

# Koncentracija endotelne lipaze u serumu i funkcionalne značajke lipoproteina visoke gustoće u bolesnika s različitim kliničkim prezentacijama koronarne bolesti

---

**Bodrožić Džakić Poljak, Tomislava**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:005918>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Tomislava Bodrožić Džakić Poljak**

Koncentracija endotelne lipaze u  
**serumu i funkcionalne značajke**  
**lipoproteina visoke gustoće u**  
**bolesnika s različitim kliničkim**  
prezentacijama koronarne bolesti

DISERTACIJA



ZAGREB, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Tomislava Bodrožić Džakić Poljak**

Koncentracija endotelne lipaze u  
**serumu i funkcionalne značajke**  
**lipoproteina visoke gustoće u**  
**bolesnika s različitim kliničkim**  
prezentacijama koronarne bolesti

DISERTACIJA

ZAGREB, 2024.

Disertacija je izrađena u Klinici za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kao dio znanstvenog projekta financiranog u Republici Austriji (Jubilee Foundation of the Austrian National Bank) *Endothelial lipase and HDL function: Studies in coronary artery disease patients* (OeNB; 15858, 2014-2017), koji je ostvaren međunarodnom suradnjom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Istraživačkog centra za staničnu signalizaciju, izmjenu tvari i starenje Gottfried Schatz, na Medicinskom sveučilištu u Grazu u Austriji (*Gottfried Schatz, Forschungszentrum für zelluläre Signaltransduktion, Stoffwechsel und Altern; Medizinische Universität Graz*).

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Vesna Degoricija, dr. med.

## Zahvale

Zahvaljujem suprugu Domagoju, kćerima Sofii i Anastasii na podršci i strpljenju.

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc.Vesni Degoriciji na bezuvjetnom strpljenju, pomoći i podršci tijekom cijelog doktorskog studija i izrade disertacije, kao i prof.dr.sc.Saši Franku i prof.dr.sc. Matiasu Trbušiću na pomoći.

Zahvaljujem i kolegi Franu Šaleru na tehničkoj pomoći oko izrade ovog rada.

## Popis kratica

**ABC - A1** eng. *Adenosin triphosphate binding membrane cassette transport protein A1*, adenzin trifosfat membranski transportni protein A1

**ACCELERATE** – eng. *Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition with Evacetrapib in Patients at a High Risk for Vascular Outcomes*, Procjena kliničkih učinaka inhibicije prijenosa kolesteril estera s Evacetrapibom kod bolesnika s visokim rizikom za vaskularne ishode

**AKS** – akutni koronarni sindrom

**ANGPTL3** - eng. *angiopoietin-like 3 protein*, angiopoetinu nalik protein 3

**apoA** – apolipoprotein A

**apoB** – apolipoprotein B

**aPTV** - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

**ATP-ABC** – eng. *adenosin.triphosphate binding membrane cassette transport protein*, adenzin trifosfat vezajući membranski transportni protein

**CABG** – eng. *coronary artery bypass graft*, aortokoronarna prenosnica

**CCS** - eng. *Canadian Cardiovascular Society*, Kanadsko kardiovaskularno društvo

**CETP** - eng. *cholesterol ester transfer protein*, transportni protein kolesteril-estera

**CI** - eng. *confidence interval*, interval pouzdanosti

**CP** - cistein proteaza

**CRP** – C reaktivni protein

**DMEM** - eng. *Dulbeccos modified eagle medium*, Dulbeccosov modificirani orlovljevi medij

**DHR** - dihidrorodamin

**EDL** - engl. *endothelial – derived lipases*, lipaze porijeklom iz endotela

**EDTA** - etilen-diamin-tetraoctena kiselina

**EFLV** – eng. *ejection fraction of left ventricle*, istisna frakcija lijeve klijetke

**EL** – endotelna lipaza

**ELISA** - eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, enzimski imunološki test s vezanim proturijelima

**FBS** - eng. *fetal bovine serum*, fetalni goveđi serum

**HEPES** - eng. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina

**HDL** – eng. *high density lipoprotein*, lipoprotein visoke gustoće

**HL** – hepatalna lipaza

**hsCRP** – eng. *high sensitice C reactive protein*, visokoosjetljivi C reaktivni protein

**HSPG** - heparan-sulfat proteoglikan

**ICM -1** eng. *intercellular adhesion molecule*, izmeđustanične adhezijske molekule

**IDF** - eng. *International Diabetes Federation*, internacionalna dijabetička federacija

**IFN  $\gamma$**  – interferon  $\gamma$  (gama)

**IL – 13** – interleukin 13

**IL – 6** – interleukin 6

**IL -10** – interleukin 10

**IL -4** – interleukin 4

**ILLUMINATE** – eng. *The Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events*, Istraživanje korekcije razine lipida u svrhu razumijevanja aterosklerotskih događaja

**iNOS** - eng. *inducible nitric oxide synthase*, inducibilna sintaza dušikovog oksida

**ITM** – indeks tjelesne mase

**KBC** – Klinički bolnički centar

**KKS** – kronični koronarni sindrom

**LAD** – eng. *left anterior descendent*, lijeva prednja silazna koronarna arterija

**lbLDL** – eng. *large buoyant LDL*, veliki plutajući lipoprotein niske gustoće

**LCAT** - eng. *lecithin-cholesterol acyl transferase*, lecitin kolesterol acil transferaza

**LDL** – eng. *low density lipoprotein*, lipoprotein niske gustoće

**LP – PLA2** – eng. *lipoprotein-associated phospholipase A2*, lipoprotein-vezana fosfolipaza A2

**LPL** – lipoprotein lipaza

**LPS** – lipopolisaharid

**LXR $\alpha$**  - eng. *liver X receptor  $\alpha$* , jetreni X receptor  $\alpha$

**MCP – 1** *monocyte chemoattractant protein-1*, monocitni kemoatraktantni protein 1

**MCSF** - *macrophage colony-stimulating factor*, čimbenik stimuliranja makrofagnih kolonija

**MI** – eng. *myocardial infarction*, srčani infarkt

**MMP** - eng. *matrix metalloproteinase*, metaloproteinaza matriksa

**MPO** – eng. *myeloperoxidase*, mijeloperoksidaza

**mRNA EL** – eng. *messenger RNA*, glasnička RNA endotelne lipaze

**MSCT** – eng. *multislice computed tomography*, višeslojna kompjutorizirana tomografija

**NFkB** – eng. *nuclear factor kappa B*, jezgreni faktora kapa B

**nLDL** – neoksigenirani LDL

**NSTEMI** – eng. *non-ST elevation myocardial infarction*, srčani infarkt bez ST elevacije

**OR** - eng. *odds ratio*

**PCI** – eng. *percutaneous coronary intervention*, perkutana koronarna intervencija

**PLTP** - eng. *phospholipid transfer protein*, transferirajući protein fosfolipida

**RCT** – eng. *reverse cholesterol transport*, reverzni transport kolesterola

**ROC** – eng. *receiver operator characteristics*

**sCAD** – engl. *stable coronary artery disease*, stabilna koronarna bolest

**sdLDL** – eng. *small density low density lipoprotein*, male lipoproteinske čestice niske gustoće

**SR – A** - eng. *scavenger receptor A*, skupljački receptor A

**SR – B1** – eng. *scavenger receptor B1*, skupljački receptor B

**STEMI** – eng. *ST elevation myocardial infarction*, srčani infarkt sa ST elevacijom

**TG** – trigliceridi

**TLR** – eng. *toll-like receptors*, receptor nalik proteinu „toll“

**TNF-  $\alpha$**  - eng. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , tumor nekrotizirajući faktor  $\alpha$

**UAP** – eng. *unstable angina pectoris*, nestabilna angina pektoris

**VCAM-1** - eng. *vascular cell adhesion molecule-1*, adhezijske molekule za vaskularne stanice

**VLDL** – eng. *very low density lipoprotein*, lipoprotein vrlo niske gustoće

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Ateroskleroza</b>	<b>1</b>
1.1.1 Definicija i patofiziologija	1
1.1.2. Rizični čimbenici za nastanak ateroskleroze	2
1.1.3. Stanični elementi ateroskleroze	3
1.1.4. Reverzni transport kolesterola	5
<b>1.2. Koronarna bolest srca</b>	<b>8</b>
1.2.1. Etiologija i patofiziologija aterosklerotske koronarne bolesti srca	8
1.2.2. Kliničke prezentacije koronarne bolesti srca	12
1.2.2.1 Stabilna koronarna bolest /kronični koronarni sindrom	12
1.2.2.2. Akutni koronarni sindrom	13
1.2.3. Dijagnostika koronarne bolesti srca	15
1.2.4. Liječenje koronarne bolesti srca	16
1.2.4.1. Invazivno i interventno liječenje	16
1.2.4.2. Medikamentno liječenje	16
<b>1.3. Endotelna lipaza u procesu ateroskleroze</b>	<b>17</b>
1.3.1. Molekularne značajke endotelne lipaze	17
1.3.2. Utjecaj endotelne lipaze na HDL i LDL kolesterol	19
1.3.3. Utjecaj endotelne lipaze na reverzni transport kolesterola	20
1.3.4. Polimorfizam gena i regulacija ekspresije endotelne lipaze	21
1.3.5. Povezanost endotelne lipaze, upale i ateroskleroze	23
<b>1.4. HDL u procesu ateroskleroze</b>	<b>25</b>
1.4.1. Struktura HDL-a	25
1.4.2. HDL i kardiovaskularni rizik	25
1.4.3. Uloga HDL-a	27
<b>2. HIPOTEZA</b>	<b>31</b>
<b>3. CILJEVI RADA</b>	<b>32</b>
3.1 Opći cilj	32
3.2 Specifični ciljevi	32
<b>4. MATERIJALI I METODE</b>	<b>33</b>
4.1. Uzorak i dizajn studije	33
4.2. Uključni kriteriji	33



4.3. Isključni kriteriji	34
4.4. Anamneza, terapija i kliničke karakteristike ispitanika	35
4.5. Elektrokardiogram, slikovne metode i angiografija koronarnih arterija	36
4.6. Laboratorijska analiza krvi	37
4.7. Statistička analiza	42
<b>5. REZULTATI</b>	<b>43</b>
5.1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	43
5.2. Usporedba laboratorijskih parametara	49
5.3. Analiza težine koronarne bolesti, endotelne lipaze i interleukina-6 u serumu	51
5.4. Funkcionalne osobitosti lipoproteina visoke gustoće	60
<b>6. RASPRAVA</b>	<b>61</b>
6.1 Endotelna lipaza i koronarna bolest	62
6.2 Efluks kolesterola i koronarna bolest	66
6.3 Protuupalno i antioksidativno svojstvo lipoproteina visoke gustoće	68
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	<b>72</b>
<b>8. SAŽETAK</b>	<b>74</b>
<b>9. SUMMARY</b>	<b>75</b>
<b>10. LITERATURA</b>	<b>77</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS</b>	<b>89</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Ateroskleroza

### 1.1.1 Definicija i patofiziologija

Ateroskleroza je kronična, multi-faktorijalna, fibroproliferativna i imunoinflamatorna bolest koja zahvaća arterije svih veličina i dovodi do razvoja asimetričnog, fokalnog zadebljanja intime arterija koje nazivamo aterosklerotski plakovi (1). Ranije se smatralo da aterosklerotski plakovi progresivno rastu i suzuju lumen arterije do potpune okluzije, dok danas znamo da većina okluzivnih lezija nastaje iznenadnom, superponiranom trombozom hemodinamski neznčajnih plakova uslijed njegove erozije ili rupture.

Jedan je osnovni patofiziološki mehanizam okluzije arterije, a to je lokalna tromboza (lat. „in situ“), dok su tri patomorfološka supstrata za nastanak tromboze. Prvi, najčešći mehanizam tromboze je tromboza uzrokovana rupturom tanke fibrozne kape (~50-60%), a slijede ju tromboza uslijed erozije endotela (~20%) i tromboza u čijoj je podlozi kalcificirani nodul koji protrudira u krvnu žilu (~2%) (2). Ruptura plaka tipično nastaje na dijelu plaka s tankom fibroznom kapom koja je oštećena djelovanjem upalnih stanica. Migracija upalnih stanica iz lumena u stijenku arterije i u područje plaka dovodi do njihove aktivacije i lučenja upalnih molekula i proteolitičkih enzima koji dovode do slabljenja fibrozne kape, njegove rupture i izlaganja trombogenog materijala plaka stanicama i faktorima u krvi, što aktivira koagulacijsku kaskadu i nastanak tromba. Iznenadna ruptura plaka dovodi do okluzije krvne žile miješanjem lipidnog sadržaja iz plaka i posljedične tromboze uslijed aktivacije unutarnjeg puta koagulacije, a posljedica je ishemija u irigacijskom području krvne žile što dovodi do akutnog odumiranja tkiva udova, cerebrovaskularnog inzulta ili akutnog infarkta miokarda. U oko 20-30% slučajeva akutnog koronarnog sindroma (AKS) i iznenadne srčane smrti ne nalazimo potpunu

okluziju koronarne arterije, već je u podlozi aterosklerotska stenoza koja ukoliko je značajna može provocirati ishemiju i fatalne aritmije (2). Pri tome, sklonost nastanku tromboze i fatalnih aritmije ne doprinose isključivo elementi aterosklerotskog plaka, već i pojedinačna i genetska sklonost trombozi, ali i stanje endogenog fibrinolitičkog sustava kao i vulnerabilnost miokarda koji je tada sklon nastanku aritmija.

Današnji izazovi u liječenju i prevenciji ateroskleroze usmjereni su na usporavanje razvoja ateroskleroze, prevenciji rupture vulnerabilnih plakova, liječenju komplikacija akutne ishemije i nekroze te prevenciji ponovnih incidenata. Još uvijek ostaje nejasno zašto kod pojedinaca s jasno vulnerabilnim plakovima ne dolazi do rupture plaka i tromboze te zašto u nekim slučajevima ruptura plaka ne dolazi do okluzije žile. Izazov predstavlja i identifikacija patofizioloških mehanizama zbog kojih dolazi do daljnje progresije ateroskleroze kod pojedinih bolesnika koji imaju ciljanu terapiju i optimalnu kontrolu rizičnih čimbenika.

### **1.1.2. Rizični čimbenici za nastanak ateroskleroze**

Multifaktorijalno porijeklo ateroskleroze sugerira da više različitih rizičnih čimbenika sinergistički djeluje u procesu stvaranja aterosklerotskog plaka. Međutim, danas, kao najvažniji identificirani rizični čimbenik smatramo hiperkolesterolemiju, odnosno, povišene plazmatske koncentracije lipoproteina niske gustoće (eng. *low density lipoprotein* – LDL) za koje se smatra da su bez prisutnosti drugih čimbenika rizika dostatni za razvoj procesa ateroskleroze (3). Imunoinflamatorno porijeklo bolesti povezuje neke od rizičnih čimbenika i mehanizam nastanka i progresije ateroskleroze, npr. kod bolesnika s arterijskom hipertenzijom povišene razine angiotenzina II dovode do aktivacije upalnih signalnih puteva NF- $\kappa$ B (eng. *nuclear factor kappa B*) ili stimulacije T-stanične imunosti; konzumacija duhana oštećenjem alveola aktivira imunski odgovor, a visceralno adipozno tkivo, osobito kod bolesnika sa šećernom

bolesti tip 2, sadrži i otpušta višestruke posrednike upale (4). Lokalna hemodinamika igra važnu ulogu u procesu ateroskleroze. Lamelarni tok krvi aktivira ionske kanale endotelne stanice osjetljivih na protok koji aktiviraju transkripciju i translaciju gena za faktore koji imaju ateroprotektivni, anti-trombotički i protuupalni učinak; na mjestima gdje postoji turbulentni protok krvi, gore navedeni čimbenici ometaju homeostazu čimbenika ključnih u prevenciji ateroskleroze (3,4).

