoiland RL, Barak OF, Cavar M, Drvis I, et al. Cerebral oxidative metabolism is decreased with extreme apnoea in humans; impact of hypercapnia. The Journal of Physiology. 2016 Sep 15;594(18):5317-28. PubMed PMID: 27256521.

### **Kongresna priopćenja:**

#### Usmena izlaganja

2014. *Godišnji simpozij Hrvatskog društva fiziologa s međunarodnim sudjelovanjem, Split*

Impact of metabolic modulator trimetazidine on mitochondrial oxidation in left ventricle of patients with coronary artery disease. **Ćavar M.**

#### Poster prezentacije

2014 *The British Pharmacological Society, Pharmacology 2014, London*

Investigating the Effects of Trimetazidine on Cardiac Substrate Oxidation in Left Ventricle of Patients with Coronary Artery Disease.

**M Cavar**, M Ljubkovic, C Bulat, D Bakovic, J Kraljevic, D Fabijanic, N Karanovic, Z Dujic, U Wisloff, J Marinovic.

### **Nastavne aktivnosti:**

2014 – 2015: Program fiziologije na studiju medicine (za doktore medicine), stomatologije i farmacije Medicinskog fakulteta u Splitu

**Članstvo u stručnim i znanstvenim organizacijama:**

- Hrvatska liječnička komora
- Hrvatska udruga bolničkih liječnika
- Hrvatsko fiziološko društvo
- Hrvatsko društvo radiologa
- Europsko društvo radiologije