U prevenciji aterosklerotskog procesa važna je tjelesna aktivnost, male količine alkohola te plazmatske koncentracije lipoproteina visoke gustoće (eng. *high density lipoprotein* – HDL). Za razliku od LDL-a, HDL djeluje antiaterogeno višestrukim mehanizmima; djeluje antioksidativno i protuupalno, ima vazodilatacijski učinak uz regulaciju viskoznosti i lokalnog protoka krvi, dok je najvažniji opisani učinak tzv. reverzni transport kolesterola (eng. *reverse cholesterol transport* - RCT) kojim iz krvožilja uklanja višak akumuliranog kolesterola i transportira ga u jetru gdje se izlučuje u žuč (4,5).

Kompleksan i multifaktorijalni proces koji dovodi do nastanka ateroskleroze i danas otežava razumijevanje i predviđanje razvojnog tijeka same ateroskleroze kod pojedinaca te je postalo jasno da postoji još staničnih mehanizama i genetskih varijabilnosti između pojedinaca zbog kojih neki imaju, a neki nemaju klinički manifestnu aterosklerozu.

### **1.1.3. Stanični elementi ateroskleroze**

U aterosklerotskom procesu nezaobilaznu ulogu imaju stanice endotela krvnih žila, upalne stanice odnosno leukociti te glatke mišićne stanice tunike medije arterija.

Endotelne stanice prirodna su barijera između krvi i intime krvnih žile, kako za stanice tako i za plazmatske lipoproteine. Oštećenjem, ali i disfunkcijom endotelne stanice započinje

aterosklerotska kaskada. Prvi korak aterosklerotske kaskade čini prolazak čestica LDL-a u subintimalni prostor. Ulaskom i akumulacijom u intimi arterije, čestice LDL-a zaštićene su od plazmatskih antioksidansa čime je omogućena njihova oksidacija i modifikacija (4,5). Na taj način aktivirani lipoproteini postaju proupalni i kemotaktički, uzrokujući aktivaciju endotelnih stanica.

Iako endotelne stanice uobičajeno ne eksprimiraju receptore koji omogućuju vezanje leukocita, na eksperimentalnim modelima, uvođenjem aterogene dijeta primjećena je ekspresija VCAM-1 molekule (eng. *vascular cell adhesion molecule-1*) osobito na mjestima s turbulentnim tokom krvi, a na takvim mjestima (grananje arterija) gdje je fiziološki reducirani protok postoji i smanjena endotelna sinteza dušikovog monoksida (NO) koji djeluje vazodilatativno i protuupalno (blokirajući ekspresiju VCAM-1 molekule) (6,7). Monociti i T-limfociti aktiviraju se uz pomoć VCAM-1, ali i međustaničnih adhezijskih molekula (eng. *intercellular adhesion molecule – ICM-1*), adheriraju na endotel i migriraju subintimalno. Monociti, koji su migrirali u intimu arterije, pod utjecajem snažnih kemokina zvanih monocitni kemoatraktantni protein-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1 – MCP-1*) diferenciraju se u makrofage te kasnije, uz čimbenik koji stimulira makrofagne kolonije (eng. *macrophage colony-stimulating factor – MCSF*) u pjenušave stanice. Aktivirani makrofazi na svojoj površini imaju eksprimiran tzv. skupljački receptor A (eng. *scavenger receptor A – SR-A*) koji fagocitira oksidirane LDL-čestice. Prisutni T-limfociti propagiraju imunosnu reakciju izlučivanjem citokina koji dodatno stimuliraju makrofage, endotelne stanice i glatke mišićne stanice (4,6,7). Jednom kada upalne stanice iz krvi migriraju u intimu, one podržavaju i propagiraju upalni odgovor. SR-A ne posjeduje mogućnost regulacije ekspresije ovisne o koncentraciji (eng. *down-regulation*) što dovodi do progresivne fagocitoze lipidnih čestica i u konačnici programirane apoptoze koja rezultira nastankom acelularne, lipidne jezgre aterosklerotskog plaka. Druga važna vrsta receptora izražena na makrofazima su tzv. receptori

nalik pretinima „toll“ (eng. *toll-like receptors* - TLR) koji pokreću kaskadu lučenja upalnih citokina, proteaza i slobodnih radikala kisika što dovodi do daljnje stimulacije upale i destabilizacije plaka (8).

Nakon što je uspostavljen aterosklerotski krug akumulacije lipida i upalnih stanica te imunskog odgovora, pod utjecajem citokina, u plak počinju migrirati i glatke mišićne stanice iz tunike medije u tuniku intimu, gdje proliferiraju. Aktivirane, s ciljem reparacije tkiva u području upale, počinju stvarati kolagen, elastin, proteoglikane i glikozaminoglikane, a nastali ekstracelularni matriks promovira akumulaciju i zaostajanje lipoproteina u intimi arterije čime nastaje začarani aterosklerotski krug. Iako izlučeni ekstracelularni matriks stabilizira aterosklerotski plak stvaranjem fibrozne kape, reakcija istovremeno može biti toliko izražena da opstruira lumen same arterije. Prisutnost T-limfocita koji izlučuju interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) onemogućuje glatke mišićne stanice u produkciji i održavanju fibrozne kape, a aktivirani makrofazi produciraju enzime poput metaloproteaze (eng. *matrix metalloproteinases* - MMP) i cistein proteaze (CP) koje razgrađuju i stanjuju fibroznu kapu koja inače ima ulogu stabilizacije aterosklerotskog plaka (4,6,7). Kroz dulje vrijeme, nakupljanje makrofaga i glatkih mišićnih stanica u plaku dovodi do njihove apoptoze čime nastaje nekrotična, lipidima bogata jezgra ateroma.

#### **1.1.4. Reverzni transport kolesterola**

Reverzni transport kolesterola endogeni je sustav koji održava homeostazu lipida i aktivno se suprotstavlja patološkom procesu akumulacije lipida u arterijskim stijenkama. Akumulirani lipidi nakupljeni u stijenkama krvnih žila transportiraju se natrag u jetru i u crijeva putem kojih se izlučuju. Prvi korak tog sustava je sinteza apolipoproteina A1 (apoA-1) u jetri koji se potom u plazmi veže na fosfolipide stvarajući tzv. diskoidni HDL; ta molekula pomoću ATP-

vezujućeg kasetnog proteina A1 i G1 (eng. *adenosin.triphosphate binding membrane cassette transport protein* – ATP - ABC) koji se nalazi u pjenušavim stanicama i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila potiče lučenje kolesterola u izvanstanični matriks (9). U toj kaskadi sudjeluje nekoliko faktora i receptora; skupljački receptor B1 (eng. *scavenger receptor B1* – SR-B1) nužan je za vezanje HDL-a na stanice, zatim kaveolin koji omogućuje izlazak kolesterola iz endoplazmatskog retikuluma u ekstracelularni prostor (8,9). Nakon izlaska iz stanice, kolesterol se esterificira uz pomoć lecitin-kolesterol acil transferaze (eng. *lecithin-cholesterol acyl transferase* – LCAT) i spaja s diskoidnim HDL-om uz pomoć transportnog proteina fosfolipida (eng. *phospholipid transfer protein* – PLTP) čime nastaju HDL<sub>2</sub> i HDL<sub>3</sub> čestice. Navedene HDL čestice krvlju dolaze do jetre gdje se enzimatski, pomoću kolesterol-ester transportnog proteina (eng. *cholesterol ester transfer protein* – CETP) prenose na apolipoprotein B (apoB), a zatim spajanjem s LDL-receptorima prelaze u jetru gdje se kasnije, kao žučne soli, izlučuju u crijeva (10).

Framinghamska studija 1960.godina prošlog stoljeća bila je prva studija koja je pokazala inverzni odnos plazmatske razine HDL-a i kardiovaskularnog rizika (11). Nakon toga, mnoge studije dokazale su zaštitnu ulogu HDL-a, odnosno proaterogeni utjecaj niske razine HDL-a u serumu, kao i sam mehanizam RCT, a u nastojanju da identificiraju mehanizme mogućeg farmakoterapijskog djelovanja.

Iako su identificirani mnogi genetski faktori koji sudjeluju u sintezi receptora i enzima zaduženih za metabolizam lipoproteina, a njihova je uloga potvrđena u studijama s transgenim miševima, još uvijek ne postoji nedvosmislena i jasna definicija uloge RCT-a i HDL-a u zaštiti od aterosklerotskog procesa. Čini se da je glavni mehanizam stimulacije RCT-a i prevencije ateroskleroze promjena životnog stila, prvenstveno usmjereno na redukciju unosa alkohola, redovitu fizičku aktivnost kao i apstinenciju od duhanskih proizvoda (12,13,14). Nikako se ne

smije zanemariti i genetska varijabilnost strukture HDL-a kao i genetski determinirana njegova funkcija.

Usprkos pozitivnoj korelaciji niskih razina HDL-a i progresije ateroskleroze i dalje postoje dokazi da visoka razina HDL-a ne dovodi nužno do redukcije kardiovaskularnog rizika, stoga se u pitanje dovodi i pretpostavka je li serumska razina HDL-a ekvivalentna mjera procesa RCT-a (15). Premda je HDL temeljna transportna molekula u reverznom transportu kolesterola, nije se pokazala kao pouzdana mjera RCT-a. Farmakoterapijskim porastom razine HDL-a u serumu uz pomoć nikotinske kiseline, fibrata ili torcetrapiba nije došlo do jasnog protektivnog učinka na kardiovaskularni sustav kao što je zabilježeno kod redukcije razine LDL-a statinima (16).

Kod određenih bolesnika, neovisno o postignutoj zadovoljavajućoj kontroli vrijednosti arterijskog tlaka, glikemije, vrijednosti LDL-a i kolesterola u krvi i dalje postoji izvjesna mogućnost daljnjeg razvoja ateroskleroze što nazivamo rezidualnim kardiovaskularnim rizikom. Mnoge velike populacijske i kliničke studije ukazuju da redukcija LDL-a statinima do ciljnih vrijednosti dovodi do značajne redukcije kardiovaskularnih događaja (17,18). Neovisno o tome, kod nekih ljudi ateroskleroza i dalje napreduje, a taj efekt može se pripisati niskim vrijednostima HDL-a te povišenim vrijednostima triglicerida. Iako učinak HDL-a nije u potpunosti razjašnjen zbog njegove multifaktorijalne povezanosti, ali i višestrukih učinaka (protuupalni, antitrombotski, vazodilatatorni, antioksidativni), niske vrijednosti HDL-a i dalje se smatraju kao neovisni rizični čimbenik za koronarnu bolest (19). Klinička istraživanja pokazala su dodatnu redukciju kardiovaskularnih incidenata za 1,6% za svakih 0,11mmol/L redukcije vrijednosti triglicerida, a zabilježeni učinak neovisan je o vrijednostima LDL-a u bolesnika s AKS (20).



Učinak rezidualnog rizika kompleksniji je kod bolesnika sa šećernom bolesti. Osobe sa šećernom bolesti, a koje su liječene statinima imaju viši rizik u odnosu na bolesnike bez šećerne bolesti koje nisu liječene statinima (21).

Potrebno je naglasiti da LDL čestice nisu biokemijski homogena skupina. Prema trenutnom konsenzusu, postoje dva glavna fenotipa LDL čestica, LDL A koji se sastoji od velikih „plutajućih“ molekula (eng. *large buoyant LDL* – lbLDL) te LDL B kojeg čine LDL molekule male gustoće (eng. *small density LDL* – sdLDL); upravo su sdLDL čestice snažno povezane s metaboličkim poremećajima, pretilosti, šećernom bolesti tip 2 i smatraju se rizičnim čimbenikom za koronarnu bolest jer je kod LDL B fenotipa opažena povišena razina plazmatskih triglicerida i sniženih vrijednosti HDL-a (22).

Velike genetske i genomske studije otkrivaju snažnu vezu polimorfizma gena uključenih u metabolizam lipida kojim bi se mogao objasniti učinak rezidualnog rizika. Kod bolesnika opterećenih koronarnom bolesti, uočeni su polimorfizmi gena za proteine i transportere uključene u metabolizam HDL-a, triglicerida, ali i medijatore upale koji sudjeluju u aterosklerozi (22,23,24).

## **1.2. Koronarna bolest srca**

### **1.2.1. Etiologija i patofiziologija aterosklerotske koronarne bolesti srca**

Koronarna bolest srca, odnosno ateroskleroza koronarnih arterija srca je patološki proces koji nastaje razvojem i akumulacijom aterosklerotskog plaka u stijenkama koronarnih arterija.

Ateroskleroza je kronični, multifaktorski proces u čijoj se osnovi isprepliću endotelna ozljeda i endotelna disfunkcija koji rezultiraju akumulacijom lipoproteina i aktivnim upalnim

odgovorom (1,25). Navedeni proces dovodi do nakupljanja lipoproteina i upalnih stanica te stvaranja fokalnog aterosklerotskog plaka, osobito na mjestima ne-lamelarnog toka krvi (24,25).

Koronarna aterosklerotska bolest je kronični, progresivni patološki proces u kojem razlikujemo stabilne faze koje su najčešće dugotrajne, te akutne faze nastale destabilizacijom aterosklerotskog plaka (rupture ili erozije plaka) (26). Prema tome, sama bolest podijeljena je u dva velika klinička entiteta: akutni koronarni sindrom i kronični koronarni sindrom.

Kronični koronarni sindrom (KKS) pogađa široku skupinu bolesnika s razvijenom aterosklerozom koronarnih arterija, a koji klinički mogu biti asimptomatski, ali se i prezentirati anginoznim bolovima, zaduhom u naporu kao ekvivalentom stenokardije, simptomima srčanog popuštanja tj. disfunkcije lijeve klijetke (26). Ovoj skupini pripadaju svi bolesnici kod kojih je koronarna bolest dokazana probirnim slikovnim ili funkcionalnim testovima ili bolesnici sa stanjem nakon preboljelog akutnog koronarnog sindroma koji su liječeni konzervativno i kod kojih je provedena revaskularizacija bilo perkutanom koronarnom intervencijom (eng. *percutaneous coronary intervention* – PCI , bilo kardiokirurškom revaskularizacijom (eng. *coronary artery bypass graft* - CABG) (25,26).

Akutni koronarni sindrom je skup kliničkih entiteta koje karakterizira akutna nedostatnost koronarne perfuzije ili jednostavnije rečeno, AKS je stanje koji nastaje kao posljedica naglo nastalog pogoršanja nesrazmjera opskrbe i metaboličkih potreba srca, najčešće uslijed trombotskog događaja u čijoj je podlozi aterosklerotski proces. Napretkom tehnologije, biokemijske dijagnostike i povećanjem mogućnosti brzog dokaza nekroze kardiomiocita, klinički, biokemijski i elektrokardiografski AKS u kliničkoj praksi čine tri velika entiteta:

1. Infarkt srca s elevacijom ST segmenta (eng. *ST elevation myocardial infarction* - STEMI);

2. infarkt miokarda bez elevacije ST segmenta (eng. *Non ST elevation myocardial infarction* - NSTEMI);

3. nestabilna anginu pectoris (eng. *unstable angina pectoris* - UAP) (27,28,29,30).

Takva podjela napravljena je temeljem prognoze, patofiziološkog procesa i terapijskog pristupa.

U Republici Hrvatskoj, vodeći uzrok smrti su bolesti kardiovaskularnog sustava, od kojih je 2019.godine umrlo 22 020 stanovnika (42,5% svi uzroka, stopa smrtnosti 541,7/100.000), a najveći dio čini ishemijska bolest srca (7965 umrlih, 15,4% svih uzroka) (31). Ishemijska bolest srca vodeći je uzrok smrti muškaraca i žena (14,6% za muškarce i 16,1% za žene) (31). Na europskoj razini, bolesti kardiovaskularnog sustava također su vodeći uzrok smrtnosti, a najveći udio među njima čini koronarna bolest srca (19% za muškarce i 20% za žene) (32). Postoje velike regionalne razlike u incidenciji, s višim stopama u istočnoj Europi u odnosu na zapadnu Europu (33).

Unazad 20 godina, omjer bolesnika s NSTEMI porastao je s trećine na gotovo polovinu novodijagnosticiranih infarkta srca, uglavnom zbog sofisticiranijih metoda potvrde nekroze miokarda, a uvođenjem novih antiagregacijskih lijekova, liječenjem perkutanom intervencijom i porastom broja revaskularizacijskih procedura prati se pad i stabilizacija mortaliteta od AKS (34).

Dok bolesnici sa STEMI infarktom srca imaju višu kratkoročnu smrtnost i češće akutne komplikacije, bolesnici s NSTEMI srčanim infarktom opterećeni su višom dugoročnom smrtnosti, zbog većeg opsega koronarne bolesti, češćih komorbiditeta i manje jasnih dijagnostičko-terapijskih kriterija (35).

Temeljni patofiziološki element koronarne bolesti čini aterosklerotski proces. Anatomska varijabilnost koronarnog optoka i različit stupanj aterosklerotskog procesa rezultira različitim

kliničkim manifestacijama iste bolesti, dok opseg zahvaćenosti krvnih žila može varirati od jednog fokalnog aterosklerotskog plaka jedne koronarne arterije do višestrukih i difuznih plakova svih koronarnih arterija. Rizični čimbenici za razvoj koronarne bolesti detaljno su opisani i uključuju dob, spol, serumske razine kolesterola, debljinu, povišene vrijednosti arterijskog tlaka, šećernu bolest te konzumaciju cigareta i veće količine alkohola (36).

Oštećenje endotela koronarnih arterija nastaje interakcijom višestrukih rizičnih čimbenika i njihovih produkata kao što su dislipidemija, vazokonstriksijski hormoni u sklopu hipertenzije ili produkti glikoksidacije uslijed dugotrajne hiperglikemije kao i proupalni citokini iz adipoznog tkiva. Ispreplitanjem svega navedenoga počinje kaskada koja dovodi do adherencije cirkulirajućih leukocita, migracije glatkih mišićnih stanica i leukocita u intimu arterije te zajedno s odlaganjem lipoproteina rezultira stvaranjem aterosklerotskog plaka (37,38).

Aterosklerotske lezije s vremenom progrediraju, čime opstruiraju lumen arterije i krvni protok. Takve stenotične lezije dokazujemo i opisujemo angiografskim metodama. Iako se ranije smatralo da je stupanj suženja i brzina progresije aterosklerotskog plaka linearno povezana s rizikom od AKS, s vremenom je ipak razjašnjeno da je za većinu događaja odgovorna ruptura plaka i akutna tromboza (36). Dokaz toga pronalazi se u obdukcijskim i histološkim nalazima gdje dominira nalaz tromba na rupturiranom plaku, neovisno o stupnju suženja žile samim plakom, stoga i aterosklerotsko opterećenje koronarnih arterija može postojati bez morfološki značajnih stenoza (37,39,40).

Koronarnom angiografijom se opisuje stupanj zahvaćenosti koronarnih arterija plakom, a numerički u kojem stupnju opstruiraju lumen arterije. Stupanj stenozе korelira sa stupnjem redukcije protoka krvi kroz koronarnu arteriju, time i dio srčanog mišića koji dotična arterija opskrbljuje. Kod potpune opstrukcije protoka, odnosno okluzije arterije, brzo nastupa ishemijska kaskada – potrošnja staničnog kisika i glikogena, što dovodi do opuštanja miofibrila, disfunkcije mitohondrija i u konačnici nekroze miocita (41). Period od nastanka

ishemije do nekroze ovisi o intrinzičnim potrebama miokarda za kisikom, postojanju kolateralnog protoka te intermitentnom reperfuzijom, a može znatno varirati (42). Eksperimentalnim metodama dokazana je progresija nekroze od subendokarda prema subepikardu tijekom nekoliko sati ishemije iz čega proizlazi važnost vremenski brze dijagnoze i reperfuzijske terapije (43–45).

Potpuna okluzija koronarne arterije najčešće dovodi do transmuralne ishemije i elektrokardiografske slike infarkta miokarda sa ST-elevacijom, dok subtotalna stenoza arterije dovodi do subendokardijalne ishemije sa slikom akutnog koronarnog sindroma bez ST-elevacije (NSTEMI i UAP) (46,47). NSTEMI i UAP su dva različita entiteta a razlikuju se postojanjem nekroze miocita; nestabilnu angina pectoris karakterizira stupanj ishemije dovoljan da bi nastali simptomi, ali ne i nekroza miocita.

## **1.2.2. Kliničke prezentacije koronarne bolesti srca**

### *1.2.2.1 Stabilna koronarna bolest /kronični koronarni sindrom*

Kronični koronarni sindrom, ranijeg naziva stabilna angina pectoris, koji se još uvijek često koristi, nastaje stvaranjem aterosklerotskih plakova na koronarnim arterijama koji mogu, ali ne moraju stvarati opstrukciju protoka, a karakterizirana je dugotrajnim i stabilnim tijekom, koji može biti prekinut akutnim trombotskim incidentom u slučaju rupture ili erozije plaka (26). Patofiziološki, u trenutcima pojačanih metaboličkih potreba miokarda poput tjelesnog napora, tahikardije, visokih vrijednosti arterijskog tlaka dolazi do razvoja relativne ishemije u određenoj regiji miokarda što rezultira srčanom disfunkcijom i kliničkim simptomima. Simptomi stabilne koronarne bolesti su: 1. stežuća bol i/ili nelagoda u prsištu s mogućim širenjem u vrat, donju čeljust ili ramena i ruke te zaduha, 2. pogoršanje simptoma tjelesnim opterećenjem te 3. olakšanje simptoma koje nastupa relativno brzo s prestankom fizičke

aktivnosti ili uz primjenu nitrata, najčešće za manje od 10 minuta (26). Manje tipični, ali često prisutni simptomi su opća slabost, umor i mučnina. Simptomi i opterećenje potrebno za provokaciju simptoma mogu znatno varirati od osobe do osobe, ali velika varijabilnost simptoma se može vidjeti i u pojedinca tijekom vremena. Klasifikacija anginozne boli na "tipičnu, atipičnu i ne-anginoznu" bol pomaže u predviđanju vjerojatnosti postojanja koronarne bolesti, pri čemu "tipična angina pectoris" sadržava sva tri simptoma – bol/nelagoda u širem području prednjeg prsišta (ne u jednoj točki) , pogoršanje simptoma u naporu te olakšanje simptoma odmorom ili primjenom nitrata. Postojanje atipične (zadovoljava dva od tri opisana simptoma) i ne-anginozne (zadovoljava samo jedan od tri simptoma) prekordijalne boli ne isključuje postojanje koronarne bolesti, samo je vjerojatnost iste, uz takve simptome, manja (48). Klinička prezentacija prvi je i najvažniji korak u postavljanju sumnje na stabilnu koronarnu bolest, a promatrajući simptome u kontekstu rizičnih čimbenika poput dobi, spola, obiteljske anamneze kardiovaskularnih bolesti, dislipidemije, šećerne bolesti, hipertenzije, pretilosti i nikotinizma povećavamo vjerojatnost točne dijagnoze. Stabilna koronarna bolest zahtjeva doživotno praćenje i periodičku reevaluaciju bolesti.

#### *1.2.2.2. Akutni koronarni sindrom*

Akutni koronarni sindrom zajednički je naziv za infarkt miokarda sa ST-elevacijom, infarkt miokarda bez ST-elevacije i nestabilnu anginu pektoris. Ova tri klinička entiteta grupirani su zbog zajedničkih kliničkih i patofizioloških karakteristika, zajedničkog inicijalnog dijagnostičkog algoritma i važnosti brzine utvrđivanja dijagnoze i liječenja. Vodeći simptom AKS-a je bol u prsištu, a klinička slika može varirati od iznenadne srčane smrti i kardiogenog šoka, akutnog srčanog zatajenja do blaže nelagode u prsištu (49). Unutar ovog sindroma

razlikujemo infarkt miokarda u čijoj je osnovi nekroza miocita te nestabilnu anginu pektoris kod koje je osnovni patofiziološki supstrat ishemija srca, ali bez nekroze.

Prema četvrtoj univerzalnoj definiciji infarkta miokarda definirano je pet osnovnih tipova infarkta srca (eng. *myocardial infarction* – MI):

1. MI tip 1 najveća je skupina i definirana je rupturom ili erozijom aterosklerotskog plaka
2. MI tip 2 definiran je patofiziološkim mehanizmom nesrazmjera opskrbe i potražnje miokarda za kisikom koji može biti uzrokovan koronarnim vazospazmom ili poremećajem mikrocirkulacije, disekcijom koronarne arterije. Također, može se pojaviti u okolnostima velikih metaboličkih potreba miokarda (tahiaritmije, teška hipertenzija i hipertrofija lijevog ventrikla) odnosno smanjene dopreme kisika u miokard (hipoksija, teška anemija, hipotenzija)
3. MI tip 3 čine bolesnici s kliničkom slikom srčanog infarkta, a koji najčešće zbog malignih aritmija umiru prije laboratorijskog dokaza nekroze miokarda; ako se obdukcijom utvrdi postojanje trombotskog incidenta, ovi bolesnici se reklasificiraju u Tip 1 MI; procjenjuje se da je godišnja incidencija oko 10:100 000 bolesnika odnosno 3-4% svih tipova MI
4. MI tip 4 nastaje kao komplikacija perkutane koronarne intervencije
5. MI tip 5 nastaje kao posljedica kardiokirurške revaskularizacije miokarda (43,50).

Kanadsko društvo za kardiovaskularne bolesti (eng. *Canadian Cardiovascular Society* - CCS) klasificiralo je simptome angine pektoris u četiri stupnja, a klasifikacija je i danas u širokoj upotrebi:

1. CCS I – angina pektoris koja se pojavljuje samo u izraženim, brzim ili prolongiranim fizičkim aktivnostima
2. CCS II – angina pektoris koja se pojavljuje u umjerenom naporu (uobičajene aktivnosti)

koje se izvode brzo, javljaju se nakon obroka, tijekom hladnog vremena ili emocionalnog stresa)

3. CCS III – angina pektoris koja se pojavljuje u malom naporu (hodanje 100-200 metara, uspon na prvi kat)
4. CCS IV – angina pektoris koja se pojavljuje u mirovanju (51).

Nestabilna angina pektoris manifestira se kroz tri najčešće kliničke slike:

1. "angina pektoris u mirovanju" - prolongirana anginozna bol koja se javlja u mirovanju i traje do 20 minuta;
2. "novonastala angina pektoris" – pojava umjerenih do snažnih anginoznih tegoba unazad 2 mjeseca (CCS II ili III);
3. "krešendo angina pektoris" – pogoršanje intenziteta i težine simptoma od ranije poznate angine pektoris koja se događa u kraćem vremenom periodu (26).

### **1.2.3. Dijagnostika koronarne bolesti srca**

Postavljanje dijagnoze koronarne bolesti temelji se na kliničkoj slici, funkcionalnim i slikovnim dijagnostičkim pretragama. Kada se postavi jasna klinička sumnja na anginoznu bol u prsištu potrebno ju je nadopuniti laboratorijskim pretragama za potvrdu, odnosno isključenje AKS-a. Pri tome je nužan 12- kanalni elektrokardiogram (EKG). U slučaju KKS može se učiniti ergometrijsko testiranje i potrebno je učiniti ultrazvuk srca u svrhu procjene srčane funkcije. Ukoliko rezultati učinjene neinvazivne obrade upućuju s visokom vjerojatnošću na koronarnu bolest potrebno je učiniti neinvazivnu koronarnu angiografiju (eng. *multislice computed tomography coronary angiography* – MSCT koronarografija) ili klasičnu koronarnu angiografiju.



## **1.2.4. Liječenje koronarne bolesti srca**

### *1.2.4.1. Invazivno i interventno liječenje*

Ukoliko se dokaže da su bolesnikove smetnje uzrokovane značajnim suženjem koronarnih arterija potrebno je interventno liječenje. U današnje vrijeme postoje dva načina intervencijskog liječenja; perkutanom koronarnom intervencijom i kirurško liječenje – aortokoronarno premoštenje. Perkutanom koronarnom intervencijom suženje se može liječiti implantacijom potpornice ili aplikacijom citostatika kojim je obložen balon, a bez potpornice, na mjesto postojećeg suženja. Suženja koja su na nepogodnom mjestu, ili je više koronarnih arterija zahvaćeno visokim stupnjem suženja, potrebno je liječiti ipak kirurškom revaskularizacijom (49).

### *1.2.4.2. Medikamentno liječenje*

Medikamentno liječenje koronarne bolesti je osnova liječenja, bez obzira na koji se način bolest prezentirala. Svrha liječenja je smanjiti bolesnikove smetnje, usporiti aterosklerozu, prevenirati koronarnu trombozu, smanjiti direktne i indirektne potrebe miokarda te spriječiti negativnu remodelaciju srca uslijed produžene ishemije. Primjenjuju se lijekovi iz skupina beta blokatora, inhibitora angiotensin konvertirajućeg enzima, statini, trimetazidin, ranolazin, inhibitori kalcijevih kanala te kratkodjelujući i dugodjelujući nitrati (43, 47, 49-51).

## 1.3. Endotelna lipaza u procesu ateroskleroze

### 1.3.1. Molekularne značajke endotelne lipaze

Endotelna lipaza (EL) je enzim iz skupine trigliceridnih lipaza, a u velikoj mjeri je homologna lipoproteinskoj lipazi (LPL) i jetrenoj lipazi (eng. *hepatic lipase* - HL) (52). Dvije neovisne skupine istraživača 1999. godine su opisali postojanje EL (52,53). LPL dominantno sintetiziraju adipociti, poprečnoprugaste mišićne stanice i kardiomiociti, HL hepatociti dok je EL primarno sintetizirana u vaskularnim endotelnim stanicama i jedina je lipaza koju sintenzira endotel (52).

Ekspresija EL je izražena na stanicama s visokom metaboličkom aktivnošću i vaskularizacijom a to su u prvom redu stanice jetre, pluća, bubrega, štitnjače, jajnika, testisa i placente (54).

U inicijalnom procesu sinteze, EL je protein molekulske mase 55 kDa, a nakon posttranslacijske glikozilacije iz stanice se izlučuje kao protein molekulske mase 68 kDa, građen od 482 aminokiseline. Nakon sinteze i sekrecije, EL se veže na površinu stanica preko proteoglikana heparan-sulfata (HSPG) te veže lipoproteine na staničnu površinu i omogućuje hidrolizu svih skupina lipoproteina, osobito HDL-a (55). Kao slobodna lipaza u cirkulaciji ona podliježe utjecaju protein konvertaza te se cijepa u inaktivne molekule (52,56,57).

EL je svojom građom vrlo slična ostalim lipazama, tako dijeli identičnu građu s 44% LPL, 41% HL i 27% s pankreatičnom lipazom. Sve navedene lipaze imaju sličan segment odgovoran za katalizu dok je posljednji katalitički segment, koji je ključan za lipidnu hidrolizu identičan a sastoji se od tri aminokiseline – serin, asparat i histidin (53,54).

Osnovna molekularna razlika između EL i ostalih lipaza iz skupine trigliceridnih lipaza je aminokiselinska petlja koja se nalazi na katalitičkom mjestu i na taj način ima poseban afinitet

za supstrat. Ova strukturna razlika čini EL visokospecifičnom za dominantnu fosfolipaznu funkciju a u manjoj mjeri i lipaznu aktivnost prema trigliceridima, nasuprot LPL-a i HL-u (55,56,57).

Funkcionalno se od drugih lipaza razlikuje po visokoj fosfolipaznoj aktivnosti u odnosu na trigliceridaznu aktivnost. Zajedno s LPL-om i HL-om, endotelna lipaza čini skupinu lipaza zaduženih za hidrolizu fosfolipida i triglicerida (TG), gdje LPL dominantno djeluje kao TG-lipaza, HL djeluje istovremeno na fosfolipide i TG, dok EL gotovo isključivo djeluje kao fosfolipaza (58,59).

Postoje tri izoforme endotelne lipaze; EDL (engl. *endothelial – derived lipases*, EDL) 1a, 2a i 2b (58,59,60). EDL1a je u potpunosti, cijelom duljinom od 68 kDa glikozirana, dok su EDL2a (46 kDa) i EDL2b (38 kDa) djelomično rascijepane varijante EDL1a. EDL2a, za razliku od EDL1a nema na svom završetku peptid odgovoran za sekretorni signal dok je EDL2b još kraća a razlikuje se od ostalih izoformi jer ima nešto drugačiju regiju odgovornu za katalizu. Ishida i suradnici otkrili su prisutnost EDL 1a izoforme kao slobodne molekule u staničnom mediju, u nešto manjoj mjeri i u staničnom lizatu dok su 2a i 2b izoforme detektirali samo u lizatu stanice i nalaze se intracelularno, u citosolu (59,61).

Također, istraživajući funkcijske razlike izoformi EL otkrili su kako samo 1a ima visoku fosfolipaznu i nisku trigliceridaznu aktivnost dok EDL2a i 2b nemaju praktički nikakav stupanj enzimatske aktivnosti.

### 1.3.2. Utjecaj endotelne lipaze na HDL i LDL kolesterol

Sfingomijelin, jedan od najzastupljenijih fosfolipida u lipoproteinima determinira specifičnost EL za vezanje na adekvatan supstrat kao i njezinu aktivnost. Jednako tako, Yang i suradnici su dokazali kako sfingomijelin inhibira hidrolizu lipoproteina. EL ima različit intenzitet lipazne aktivnosti prema različitim lipoproteinima. Tako ima značajno veću litičku aktivnost na HDL u odnosu na LDL i lipoprotein vrlo niske gustoće (eng. *very low density lipoprotein* – VLDL). Ako se uzme u obzir da lipoproteini imaju drugačiji sastav i koncentraciju sfingomijelina, odnosno, VLDL i LDL imaju značajno više sfingomijelina u svom sastavu, manja litička aktivnost EL prema ovim molekulama može se tumačiti upravo zbog inhibitornog djelovanja sfingomijelina na EL (62).

U ispitivanju funkcija endotelne lipaze uvelike su pomogli animalni modeli, odnosno genetski modificirani miševi. Endotelna lipaza veže i hidrolizira serumski HDL vežući apoA-1 i apoA-2 što dovodi do raspada HDL-a na manje čestice siromašne fosfolipidima koje su podložne bržem katabolizmu rezultirajući padom serumske razine HDL-a, ali i apoA-1 čestica čime se usporava reverzni transporta kolesterola (61,62,63). Ispitivanje na genetski modificiranim miševima s povećanom funkcijom EL rezultiralo je dramatičnim padom razine HDL-a, dok je kod miševa s isključenim genom za EL opažen porast HDL-a; kod ljudi, polimorfizmi jednog nukleotida u genu koji kodira EL (LIPG gen, polimorfizam 584C/T) značajno su povezani s vrijednostima serumskog HDL-a (64,65,66).

Ispitivanje učinaka EL na LDL u animalnim modelima nisu dala dosljedne rezultate. Jaye i suradnici uočili su umjerenu redukciju koncentracija VLDL-a i LDL-a kod transgenskih miševa s povećanom funkcijom EL, a uočeno je i smanjenje veličine i broja LDL čestica, međutim drugi autori nisu zabilježili značajne promjene vrijednosti LDL-a kod miševa s isključenim genom za EL (52,60, 67,68).

Kod ispitivanja utjecaja EL na serumske lipide kod pretilih muškaraca, uočena je pozitivna korelacija između visokih vrijednosti EL i povišenih vrijednosti kolesterola, LDL-a, triglicerida, apoB i VLDL kolesterola te istovremeno negativna korelacija između koncentracije EL i veličine LDL čestice. Vrijednosti plazmatske EL kod osoba s metaboličkim sindromom za 50% su više u odnosu na zdrave pojedince, što su dokazali i Potočnjak i suradnici određujući razinu endotelne lipaze u bolesnika s metaboličkim sindromom (58,69,70).

S druge strane, Trbušić i suradnici su uspoređivali vrijednosti endotelne lipaze u bolesnika s akutnim i kroničnim koronarnim sindromom. Jasne razlike između ove dvije skupine nisu dokazali ali su dokazali kako žene s AKS imaju značajno višu razinu EL u odnosu na muškarce. Potočnjak je dokazala kako žene sa srčanim zatajivanjem imaju višu razinu endotelne lipaze (70,71,72,73). Ovime se svakako postavlja pitanje na koji način spol determinira razinu, a možda i funkciju EL. Poznato je kako EL u nekoj mjeri eksprimiraju i izlučuju jajnici i testisi, ali nije poznato koliki udio ukupne cirkulirajuće EL izlučuju gonade. Potrebno je provesti još niz ispitivanja da bi se dobio točan odgovor zašto razlike u spolu pokazuju ovakvu varijabilnost u razini EL. U istom radu, nije dokazana korelacija razine EL s razinama HDL-a i LDL-a (71, 72).

### **1.3.3. Utjecaj endotelne lipaze na reverzni transport kolesterola**

Utjecaj endotelne lipaze na metabolizam lipida kod ljudi predmet je brojnih istraživanja; jedno od potencijalnih mjesta djelovanja je na mehanizam reverznog transporta kolesterola odnosno efluksa kolesterola iz makrofaga na HDL na koji EL ima dvojak učinak.

Yance i sur. dokazali su u staničnim kulturama da EL smanjuje efluks kolesterola putem SR-B1 za gotovo 90% te pojačava efluks iz makrofaga putem ABC-A1 za 63% što rezultira

nastankom manjih HDL čestica, a istovremeno svojom fosfolipaznom aktivnosti dovodi do promjene sastava i fizikalnih karakteristika HDL čineći ga česticom siromašnim lipidima te podložnim bržem katabolizmu (74). Dok su i drugi autori poput Jahangiri i sur. objavili slične učinke EL i njenog učinka na smanjenje veličine HDL čestica, oprečne rezultate dobili su Broedil i sur. koji su uočili da EL pojačava vezanje apoA-1 za makrofage te povećava efluks kolesterola (75,76). Endotelna lipaza sadrži vezna mjesta za heparan-sulfat proteoglikane, HDL i LDL čestice što predstavlja most između lipoproteina i endotelnih stanica, stimulirajući na taj način prijenos plazmatskih lipoproteina u stanice ne-enzimatskim mehanizmima (77). Dokaz toga nalazimo u činjenici da primjenom heparina detektiramo oslobađanje EL u plazmu te pojačanje i aktivnosti i razine EL s posljedičnim padom razine HDL-a (78).

Djelovanje EL u endotelnim stanicama jetre ima složene učinke; pojačanjem ekspresije EL dolazi do povećanog katabolizma apoA-1 i ubrzanog transporta estera kolesterola i HDL čestica u jetru putem SR-B1, međutim, dok je povećana koncentracija kolesterola u jetri, ne opaža se pojačana ekskrecija kolesterola putem žuči (63,78-81). Istraživanjima na miševima potvrđena je teza da EL smanjuje razinu HDL-a u plazmi te ju povisuje u jetri, no nema učinaka na RTK (81,82).

#### **1.3.4. Polimorfizam gena i regulacija ekspresije endotelne lipaze**

Otkrićem i istraživanjem učinaka EL, otkrivene su mutacije gena koje kodiraju EL, a u tijeku su istraživanja koja bi povezala pojedine polimorfizme s rizikom za pojedine kardiovaskularne događaje. Meta-analize pet velikih kohorti opisale su četiri najčešće varijante, polimorfizam *Thr111Ile* kao najčešću varijantu koja je povezana s uobičajenim razinama HDL-a te urednom funkcijom lipazne aktivnosti EL, dok rjeđa *Asn396Ser* inačica dovodi do gubitka funkcije EL te rezultira povišenim plazmatskim razinama HDL-a; varijante *Gly26Ser* i *Thr298Ser* veoma

su rijetke i dominantno opisane u populaciji Afroamerikanaca (83). Ova otkrića podupiru ideju o mogućoj terapijskoj inhibiciji EL u cilju podizanja razina HDL-a.

Opisani su višestruki biomehanički i biokemijski utjecaji koji reguliraju ekspresiju endotelne lipaze. Hirata i sur. u kulturama umbilikalnih i koronarnih endotelnih stanica dokazali su porast razine glasničke RNA endotelne lipaze (mRNA-EL) po utjecajem citokina i tlaka tekućine, a Shimokawa i sur. u animalnim modelima opisali su pojačanu ekspresiju endotelne lipaze u glatkim mišićnim stanicama aorte pod utjecajem angiotenzina II i arterijske hipertenzije (54, 66, 84).

Mjerenjem razine fosfolipazne i trigliceridazne aktivnosti u *in vitro* modelima, otkriveno je povećanje njihove aktivnosti primjenom citokina putem povećane ekspresije EL (56). *In vitro* studije s makrofazima porijeklom iz normalnih miševa i miševa koji ne kodiraju EL istraživao se utjecaj lipopolisaharida (LPS) na produkciju mRNA-EL; LPS čine jednu od glavnih komponentni stanične membrane endotelnih stanica i potiču produkciju citokina kojom reguliraju SR-A i TLR čime dovode do nakupljana LDL-a u makrofazima (84). Iako se smatralo da se neoksigenirani LDL (nLDL) ne nakuplja u makrofazima (zbog niskog broja receptora za LDL), izlaganjem makrofaga LPS-ima potiče ekspresiju mRNA-EL i ulazak nLDL-a u stanice putem TLR čime je postavljena hipoteza o funkciji EL u vezanju nLDL-a i makrofaga, za što nalazimo dodatnu potvrdu u činjenici da je vezanje nLDL-a i makrofaga inhibirano primjenom heparina putem HSPG (85,86). Ispitivanje učinaka statina na EL pokazalo je inhibiciju njezine ekspresije kao i smanjenje preuzimanja nLDL-a (87). Osim navedenih mehanizama regulacije EL, opisani su i posttranskripcijski mehanizmi; proprotein konvertaza igra ulogu u posttranskripcijskoj regulaciji inaktivirajući EL, a inhibitori proprotein konvertaze poput profurina dovode do pojačanja aktivnosti EL i redukcije razine plazmatskog HDL-a (86-88).

Otkriveni su i endogeni inhibitori EL poput angiopietinu nalik protein 3 (eng. *angiopietin-like 3 protein* – ANGPTL3) čija plazmatska koncentracija korelira s razinama HDL-a u ljudi, a za aktivaciju ovog proteina potrebna je proprotein konvertaza što indirektno regulira aktivnost EL i HDL-a u plazmi (89).

### **1.3.5. Povezanost endotelne lipaze, upale i ateroskleroze**

Analizom histoloških preparata aterosklerotskih plakova u aorti te bojanjem imunohistokemijskim metodama kod miševa bez gena koji kodira apolipoprotein-E, otkrivena je povećana ekspresija endotelne lipaze u makrofazima što navodi na zaključak da EL i izravno utječe na aterosklerozu stimulirajući adheziju monocita te njihovo infiltriranje stijenke krvne žile. (88) Kod miševa bez gena za EL dokazana je reducirana adhezija monocita na endotel čime je i smanjena infiltracija makrofaga kao i njihova mogućnost akumulacije i oksidacije LDL-a (91,92).

Azumi i sur. proveli su imunohistokemijsku analizu preparata koronarnih arterija u ljudi dobivenih obdukcijom te opisali pojačanu ekspresiju EL u stanicama endotela i glatkih mišićnih stanica tunike medije krvnih žila u osoba bez aterosklerotske bolesti koronarnih arterija, dok je u osoba s koronarnom aterosklerozom dodatno zabilježena pojačana ekspresija i u stanicama koje infiltriraju aterosklerotske plakove tj. u makrofazima; ovi rezultati upućuju na različite mehanizme kojima EL regulira proces ateroskleroze koronarnih arterija kao i metabolizam lipida u samoj stijenki krvne žile (93). U sličnom ispitivanju provedenom na preparatima karotidnih arterija dobivenih endarterektomijom, otkrivena je izražena ekspresija mRNA-EL u području između fibrozne kape plaka i njegove nekrotične jezgre koja je tipično bila gusto infiltrirana makrofazima, a najvišu razinu ekspresije mRNA-EL imali su



diferencirani makrofazi u odnosu na pjenušave stanice i monocite sugerirajući tako važnu ulogu EL u regulaciji staničnih elemenata aterosklerotskog plaka (94).

Ispitivanjem utjecaja hipolipemika na EL otkriveno je da atorvastatin reducira ekspresiju EL inhibirajući signalne puteve NF $\kappa$ B i jetreni X receptor  $\alpha$  (eng. *liver X receptor  $\alpha$*  – LXRA) (95).

Nezaobilazan je odnos ateroskleroze i upale, a istraživanja na ljudima ukazuju da EL i ovdje igra značajnu ulogu. Paradis i sur. istraživali su osobe s pretilosti i dokazali jasnu korelaciju plazmatskih razina EL i nekih upalnih parametara poput C-reaktivnog proteina (CRP), interleukina 6 (IL-6) i lipoprotein-vezane fosfolipaze A2 (eng. *lipoprotein-associated phospholipase A2* - Lp-PLA2), ali i korelaciju sa stupnjem pretilosti odnosno prisutnosti metaboličkog sindroma (69,70). Badelino i sur. istražujući populaciju od 858 zdravih pojedinaca, s pozitivnom obiteljskom anamnezom za koronarnu bolest, dokazali su izravnu korelaciju plazmatskih razina EL i upalnih parametara (visoko-osjetljivi CRP, IL-6, ICM etc.) (97).

Nedvojbena uloga medijatora upale u nastanku aterosklerotskog procesa, njihova povezanost s endotelnom lipazom pojašnjava začarani krug koji dovodi do razvoja aterosklerotskog plaka i njegovu potencijalnu destabilizaciju. Pronalaskom pojačane ekspresije EL u nestabilnom aterosklerotskom plaku zajedno s visokim razinama adhezijskih molekula i citokina poput VCAM1, E-selektina i IL-6 te poznatom sposobnosti EL da potiče lučenje proupalnih molekula u endotelu, endotelna lipaza mogla bi imati značajnu ulogu u destabilizaciji aterosklerotskog plaka (96 ,97).

## **1.4. HDL u procesu ateroskleroze**

### **1.4.1. Struktura HDL-a**

Kolesterol je nužan za normalnu funkciju i rad svih stanica dok stanje hiperkolesterolemije pridonosi nastanku ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Apolipoprotein A – 1 je osnovna proteinska komponenta HDLa koja je vrlo vjerojatno najvažnija determinanta funkcije HDL-a. HDL je mala, gusta čestica a u usporedbi s drugim lipoproteinima, bogata je proteinima, veličine je 8-10 nm, gustoće 1,063-1,21 g/mL. HDL je čestica sferičnog ili diskoidnog oblika s hidrofobnom jezgrom sastavljenom od estera kolesterola a koji su okruženi slojem fosfolipida, proteina i neesterificiranog kolesterola. Dugi niz godina HDL je bio u fokusu interesa zbog ateroprotektivnog učinka te su se ulagali naporu u farmakoterapiju koja bi dovela do efikasnog porasta razine HDL-a, a porast same razine istoga u kliničkim ispitivanjima nije se dokazao učinkovit kako se očekivalo. Nakon toga se utvrdilo da HDL ima različita svojstva koja ne ovise o razini HDL-a, a to su protuupalno, antioksidativno i antitrombogeno svojstvo, a svako od njih je vrlo vjerojatno genetski determinirano (98, 99).

### **1.4.2. HDL i kardiovaskularni rizik**

HDL regulira stanični efluks (izlazak) kolesterola te ga prenosi iz perifernih stanica u jetru te se iz jetre kolesterol izlučuje u žuč a potom i u probavnu cijev, te na taj način regulira razinu kolesterola u krvi zbog čega je uvriježen naziv istoga „dobri kolesterol“. Kroz posljednje stoljeće je u više studija opisivano kako razina HDL obrnuto proporcionalno korelira s kardiovaskularnim rizikom te je isto uvriježeno u kliničkoj praksi. Naime, brojne studije su provedene u cilju podizanja razine HDL-a, između ostalog i farmakološke kliničke studije, a

iste nisu pokazale kako povišena razina HDL-a pridonosi sniženom kardiovaskularnom riziku. Shodno tome počelo se promišljati o funkciji HDL-a, kao i njegovoj strukturi i karakteristikama HDL-a koje doprinose njegovom ateroprotektivnom djelovanju a ne samo koncentraciji, kao takvoj, odnosno, počelo se razmišljati o kvaliteti HDL-a a ne samo kvantiteti.

Definicija HDL-a kao dobrog kolesterola proizašla je krajem 1980.-ih iz Framinghamske studije koja je tada pokazala kako su niske razine HDL-a nezavisni čimbenik rizika za koronarnu bolest srca (11). Ova opservacija, sada, nakon više od 40 godina se dovodi u pitanje – je li razina HDL-a bila samo marker neke priležeće bolesti ili igra ulogu u nastanku aterosklerotske koronarne bolesti.

Kroz posljednja dva desetljeća proveden je velik broj genetičkih studija kao i randomiziranih kliničkih ispitivanja, rezultati kojih ipak govore u prilog da razina HDL-a nije nezavisan čimbenik nastanka KV bolesti već da je posljedica drugih čimbenika, možda i same strukture i funkcije HDL-a. Rezultati dvije odvojene / nezavisne Medelian Randomizacijske studije koje su uključile više od 165 000 bolesnika nisu dokazale povezanost HDL-a i rizika za akutni srčani infarkt unatoč uvriježenom mišljenju o obrnuto proporcionalnoj povezanosti HDL-a s rizikom od AKS (100, 101). Ovo otkriće je, jasno, dovelo do kontroverzi u ranijem razmišljanju kako bi eventualno povećanje razine HDL-a dovelo do kliničkog boljitka u smislu snižavanja KV rizika. Najpoznatiji neuspjeh kliničkog ispitivanja u svrhu pokušaja povećanja razine HDL-a je ILLUMINATE studija (The Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events). ILLUMINATE studija je uključivala preko 15000 bolesnika s povišenim kardiovaskularnim rizikom a koji su primali torcetrapib, inhibitor kolesterol ester transfer proteina – enzima koji transferira (prenosi) estere kolesterola iz HDL-a u VLDL/LDL. Premda je isti lijek kod ispitanika povisio razinu HDL-a za više od 70%, ista studija se prijevremeno morala prekinuti zbog visokog broja neželjenih kardiovaskularnih incidenata i mortaliteta, moguće zbog „off target“ učinka na aldosteron i krvni tlak (98,102).

Još dvije studije dal-OUTCOMES (dalcetrapib) i ACCELERATE (evacetrapib) (Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition with Evacetrapib in Patients at a High Risk for Vascular Outcomes) koje su imale jednaku ideju s konceptom inhibicije CTEP-a, ali drugačijim aktivnim lijekom, nisu uspjele dokazati benefit povišavanja razine HDLa u prevenciji kardiovaskularnih incidenata (103-105). U skladu s navedenim predmet interesa više nije razina HDL-a već njegova struktura i funkcija.

### **1.4.3. Uloga HDL-a**

HDL je vrlo kompleksna čestica koja kroz cirkulaciju tijelom prolazi dinamički ciklus remodelacije potaknut interakcijom enzima i tkiva čineći ulogu HDL-a kompleksnom a njegova funkcija je složenija nego li se ranije smatralo (104). Qiu i suradnici su objavili rezultate meta-analize kojom su dokazali kako HDL dakako ima kardioprotektivno svojstvo ali isto proizlazi iz njegovog utjecaja na reverzni transport kolesterola, odnosno kapaciteta prihvaćanja kolesterola iz makrofaga, a ne ovisi o plazmatskoj razini HDL-a (92, 95, 105).

Za sada, najpoznatija uloga HDL-a je, već ranije spomenut, reverzni transport kolesterola za koji se smatra da je ključ ateroprotektivne uloge. Kolesterol se iz makrofaga veže preko ABC - A1 na lipidima siromašan apoA-1, potom se kolesterol modificira uz LCAT u ester kolesterola da bi se naposljetku vezao na HDL. Ulazak estera kolesterola u hidrofobnu jezgru lipoproteinske čestice uzrokuje stvaranje sferičnog HDL2 i HDL3 koji su zrele čestice, bogate kolesterolom te se postupno kao takve uklanjaju iz cirkulacije hepatocitima i kroz bilijarno stablo u tanko crijevo, da bi se u konačnici stolicom izlučile iz organizma (104-109). Osim reverznog transporta kolesterola, HDL ima i pleiotropne učinke a to su; antioksidativni, protuupalni i antitrombotički učinak. Pleiotropna svojstva HDL-a se smatraju odgovornima za ateroprotektivni učinak jer ograničavaju ozljedu endotela inhibicijom upale.

Antioksidativni učinak HDLa je sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i oksidiranih molekula za koje je poznat direktan štetan učinak na staničnu stijenkku. Hilomikroni, VLDL i LDL su lipoproteini koji sadrže apoB te intenzivno i aktivno sudjeluju u nastanku aterosklerotskog plaka. LDL se na arterijskom endotelu oksidira uz pomoć mijeloperoksidaze (eng. *myeloperoxidase* - MPO), NO sintaze i lipooksigenaze te dolazi do nakupljanja lipidnog hidroperoksida i oksidiranog LDL-a (106-109). Oksidirani LDL ulazi u makrofag koji postaje pjenušava stanica a postupnim porastom broja pjenušavih makrofaga raste i veličina aterosklerotskog plaka. Proteinske i lipidne komponente HDL-a inhibiraju nakupljanje lipidnih hidroperoksida u LDL-u i na taj način preveniraju oksidaciju LDL-a i neutraliziraju proaterogeni učinak LDL-a. Ovo svojstvo HDL-a je regulirano lipidnim sastavom i rigidnošću površine HDL-a koji su determinirani različitim omjerima zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, sfingomijelina i fosfatidilkolina (110,111). Čini se da je ApoA-1 najbitniji protein HDLa koji neutralizira lipidnu hidroperoksidazu s LDLa ali i dobar dio ostalih proteinskih komponenti sudjeluje u održavanju antioksidativne uloge HDL-a. Lipidni i proteinski dio HDLa čine jednako bitan strukturalni element za održavanje antiaterogene uloge HDL-a (108,112). Protuupalno svojstvo, koliko se zna, možda je najkompleksnije svojstvo HDL-a a isprepliću se utjecaji na funkciju makrofaga, mitohondrija te direktna supresija IL-6, TNF-  $\alpha$  (eng. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), IFN-  $\gamma$ , i drugih proinflamatornih posrednika (104,109-113). U slučaju infekcije, posebice gram negativnim bakterijama, otpušta se lipopolisaharid koji uzrokuje otpuštanje proinflamatornih citokina odgovornih za cijelu patofiziologiju i kliničku sliku upalnog stanja. Gram pozitivne bakterije otpuštaju lipotekoičnu kiselinu, koja vrlo slično lipopolisaharidu uzrokuje daljnju aktivaciju upalnog odgovora. HDL ima sposobnost inhibicije inicijalnog procesa ovakvog oblika upale, na način da se veže na lipoproteinsku komponentu lipopolisaharida te prevenira brzo i snažno otpuštanje svih proupalnih medijatora potaknutih lipopolisaharidom (112-114). Makrofazi su stanice koje imaju višestruke uloge, ovisno o lozi,

imaju i različite uloge. Tako imaju ulogu u regulaciji imuniteta, upale i metabolizma lipida, a sama loza, odnosno fenotip makrofaga, prvenstveno ovisi o njihovom okruženju. Na temelju funkcije i morfologije bitni su makrofazi M1 i M2 (114,115). M1 makrofazi su proinflamatorni, izlučuju inflamatorne medijatore a aktiviraju se lipopolisaharidom, interleukinom – 2 i TNF- $\alpha$ .

Takva loza makrofaga stimulira iNOS (eng. *inducible nitric oxide synthase*), stimulira stvaranje reaktivnih kisikovih radikala. M2 makrofazi imaju ulogu u procesu cijeljenja i rezoluciji upale te se aktiviraju uz glukokortikoidne hormone i interleukin – 4 (IL-4), interleukin – 10 (IL – 10), interleukin – 13 ( IL – 13) (99-101). HDL stimulira stvaranje antiinflamatorne, M2 loze makrofaga te i na ovakav, direktan način pokazuje svoju protuupalnu ulogu (113,114).

Eksperimentalne studije pokazale su kako HDL povećava sintezu dušikovog oksida iz endotelnih stanica, inhibira agregaciju trombocita kao i ekspresiju tkivnog faktora koji je poznati protrombogeni čimbenik (114).

Holy i suradnici su istraživali učinak HDL-a na ekspresiju i aktivnost čimbenika tromboze i fibrinolize *in vitro*, na ljudskim endotelnim stanicama aorte, kao i učinak HDL-a na stvaranje arterijskog tromba *in vivo* na miševima (115). Uspoređivali su svojstva HDL-a u bolesnika s koronarnom bolešću i u zdravih pojedinaca bez poznate kardiovaskularne bolesti. Dokazali su kako bolesnici s koronarnom bolešću imaju značajno narušeno antitrombotsko svojstvo HDL-a te povećava stvaranje arterijske tromboze *in-vitro*, u odnosu na bolesnike bez poznatih kardiovaskularnih komorbiditeta.

Uzevši u obzir sve navedeno, započela je nova era istraživanja HDL-a kao kardioprotektivne čestice. Uz vrlo kompleksnu strukturu koju čine proteini, enzimi, kiseline i masti; svaka od pojedinih komponenata ima svoju potencijalnu ulogu koje su predmet istraživanja.

Ne može se zanijekati genetska i strukturalna raznolikost svakog pojedinca, jednako tako i HDL-a, a svaka od tih raznolikosti može doprinijeti specifičnim proteomskim, lipidomskim i fizikalno-kemijskim razlikama u funkcijama.

## **2. HIPOTEZA**

Serumska razina endotelne lipaze, funkcionalne i strukturalne osobitosti HDL-a negativno koreliraju s težinom kliničke prezentacije koronarne bolesti.



## **3. CILJEVI RADA**

### **3.1 Opći cilj**

Cilj studije jest ispitati koncentraciju endotelne lipaze te funkcionalne osobine HDL-a u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i njegovih podskupina: nestabilna angina pektoris, akutni infarkt srca s elevacijom ST segmenta i akutni infarkt srca bez elevacije ST segmenta.

### **3.2 Specifični ciljevi**

1. Odrediti koncentraciju EL u serumu bolesnika s AKS te ih usporediti s vrijednostima u bolesnika sa stabilnom anginom pektoris koji imaju indikaciju za dijagnostičku koronarografiju.
2. Utvrditi postoji li korelacija razine EL sa stupnjem težine koronarne bolesti
3. Utvrditi može li koncentracija EL služiti kao biomarker i/ili prediktor progresije koronarne bolesti srca
4. Odrediti funkcionalne karakteristike HDL-a u bolesnika s AKS i stabilnom koronarnom bolešću te ih međusobno usporediti
5. Odrediti postoji li korelacija koncentracije EL s razinom i funkcijom HDL-a

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Uzorak i dizajn studije**

Ova disertacija je izrađena na Klinici za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice a proizašla je kao rezultat znanstvene suradnje Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Medicinskog Univerziteta u Grazu, Gottfried Schatz istraživačkog centra, Odjela molekularne biologije i biokemije. Ova studija izrađena je kao jednocentrična, presječna, populacijska, opservacijska studija, bez predviđenog praćenja bolesnika.

Promatrane su dvije skupine bolesnika, pri čemu su bolesnici s akutnim koronarnim sindromom regrutirani u Odjelu hitne medicinske službe, a bolesnici sa stabilnom koronarnom bolesti u Zavodu za kardiologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, u razdoblju od 1. prosinca 2011.godine do 1. prosinca 2012.godine. Svi sudionici istraživanja potpisali su informirani pristanak prije uključivanja u studiju u skladu s Helsinškom deklaracijom i principima dobre kliničke prakse. Studiju su odobrila Etička povjerenstva KBC Sestre milosrdnice kao i Univerziteta u Grazu u skladu s vlastitim institucionalnim smjernicama.

### **4.2. Uključni kriteriji**

U istraživanje je uključeno ukupno 226 bolesnika s akutnim koronarnim sindromom dok je u kontrolnu skupinu uključeno 111 bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti (eng. *stable coronary artery disease* - sCAD). Kriteriji uključivanja uvjetovali su da su bolesnici stariji od 18 godina, da je bolesnik odnosno skrbnik bolesnika informiran o prirodi kliničke studije te da je dao informirani pristanak koji je odobren od strane nadležnog etičkog povjerenstva, a da su bolesnici uključivani

u studiju kontinuiranim redosljedom od početka trajanja studije do ispunjenja potrebnog broja bolesnika.

Bolesnici s AKS selekcionirani su temeljem važećih smjernica za AKS, bilo temeljem tipičnih simptoma nestabilne koronarne bolesti, zabilježenim porastom markera nekroze miocita (srčani troponin I i/ili kreatin kinaza), promjenama u elektrokardiografskom zapisu i/ili slikovnim metodama dokazan novonastali gubitak vijabilnosti miocita odnosno regionalnih poremećaja kontraktiliteta (116). Kod svih bolesnika učinjena je koronarografija, pri čemu je kod 90% bolesnika ona izvedena transradijalnim pristupom, dok je kod ostalih učinjena koristeći femoralni ili brahijalni pristup. Vremenski intervali u kojima je koronarografija učinjena, bila je u skladu sa smjericama Europskog kardiološkog društva; unutar dva sata za bolesnike sa STEMI, 2 sata do 3 dana za ostale bolesnike s akutnim koronarnim sindromom, odnosno bez vremenskog ograničenja za bolesnike sa stabilnom koronarnom bolesti (49,117).

### **4.3. Isključni kriteriji**

Isključni kriteriji bili su bolesnikovo odbijanje ili povlačenje suglasnosti za sudjelovanje u istraživanju ili odbijanje koronarografije, a isključivali su se i bolesnici s alergijom na kontrastno jodno sredstvo, bolesnici sa srčanim popuštanjem i reduciranom istisnom frakcijom lijeve klijetke ispod 40%, bolesnici s akutnom disekcijom aorte, renalnom insuficijencijom i serumskim kreatininom  $\geq 200$  mmol/L te kroničnim autoimunim ili infektivnim bolestima te dekompenziranom cirozom jetre (Child-Pugh klasa B i C).

#### **4.4. Anamneza, terapija i kliničke karakteristike ispitanika**

Tijekom prikupljanja podataka o bolesnicima, između ostalog, prikupljene su i demografske karakteristike. Osobita pozornost posvećena je prikupljanju podataka o simptomima kako bi se točno klasificirala podvrsta koronarne bolesti, kao i rizični čimbenici za razvoj aterosklerotske bolesti i lijekovi koje su bolesnici koristili u trenutku uključivanja u studiju. Anamnestički podatci su uključivali podatke iz obiteljske anamneze (prisustvo kronične bolesti srca i cerebrovaskularne bolesti kod krvnog srodnika u prvom koljenu, a koji je mlađi od 55 godina), iz osobne anamneze (od ranije poznata šećerna bolest, hipertenzija, dislipidemija, ranije preboljeli infarkt srca, simptomi periferne vaskularne bolesti te navika pušenja cigareta). U kliničkom statusu određeni su vitalni parametri koji su uključivali krvni tlak, puls, frekvenciju disanja, tjelesnu temperaturu i za svakog je bolesnika izračunat indeks tjelesne mase (ITM) po Quereletovoj formuli te izražen u jedinici  $\text{kg/m}^2$ .

Dijagnoza arterijske hipertenzije postavljena je temeljem smjernica za arterijsku hipertenziju Europskog kardiološkog društva (118), kao prosjek tri uzastopna mjerenja živinim sfingomanometrom, a definirana je kao vrijednost sistoličkog arterijskog tlaka  $\geq 140$  mmHg odnosno vrijednost dijastoličkog arterijskog tlaka  $\geq 90$  mmHg, kao i podatka o već započetoj antihipertenzivnoj terapiji. Dijagnoza šećerne bolesti postavljena je ukoliko je glikemija na tašte iznosila više od 7 mmol/L ili ukoliko je bolesnik koristio oralne hipoglikemike (ili inzulin) kao i ukoliko su ispitanici bili na prehrani prilagođenoj za šećernu bolest. Hiperlipidemija je dijagnosticirana ako je koncentracija lipoproteina niske gustoće  $> 3,5$  mmol/L, ili ako bolesnik već uzima lijekove za snižavanje razine lipida.

Metabolički sindrom je definiran prema kriterijima Internacionalne dijabetičke federacije (eng. *International Diabetes Federation – IDF*) iz 2005. godine, revidiran 2022. a uključuje proširen opseg struka (za Europljane bijele rase - muškarci  $\geq 102$  cm, za žene  $\geq 88$  cm) uz zadovoljena još dva kriterija: trigliceridi  $> 1,7$  mmol/L, HDL  $< 1,03$  mmol/L u muškaraca ili  $< 1,29$  mmol/L u žena (ili već započeto liječenje zbog abnormalnih vrijednosti lipida), sistolički krvni tlak  $> 130$  mmHg, dijastolički krvni tlak  $> 85$  mmHg (ili već započeto liječenje hipertenzije) te razina glukoze u krvi na tašte  $> 5,6$  mmol/L (ili već ranije dijagnosticirana šećerna bolest tip 2).

Vezano uz naviku pušenja cigareta, ispitanici su klasificirani u tri skupine; trenutni pušač (ukoliko puši najmanje 5 cigareta dnevno u posljednja 3 mjeseca), bivši pušač (ako ne puši dulje od 3 mjeseca, a kraće od 10 godina) i kao nepušač (ukoliko nikada nije pušio ili ako nije pušio u posljednjih 10 godina). Kod svih bolesnika evidentiran je i srčani ritam temeljem elektrokardiografskog zapisa.

#### **4.5. Elektrokardiogram, slikovne metode i angiografija koronarnih arterija**

Elektrokardiogram i slikovne metode koje su uključivale radiogram srca i pluća, ehokardiografski pregled te angiografija koronarnih arterija učinjeni su kao uobičajeni dijagnostički i terapijski postupci prema protokolu liječenja bolesnika s koronarnom bolesti KBC Sestre milosrdnice.

Svi koronarni angiogrami pregledani su od strane dva neovisna interventna kardiologa koji nisu imali kliničke informacije o bolesniku. Težina koronarne bolesti procijenjena je temeljem brojem i stupnjem stenoza koronarnih arterija te vrijednosti modificiranog GENSINI sustava. Modificirani GENSINI sustav klasificira i karakterizira težinu i opseg koronarne bolesti; podjela koronarnog optoka na 27 segmenata pri čemu je postojanje aterosklerotskog plaka na svakom pojedinom

segmentu označeno vrijednošću od 0,5 do 5 (ovisno o važnosti pojedinog segmenta arterije, npr. zahvaćenost debla lijeve koronarne arterije označena je s vrijednosti 5, proksimalnog segmenta LAD s 2,5, a zahvaćenost druge dijagonalne grane s 0,5), dok se svaka pojedina stenoza dodatno vrednuje ovisno o njezinom stupnju, pri čemu je stenoza manje od 25% radijusa arterije označena s vrijednosti 2, od 26% do 50% s vrijednosti 4, od 51% od 75% s vrijednosti 8, od 76% do 90% s 16, 91% do 99% s vrijednosti 32, a potpuna okluzija arterije nosi vrijednost 64. Ovom klasifikacijom omogućeno je kvantificirati težinu koronarne bolesti svakog pojedinog bolesnika, uzimajući u obzir lokalizaciju i težinu svih aterosklerotskih promjena koronarnih arterija.

#### **4.6. Laboratorijska analiza krvi**

Uzorkovanje krvi ispitanika u studiji ovisilo je o prezentaciji koronarne bolesti. Za bolesnike koji su se prezentirali s akutnim koronarnim sindromom, uzorci krvi uzeti su tijekom obrade u Odjelu hitnog prijema, dok su za bolesnike sa stabilnom koronarnom bolesti uzimani ujutro, dan nakon prijema na tašte. Zabilježene varijabilnosti u vrijednostima uzoraka rezultat su vremenskog odmaka od početka simptoma do uzorkovanja krvi, pri čemu je kod bolesnika sa srčanim infarktom sa ST elevacijom prosječno vrijeme trajanja simptoma do početka obrade u Hitnoj službi u prosjeku bilo 3 sata i 35 minuta, dok je za bolesnike sa srčanim infarktom bez ST elevacije i nestabilnom anginom pektoris variralo od nekoliko sati do nekoliko dana s obzirom na često nejasan početak simptoma zbog naravi same bolesti (rekurirajuća bol, nejasni trenutak početka simptoma).

Uzorci periferne venske krvi uzeti su bolesnicima s AKS kao i ispitanicima u kontrolnoj skupini sa sCAD neposredno prije koronarografije (uz napomenu da su bolesnici bili bez obroka 10-12

sati prije same koronarografije). Uzorci krvi za standardne hematološke pretrage prikupljeni su u epruvete s etilen-diamin-tetraoctenom kiselinom (EDTA)–K3 te obrađeni u analizatoru (Coulter-Counter S plus junior, Coulter Electornics Limited, Luton, UK). Krv za određivanje koagulacijskih parametara prikupljena je u epruvete s 3,8% natrijevim-citratom, a nakon odvajanja seruma centrifugiranjem (3000 okretaja u minuti kroz 10 minuta) određeno je aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTV) Quickovim testom (Dade Behring, Marburg, Njemačka). Standardne biokemijske pretrage (kreatinin, glukoza u krvi, ukupni kolesterol, trigliceridi, LDL, HDL) obrađene su automatski u analizatoru (Olympus AU2700 and Olympus Fractoscan junior, Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Njemačka). Vrijednosti visoko osjetljivog CRP-a (eng. *high sensitive C reactive protein* - hsCRP) određena je u uređaju Modular (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) a IL-6 uz specifičnu kemiluminescentnu ELISA–u (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) (QuantiGlo; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Njemačka).

Za potrebe specifičnih laboratorijskih pretrage uzorkovane su dvije epruvete pune krvi (ukupno 12 mL) svakog ispitanika, a nakon odvajanja seruma centrifugiranjem, u 5 zasebnih epruveta odvojeno je po 1 mL (ukupno 5mL) istog te su uzorci smrznuti na – 30°C i čuvani u laboratoriju do transporta. Kako određivanje razine EL, IL-6 i izolacija HDL-a nisu dio rutinske laboratorijske obrade, isto je učinjeno u suradnji s Institutom za molekularnu biologiju, biokemiju i mikrobiologiju, Sveučilišta u Grazu.

Sa smrznutim uzorcima seruma postupalo se prema protokolu u dogovoru i prema uputama Instituta za molekularnu biologiju, biokemiju i mikrobiologiju, Sveučilišta u Grazu. Transport je proveden na suhom ledu (-80°C), po dogovorenim i detaljno utvrđenim laboratorijskim smjernicama te su uzorci do obrade skladišteni na -80°C.

Koncentracija EL u serumu (pg/mL) mjerena je pomoću Human Endothelial Lipase Assay Kit (TaKaRa, Takara Bio Europe S.A.S., Saint-Germain-en-Laye, Francuska) prema uputama proizvođača. Koncentracija IL-6 (pg/mL) mjerena je upotrebom specifične kemoluminiscentne ELISA-e (QuantiGlo; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Njemačka) prema uputama proizvođača.

HDL je iz plazme izoliran klasičnim protokolom sekvencijalnog ultracentrifugiranja plazme gradijentom gustoće, uz dodatak kalijevog bromida. Plazma ispitanika je tretirana kalijevim bromidom kako bi se dobila otopina 1,24g/mL. Ovako tretirana plazma postavljena je u centrifugne cijevi (16x76mm, Beckman) potom je dodana nova otopina 1,063 g/mL kalijevog bromida kako bi se generirao dvostupanjski gradijent. Cijevi su zatvorene i centrifugirane na 65.000 okretaja u minuti, tijekom 4 sata u rotoru fiksnog kuta 90Ti (Beckman Instruments, Krefeld, Njemačka). Nakon centrifugiranja, frakcija koja sadrži HDL je prikupljena, očišćena putem PD10 stupaca (GE Healthcare, Beč, Austrija) i odmah pohranjen na 4 °C te iskorištena u roku od 2 tjedna.

Funkcionalne osobitosti HDL-a procijenjene su u serumu siromašnom apolipoproteinom B. ApoB siromašan serum pripremljen je dodavanjem 40 µL polietilenglikola (20% u 200 mmol/L glicinovom puferu) u 100 µL seruma, potom je serum inkubiran na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta, a supernatant je prikupljen nakon centrifugiranja (10 000 okretaja kroz 20minuta, 4°C).

Efluks kolesterola je mjerena na J774 mišjim makrofagima uzgojenim u 10% FBS DMEM mediju (eng. fetal bovine serum, Dulbecco's modified eagle medium), postavljenima na 48 mikrotitracijsku ploču. Stanice su označene tijekom 24 sata 1 µCi/mL [3H]-kolesterolom u 2% FBS DMEM mediju (Perkin Elmer, Boston, MA, SAD) u prisutnosti 0,3 mmol/L 8-(4-



klorofeniltio)-cikličkog AMP-a (Sigma, Darmstadt, Njemačka). Nakon označavanja, stanice su oprane, inkubirane tijekom 3 sata s 2,8% apoB siromašnim serumom te je određen efluks [3H]-kolesterola. Efluks kolesterola izražen je kao omjer radioaktivnosti u mediju i ukupne radioaktivnosti u mediju i stanicama. Svi koraci izvedeni su u prisutnosti 2 µg/mL inhibitora acilkoenzima A: kolesteril aciltransferaze (Sandoz 58-035, Sigma, Darmstadt, Njemačka).

Protuupalna aktivnost određena je indirektno, određivanjem stupnja inhibicije NF-κB u U937 monocitima. U937 su promonocitne stanice koje su prvi put izolirane iz histiocitnog limfoma 37-godišnje žene. Ovakav tip monocita se koristi u određivanju svojstava makrofaga jer su prekursori makrofaga, te nakon diferencijacije u makrofage zadržavaju sve njihove funkcionalne značajke (119). Korišteni U937 monociti su genetski modificirani na način da proizvode zeleni fluorescentni protein pod kontrolom NF-κB promotora. Isti su uzgajani u RPMI 1640 mediju (eng. Roswell Park Memorial Institute) uz dodatak 7,5% FBS u 1,1 mililitarskim cijevima (Bioquote, York, UK) (25.000 stanica/cijev). Stanice su bile prethodno tretirane 1,5 sat s 7% apoB-siromašnim serumom ili s 50 µg/mL izoliranog HDL-a, nakon čega im je dodan lipopolisaharid (50 ng/mL) (Sigma, Darmstadt, Njemačka). Stanice su zatim prikupljene centrifugiranjem pri 400 g tijekom 7 minuta i fiksirane s 100 µL BD CellFIX otopinom (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD). Stupanj aktivacije NF-κB-a procijenjen je protočnom citometrijom.

Antioksidativna aktivnost mjerena je dodavanjem apoB siromašnog seruma u mješavinu dihidrorodamina i HEPES pufera (eng. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid).

Dihidrorodamin (DHR) je korišten kao pokazatelj antioksidativnog kapaciteta : mjerila se fluorescencija kako bi se pratila oksidacija DHR-a, što ukazuje na razinu antioksidativne aktivnosti seruma.

DHR je dodan u DMSO-u kako bi se pripremila otopina od 50 mmol/L, koja je zatim stavljena u HEPES (20 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH 7,4) kako bi se dobio radni reagens od 50  $\mu$ mol/L. U 384-mikrotitracijsku ploču stavljen je po 1  $\mu$ L apoB-depletiranog seruma, dodano je 15  $\mu$ L radnog reagensa DHR-a, te je volumen dopunjen do 100  $\mu$ L HEPES puferom. Povećanje fluorescencije zbog oksidacije DHR-a mjereno je svake 2 minute tijekom jednog sata na valnoj duljini od 538 nm. Povećanje fluorescencije po minuti određeno je za uzorke koji sadrže samo DHR, te za uzorke koji sadrže i DHR i apoB-depletirani serum.

## 4.7. Statistička analiza

Rezultati studije prikazani su deskriptivno, grafički i tabelarno. Kategorijske varijable prikazane su kao postotak, dok su kontinuirane varijable prikazane kao broj, uz vrijednost standardne devijacije te minimalne i maksimalne vrijednosti. Normalnost distribucije podataka analizirana je Smirnov-Kolmogorovljevim testom. Za usporedbu značajki bolesnika, minimalnih, srednjih i maksimalnih vrijednosti pojedinih parametara korišteni su parametrijski *t-test* te neparametrijski  $\chi^2$ -*test* i Mann-Whitney test, ovisno o normalnosti distribucije podataka. Za procjenu prediktivne vrijednosti pojedinih parametara korištena je Coxova regresijska analiza. ROC (eng. *receiver operator characteristics*) analiza korištena je za pronalaženje optimalne vrijednosti IL-6 i endotelne lipaze kod bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Binarna logistička regresija korištena je procjenu utjecaja pojedinih faktora na vjerojatnost akutnog koronarnog sindroma. Za korisnost upotrebe određenih parametara u procjeni težine koronarne bolesti korišten je izračun Spearmanovog i Pearsonovog koeficijenta korelacije, a sve vrijednosti  $p < 0,05$  smatraju se statistički značajnima. Statistička analiza učinjena je uporabom licenciranog statističkog programa SPSS®.

Za potrebe izračuna veličine populacijskog uzorka potrebne za ispitivanje učinjena je *power analiza*; obzirom da primarna hipoteza istražuje povezanost dvaju numeričkih obilježja kod dvije skupine bolesnika, snaga studije izračunata je uz uvjet vrijednosti Pearsonovog koeficijenta korelacije  $r \geq 0,5$  uz razinu značajnosti 5% ( $p < 0,05$ ) i snagu testa od najmanje 95%, čime je dobiveno da je najmanji potreban uzorak za pojedinu skupinu bolesnika 105. U analizi snage testa je korištena programska podrška G\*Power za Windows 3.1.7.

## **5. REZULTATI**

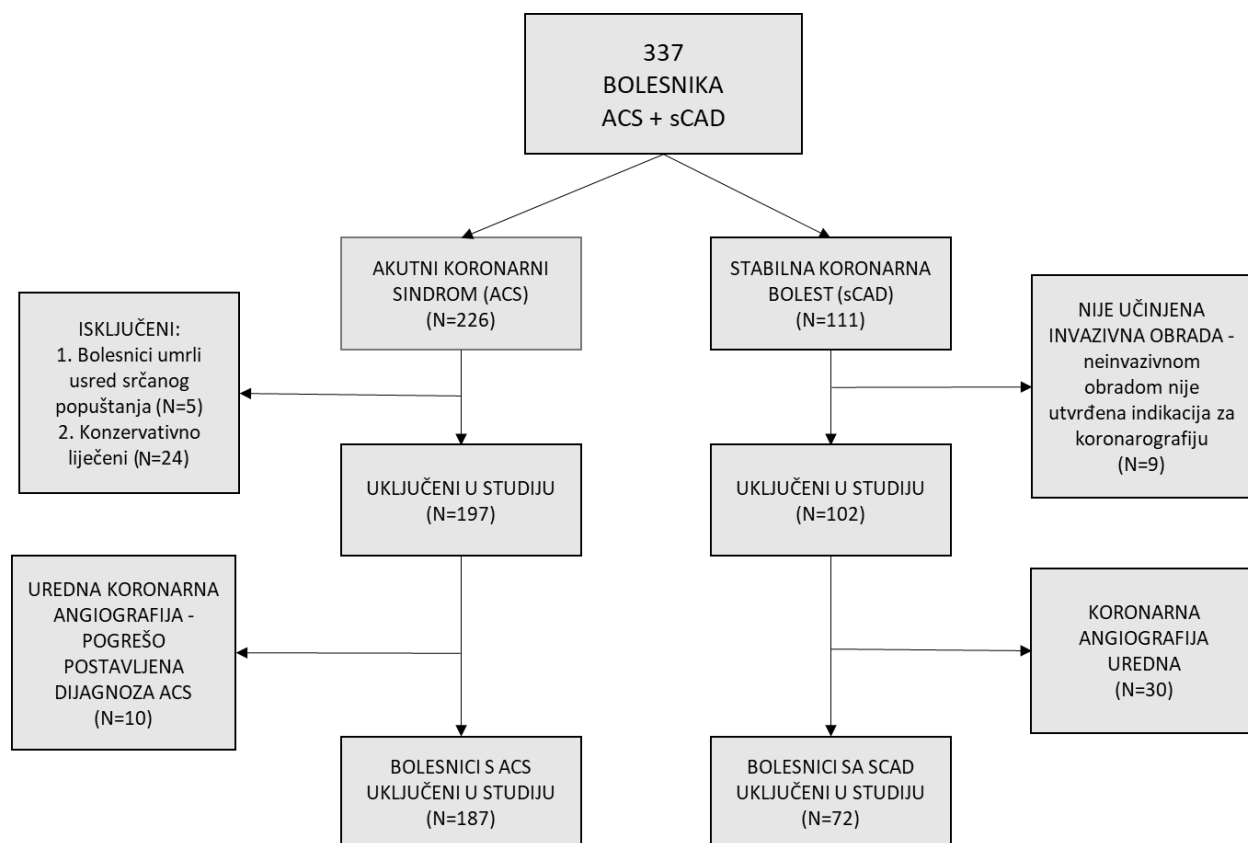
### **5.1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika**

U studiju je inicijalno uključeno ukupno 337 bolesnika, pri čemu je 226 bolesnika bilo uključeno u skupini s akutnim koronarnim sindromom, a 111 bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti kao kontrolna skupina.

U skupini bolesnika s AKS 29 bolesnika isključeno je iz studije zbog postojanja isključivih kriterija, pri čemu je 5 bolesnika preminulo uslijed akutnog srčanog popuštanja, a 24 bolesnika liječeni su konzervativno zbog pridruženih komorbiditeta zbog kojih invazivna obrada i interventno liječenje nisu bili indicirani. Kod 10 bolesnika koronarnom angiografijom isključeno je postojanje opstruktivne koronarne bolesti, te su naknadno isključeni iz ispitivanja. Iako je broj bolesnika s AKS pregledanih u hitnoj službi KBC Sestara milosrdnica u istraživanom razdoblju bio veći, određeni dio bolesnika nije ni uključivan u studiju ukoliko su već pri inicijalnoj obradi imali neki od isključujućih čimbenika poput značajne renalne insuficijencije ili dekompenzirane jetrene ciroze zbog čega je broj isključenih iz studije manji nego što bi bilo očekivano.

Nakon isključivanja ovih 39 bolesnika u promatranoj skupini bolesnika s AKS, ostalo je 187 bolesnika. (Slika 1.)

U kontrolnoj skupini uključeno je ukupno 111 bolesnika sa sCAD. Dok u 9 bolesnika iz skupine nije potvrđena indikacija za koronarnu angiografiju, u 30 bolesnika opisan je uredan nalaz koronarne angiografije čime je i isključena dijagnoza opstruktivne sCAD. (Slika 1.)



Slika 1. Hodogram regrutiranja ispitanika. Inicijalno je uključeno 226 AKS bolesnika i 111 sCAD bolesnika, nakon učinjene koronarografije neki bolesnici su isključeni iz istraživanja uslijed krivo postavljene inicijalne dijagnoze.

U skupini bolesnika s AKS, muškarci čine 69% ispitanika ( $n=129$ ), dok su žene bile zastupljene s 31% ( $n=58$ ). Medijan dobi ispitanika bio je 65 godina (raspon od 36 godina do 88 godina). U skupini bolesnika sa sCAD također su dominirali muškarci sa 63.9% ukupnog broja ( $n=46$ ), a medijan dobi iznosio je 64 godine (s rasponom od 40 do 87 godina). Razlike između skupina i prema spolu i prema dobi nisu bile statistički značajne. (Tablica 1)

Među bolesnicima s AKS, ukupno 90,4% ( $n=169$ ) ih je primljeno pod dijagnozom akutnog infarkta miokarda sa ST elevacijom, a 6,4% ( $n=12$ ) pod dijagnozom srčanog infarkta bez ST elevacije, dok

je nestabilna angina pectoris činila samo 3,2% bolesnika (n=6), a razlike između skupina statistički su značajne ( $p < 0,001$ ). Kod bolesnika sa STEMI, najčešća lokalizacija infarkta bila je inferiorna i inferoposteriorna čineći ukupno 52,9% (n=91), dok ju po učestalosti slijede anteroseptalna i anteroseptolateralna s 33,7% (n=58), dok se 7,6% (n=13) bolesnika prezentiralo i s infarktom desnog ventrikla. (Tablica 1)

Tablica 1. Opće karakteristike ispitanika

		SKUPINE				p
		AKS		sCAD		
		N	%	N	%	
<b>Spol</b>	MUŠKO	129	69,0%	46	63,9%	0,433
	ŽENSKO	58	31,0%	26	36,1%	
<b>TIP AKS-a</b>	STEMI	169	90,4%	36	50,0%	<0,001
	NSTEMI	12	6,4%	36	50,0%	
	nAP	6	3,2%	0	0%	
<b>Anteroseptalni MI</b>	DA	38	22,1%	0	0%	
	NE	134	77,9%	0	0%	
<b>Anteroseptolateralni MI</b>	DA	20	11,6%	0	0%	
	NE	152	88,4%	0	0%	
<b>Inferiorni MI</b>	DA	54	31,4%	0	0%	
	NE	118	68,6%	0	0%	
<b>Inferoposteriorni MI</b>	DA	37	21,5%	0	0%	
	NE	135	78,5%	0	0%	
<b>Posterolateralni MI</b>	DA	19	11,0%	0	0%	
	NE	153	89,0%	0	0%	
<b>Anterolateralni MI</b>	DA	12	7,0%	0	0%	
	NE	160	93,0%	0	0%	
<b>MI desnog ventrikla</b>	DA	13	7,6%	0	0%	
	NE	159	92,4%	0	0%	

AKS – akutni koronarni sindrom, sCAD – stabilna koronarna arterijska bolest, MI - infarkt miokarda eng. myocardial infarction

Promatrajući rizične čimbenike za koronarnu bolest, pronađene su neke karakteristike koje su bile statistički značajno različite između skupina. U studiji, u grupi bolesnika sa AKS, bila su samo 2,1% (n=4) bolesnika sa stanjem nakon operacije aortokoronarnog premoštenja, dok u skupini bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti nije bilo onih koji su ranije kardiokirurški revaskularizirani. Međutim, oni sa stanjem nakon implantacije potpornica u koronarne arterije, bili su statistički značajno učestaliji u skupini bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti (u skupini AKS 10,2%, u odnosu na sCAD 36,1%,  $p=0,05$ ), što je i očekivano, jer je zapravo akutni koronarni sindrom najčešće prva prezentacija koronarne bolesti srca. (Tablica 2)

Tablica 2. Prikaz rizičnih čimbenika za koronarnu bolest

		SKUPINE				p
		AKS		sCAD		
		N	%	N	%	
Ranija koronarna premosnica	da	4	2,1%	0	,0%	0,211
	ne	183	97,9%	72	100,0%	
Ranije implantirani stent	da	19	10,2%	26	36,1%	0,005
	ne	168	89,8%	46	63,9%	
Obitelja anamneza šećerne bolesti	da	34	18,2%	11	15,3%	0,680
	ne	130	69,5%	54	75,0%	
	nepoznato	23	12,3%	7	9,7%	
Obiteljska anamneza koronarne bolesti	da	79	42,2%	36	50,0%	0,517
	ne	85	45,5%	29	40,3%	
	nepoznato	23	12,3%	7	9,7%	
Obiteljska anamneza kardiovaskularnih bolesti	da	36	19,3%	18	25,0%	0,549
	ne	128	68,4%	47	65,3%	
	nepoznato	23	12,3%	7	9,7%	
Obiteljska anamneza arterijske hipertenzije	da	50	26,7%	13	18,1%	0,301
	ne	117	62,6%	52	72,2%	
	nepoznato	20	10,7%	7	9,7%	

<b>Šećerna bolest</b>	da	27	14,4%	22	30,6%	<b>0,003</b>
	ne	160	85,6%	50	69,4%	
<b>Hipertenzija</b>	da	109	58,3%	45	62,5%	0,536
	ne	78	41,7%	27	37,5%	
<b>Hiperlipoproteinemija</b>	da	50	26,7%	33	45,8%	<b>0,003</b>
	ne	137	73,3%	39	54,2%	
<b>Pušenje cigareta</b>	da	68	36,4%	16	22,2%	<b>0,039</b>
	ne	119	63,6%	56	77,8%	
<b>Korištenje hipolipemika</b>	da	24	70,6%	35	89,7%	<b>0,038</b>
	ne	10	29,4%	4	10,3%	

Uspoređujući obiteljsku anamnezu za rizične čimbenika bolesnika u obje skupine, nije pronađena značajna razlika između skupina; za koronarnu bolest  $p=0,517$ , kardiovaskularne bolesti  $p=0,549$ , arterijsku hipertenziju,  $p=0,301$ , niti šećernu bolest  $p=0,680$ . No, uspoređujući pojedine rizične čimbenike samih bolesnika između skupina, šećerna bolest bila je znatno učestalija u skupini bolesnika sa sCAD (30,6% u odnosu na 14,4%;  $p=0,003$ ) kao i poremećen metabolizam lipida (45,8% u odnosu na 26,7%;  $p=0,003$ ). Jednako tako, bolesnici sa stabilnom kliničkom slikom značajno su češće već ranije imali u terapiji statin (89,7% u odnosu 70,6%;  $p=0,038$ ), a ako uzmemo u obzir da je značajno više upravo sCAD bolesnika imalo već ranije implantirane potpornice, rezultat je očekivan. Suprotno tome, aktivni pušači bili su znatno zastupljeniji u skupini bolesnika s AKS čineći 36,4% bolesnika, dok su istovremeno u skupini bolesnika sa sCAD bili zastupljeni sa samo 22,2%, a razlika je statistički značajna ( $p=0,039$ ). (Tablica 2)

Usporedbom ehokardiografskih pokazatelja bolesnici sa stabilnom koronarnom bolešću s većom učestalošću imali su hipertrofiju lijeve klijetke i stenozu aortnog zaliska dok se samo hipertrofija pokazala statistički značajnom varijablom (AKS 36,6% a sCAD 47,2%) pri čemu je  $p=0,028$ .



Intrahospitalna smrtnost AKS je iznosila 4,8% dok niti jedan bolesnik sa stabilnom koronarnom bolešću nije preminuo tijekom hospitalizacije. Udio umrlih od AKS je u skladu s očekivanom smrtnosti prema literaturi (31).

Promatrajući poremećaje srčanog ritma, AKS bolesnici su imali češće zabilježenu fibrilaciju atriya prilikom dolaska u hitnu službu (4,8% u odnosu na sCAD 4,1%) te je 3,7% AKS bolesnika tijekom hospitalizacije imalo maligni poremećaj srčanog ritma u smislu fibrilacije ventrikula ili ventrikulske tahikardije. Statističkom analizom niti fibrilacija atriya, niti maligni poremećaji ritma nisu statistički značajno bili viši u AKS skupini.

Elektrokardiografski zabilježene intraventikularne smetnje provođenja po tipu bloka lijeve ili desne grane, nisu se statistički značajno razlikovale između ispitivanih skupina bolesnika.

Tablica 3. Ehokardiografske i elektrokardiografske značajke ispitanika, intrahospitalna smrtnost

	SKUPINE				P
	ACS (187)		sCAD (72)		
	N	%	N	%	
<b>Hipertrofija lijeve klijetke</b>	61	36,6	34	47,2	<b>0,028</b>
<b>Stenoza aortnog zaliska</b>	33	17,6	16	22,2	0,399
<b>Intrahospitalna smrtnost</b>	9	4,8	0	0	0,058
<b>Fibrilacija atriya (po dolasku)</b>	9	4,8	3	4,1	0,824
<b>Ventrikularna fibrilacija/tahikardija</b>	7	3,7	0	0	0,096
<b>Sinusni ritam</b>	164	87,7	67	93,1	0,213
<b>Blok lijeve grane</b>	3	1,6	1	1,3	0,899
<b>Blok desne grane</b>	2	1,0	2	2,7	0,317

## 5.2. Usporedba laboratorijskih parametara

Analizirajući osnovne laboratorijske parametre obje skupine bolesnika, opažene su razlike u vrijednostima od kojih su neke dosegle i razinu statističke značajnosti. Medijane vrijednosti hemoglobina, serumskog kreatinina, visoko-osjetljivog CRP-a nisu bile statistički značajne između pojedinih skupina bolesnika a rezultati su sljedeći: vrijednost hemoglobina u skupini bolesnika s AKS iznosila je u prosijeku 142 g/L u odnosu na 146 g/L kod bolesnika sa sCAD ( $p=0,388$ ), serumskog kreatinina u AKS skupini 95  $\mu\text{g/L}$  dok je u sCAD iznosila 95,5  $\mu\text{g/L}$  ( $p=0,986$ ), visoko-osjetljivog CRP-a u AKS 3,7 mg/L a sCAD 2,3 mg/L ( $p=0,057$ ). Kao što se vidi, vrijednosti parametara iako su različite, nisu bile statistički značajne. (Tablica 4)

Vrijednosti medijana istisne frakcije lijevog ventrikla kod obje skupine bile su unutar vrijednosti koje smatramo urednima (eng. *ejection fraction of left ventricle* EFLV>50%), no razlika između skupina bila je značajna, pri čemu su bolesnici s akutnim koronarnim sindromom imali niže vrijednosti na donjoj referentnoj granici (AKS – EFLV 50%, a sCAD – EFLV 60%), pri čemu je razlika bila značajna ( $p<0,001$ ). (Tablica 4)

Serumska razina glukoze, čemu često svjedočimo u svakodnevnoj kliničkoj praksi, bila je značajno povišena u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (AKS 7,8 g/L, sCAD 5,85 g/L;  $p<0,001$ ), iako je učestalost šećerne bolesti bila veća kod bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti, što pripisujemo primarno akutnoj stresnoj reakciji tijekom akutnog koronarnog zbivanja ali i kod određenog broja bolesnika ranije neprepoznatoj i neliječenoj šećernoj bolesti. (Tablica 4)

Promatrajući vrijednosti lipida u krvi, zapažene su zanimljive razlike u skupinama, naime, vrijednosti ukupnog i LDL kolesterola značajno se razlikuju između promatranih skupina, pri

čemu je medijan vrijednosti ukupnog kolesterola kod bolesnika s AKS iznosio 5,3 mmol/L, a kod bolesnika s sCAD 4,75 mmol/L ( $p=0,01$ ), dok je medijan vrijednosti LDL-a kod bolesnika s AKS iznosio 3,6 mmol/L u odnosu na 2,8 mmol/L kod bolesnika s sCAD ( $p<0,001$ ). Istovremeno, medijan vrijednosti HDL kolesterola bila je jednaka u obje skupine (HDL 1,1 mmol/L;  $p=0,909$ ), dok su vrijednosti triglicerida bila tek neznatno različite (AKS 1,4mmol/L, sCAD 1,5mmol/L;  $p=0,233$ ). (Tablica 4)

Tablica 4. Usporedba laboratorijskih nalaza

	Grupe	N	Minimum	Maksimum	Percentili			p
					25	50. (median)	75	
<b>Hemoglobin</b> (g/L)	AKS	186	45	193,00	133,75	142,00	152,00	0,388
	sCAD	71	108,00	169,00	134,00	146,00	152,00	
<b>hsCRP</b> (mg/L)	AKS	187	0,10	212,40	1,60	3,70	7,10	0,057
	sCAD	70	0,40	206,00	1,38	2,30	5,08	
<b>Glukoza</b> (mmol/L)	AKS	187	4,00	41,70	6,50	7,80	10,20	<0,001
	sCAD	72	3,70	28,40	5,10	5,85	7,70	
<b>Kolesterol</b> (mmol/L)	AKS	187	2,30	9,10	4,40	5,30	6,20	0,01
	sCAD	72	2,40	9,10	3,73	4,75	5,50	
<b>HDL</b> (mmol/L)	AKS	187	0,60	2,40	0,90	1,10	1,30	0,909
	sCAD	72	0,30	4,50	0,93	1,10	1,20	
<b>LDL</b> (mmol/L)	AKS	187	1,10	10,30	2,80	3,60	4,30	<0,001
	sCAD	72	1,10	6,30	2,00	2,80	3,83	
<b>Trigliceridi</b> (mmol/L)	AKS	187	0,30	6,40	1,00	1,40	2,10	0,233
	sCAD	72	0,60	7,10	1,13	1,50	2,20	
<b>Kreatinin</b> (mmol/L)	AKS	185	31,00	644,00	85,50	95,00	112,50	0,986
	sCAD	70	9,00	395,00	86,00	95,50	111,25	

<b>EFLV (%)</b>	AKS	110	22,00	65,00	46,50	50,00	55,00	<b>&lt;0,001</b>
	sCAD	58	30,00	65,00	54,75	60,00	60,00	

EFLV – istisna frakcija lijevog ventrikula

### 5.3. Analiza težine koronarne bolesti, endotelne lipaze i interleukina-6 u serumu

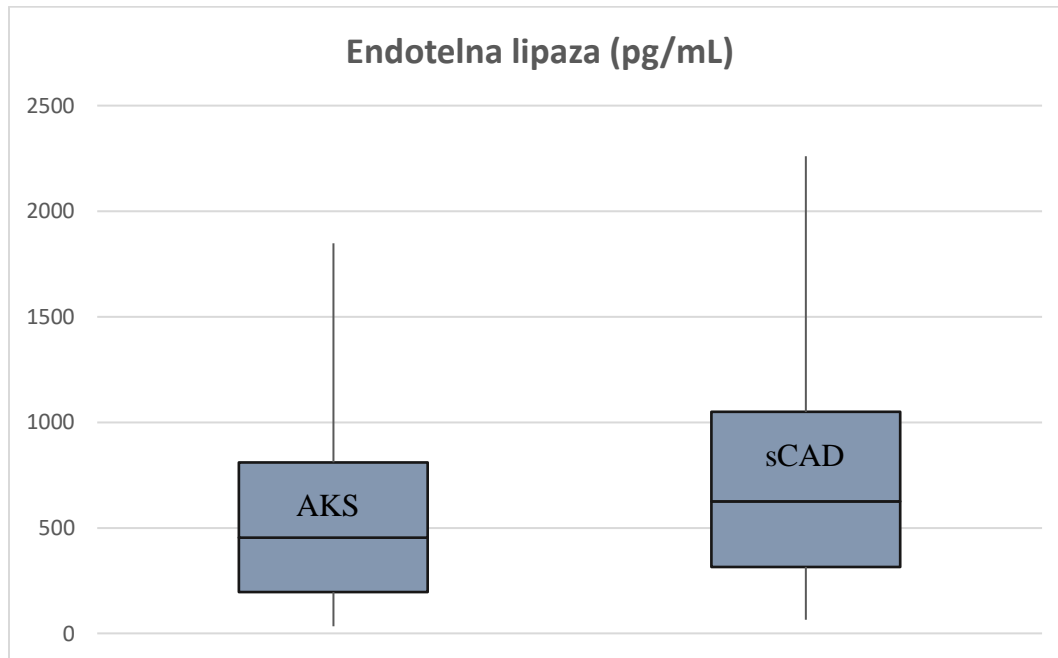
Promatrajući broj zahvaćenih segmenata koronarnih arterija, nije zabilježena značajna razlika između bolesnika s AKS i sCAD; medijan broja segmenata u obje skupine bolesnika iznosio je 2 ( $p=0,705$ ). (Tablica 4) Međutim, detaljnom analizom opsega i težine koronarne bolesti, za koju smo koristili modificirani Gensini sustav bodovanja, otkrio je značajnu razliku između skupina; bolesnici s AKS imali su značajno viši medijan, koji je iznosio 48 (raspon od 4 do 160), dok su bolesnici sa sCAD imali medijan 27 (raspon od 2 do 120), pri čemu je  $p<0,001$ .

Tablica 5. Usporedba težine koronarne bolesti, EL i IL-6

	Grupe	N	Minimum	Maksimum	Percentili			p
					25	50. (medijan)	75	
<b>Broj segmenata</b>	AKS	187	1,00	9,00	1,00	2,00	4,00	0,705
	sCAD	71	1,00	7,00	2,00	2,00	4,00	
<b>Gensini score</b>	AKS	187	4,00	160,00	32,00	48,00	80,00	<b>&lt;0,001</b>
	sCAD	72	2,00	120,00	10,25	27,00	39,50	
<b>EL (pg/mL)</b>	AKS	187	33,61	1037,50	162,11	258,66	355,95	<b>&lt;0,001</b>
	sCAD	72	64,56	1211,50	250,39	311,29	422,60	
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	AKS	168	1,28	580,08	4,29	6,28	14,24	<b>&lt;0,001</b>
	sCAD	64	0,61	33,13	1,97	3,02	5,61	

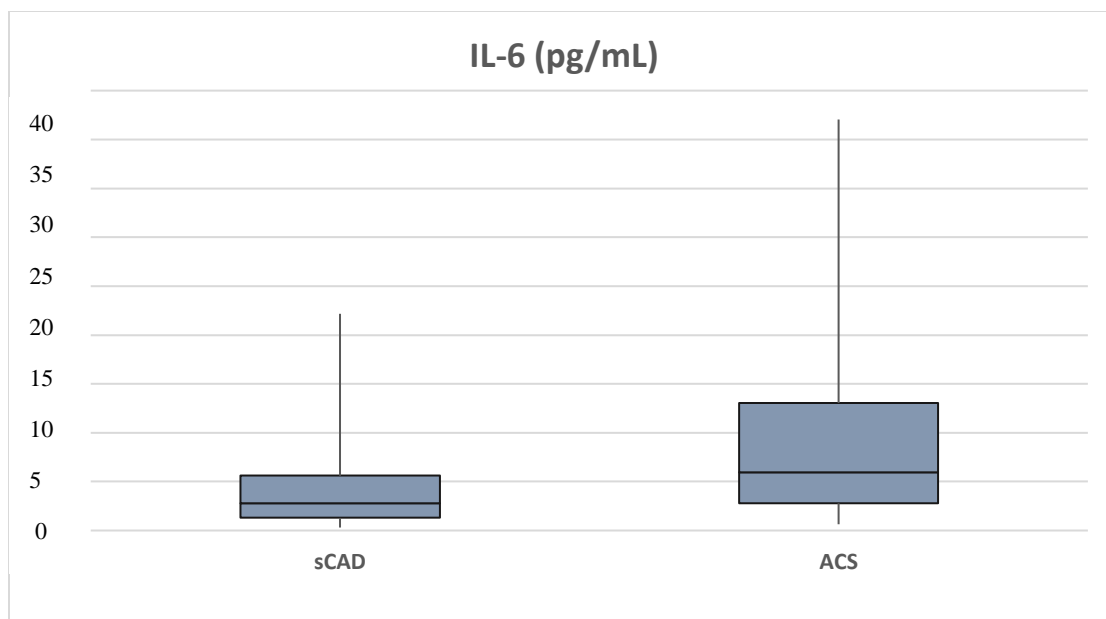
Analizirajući vrijednosti koncentracije endotelne lipaze, zapaženo je da su medijane plazmatske vrijednosti kod bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti iznosile 311,29 pg/mL (raspon 64,56 – 1211,50 pg/mL), što je statistički značajno više u odnosu na bolesnike s akutnim koronarnim

sindromom kod kojih je iznosila 258,66 pg/mL (raspon 33,61 – 1037,5 pg/mL), pri čemu je  $p < 0,001$ . (Tablica 5, Slika 2)



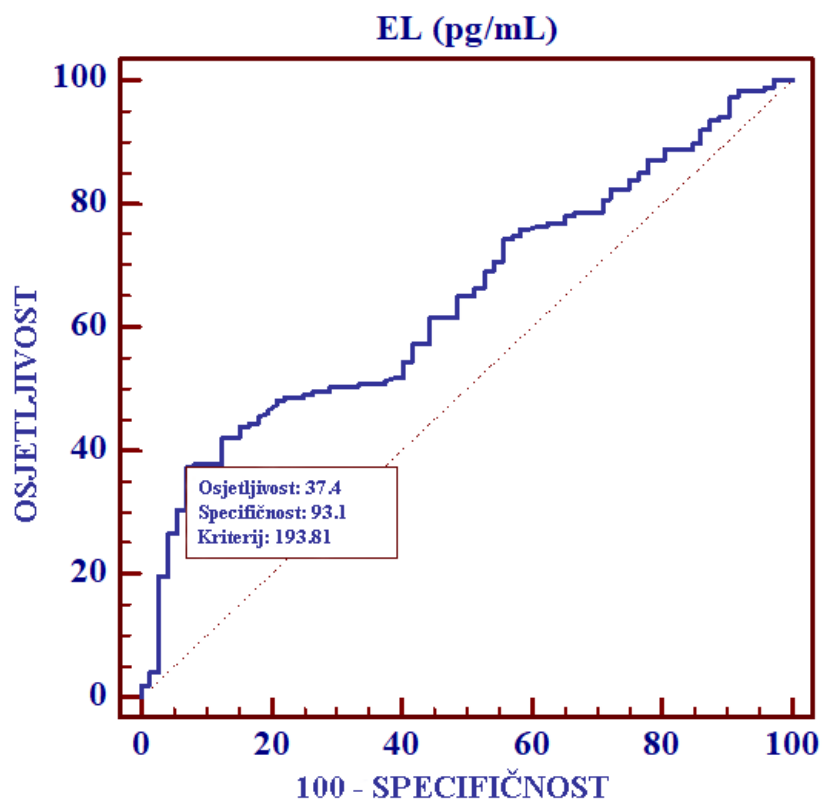
Slika 2. Usporedba razina endotelne lipaze kod ispitanika sa sCAD i AKS („box and whiskers plot“). Prikazani su medijan te minimalne i maksimalne vrijednosti. Ispitanici sa stabilnom koronarnom bolešću imali su statistički značajno više vrijednosti endotelne lipaze  $p < 0,001$

U obrnutom odnosu bile su izmjerene vrijednosti interleukina-6, a kod bolesnika s AKS zabilježene su više serumske vrijednosti; medijan vrijednosti iznosio je 6,28 pg/mL (raspon 1,28 – 580,08 pg/mL), dok je kod bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti iznosio 3,02 pg/mL (raspon 0,61 – 33,13 pg/mL) uz statističku značajnost,  $p < 0,001$ . (Slika 3)



*Slika 3.* Usporedba koncentracije IL-6 kod ispitanika sa sCAD i AKS („box and whiskers plot“). Prikazani su medijan te gornja i donja kvartila. Bolesnici s AKS imali su statistički značajno više vrijednosti IL-6,  $p < 0,001$

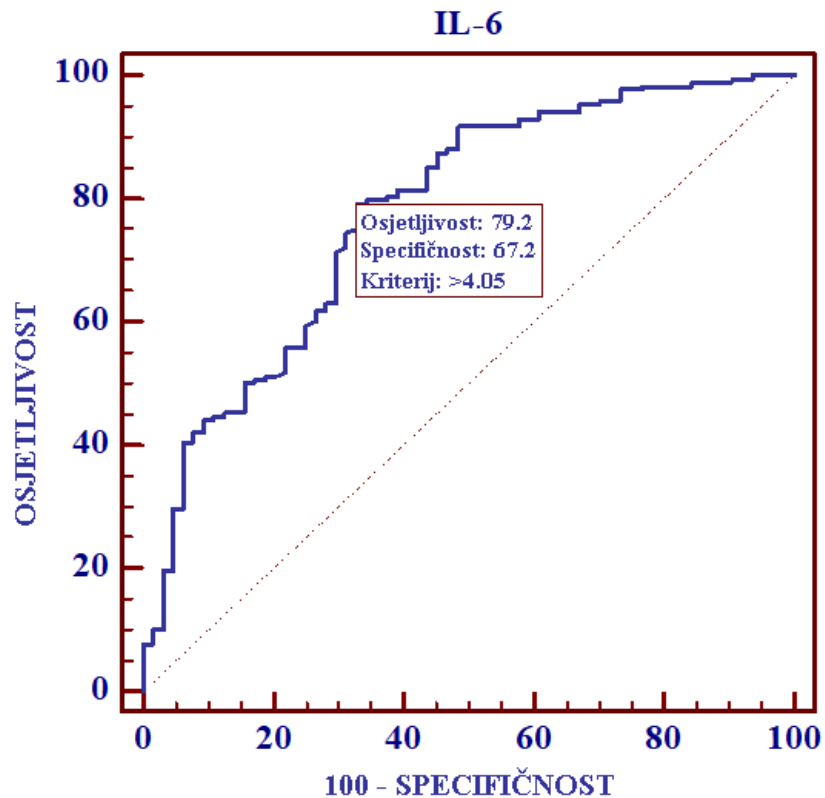
Vrijednosti endotelne lipaze dodatno su analizirane kod bolesnika s akutnim koronarnim sindromom te je učinjena ROC analiza kojom su dobivene sljedeće vrijednosti : pri serumskim vrijednostima  $EL \leq 193,81$  pg/mL, specifičnost testa je visoka i iznosi 93,1%, dok je osjetljivost niska i iznosi 37,4% (95% CI 0,585-0,704;  $p < 0,001$ ). (Slika 4)



Slika 4. ROC analiza vrijednosti EL kod ispitanika s AKS

EL – endotelna lipaza, AKS – akutni koronarni sindrom. Pri serumskim vrijednostima  $EL \leq 193,81$  pg/mL, specifičnost testa je visoka i iznosi 93,1%, dok je osjetljivost niska i iznosi 37,4%;  $p < 0,001$

ROC analiza vrijednosti interleukina-6 u skupini bolesnika s AKS, kod serumskih vrijednosti viših od 4,05 pg/mL, pokazuje da test ispravno detektira 79,2% bolesnika, dok je specifičnost testa iznosila 67,2%, (95% CI 0,718-0,829,  $p < 0,0001$ ). (Slika 5)



Slika 5. ROC analiza vrijednosti IL-6 kod ispitanika s AKS. Kod serumskih vrijednosti viših od 4,05 pg/mL, test ispravno detektira 79,2% bolesnika, dok specifičnost testa iznosi 67,2%

Spearmanovim koeficijentom korelacije analizirana je korelacija između rizičnih čimbenika za AKS i sCAD s razinama EL i IL-6 u serumu; od svih analiziranih, jedina značajna korelacija bila je između razine IL-6 i broja segmenata koronarnih arterija zahvaćenih aterosklerozom u AKS bolesnika; iako je korelacija slaba, ona je pozitivna i upućuje na postojanje povišenih razina IL-6 kod bolesnika s AKS koji imaju zahvaćen veći broj segmenata koronarnih arterija, odnosno teži stupanj koronarne bolesti. (Tablica 6)



Tablica 6. Spearmanov koeficijent korelacije rizičnih čimbenika, EL i IL-6

Spearmanov koeficijent korelacije		Broj segmenata	Gensini vrijednost	
sCAD	EL (pg/mL)	Correlation Coefficient	0,056	0,035
		P	0,643	0,771
		N	71	72
	IL-6	Correlation Coefficient	-0,200	-0,169
		P	0,117	0,182
		N	63	64
AKS	EL (pg/mL)	Correlation Coefficient	0,119	-0,085
		P	0,106	0,247
		N	187	187
	IL-6	Correlation Coefficient	<b>0,168</b>	0,092
		P	0,029	0,236
		N	168	168

sCAD – stabilna koronarna aterosklerotska bolest, AKS – akutni koronarni sindrom, EL – endotelna lipaza, IL-6 – interleukin 6

Napravljena je multivarijatna regresijska analiza, a kao regresijski model a korištena je binarna logistička regresija; kao zavisna varijabla uzeta je pripadnost skupini bolesnika s AKS u odnosu na bolesnike sa sCAD, pri čemu je napravljena predikcija za sve ranije zabilježene značajne rizične čimbenike, anamnestičke podatke te vrijednosti signifikantnih laboratorijskih parametara. Učinjeni regresijski model statistički je značajan ( $p < 0,001$ ), a objašnjava 59,2% varijance te ispravno klasificira 85% bolesnika. Ovaj regresijski model smatra se visokoučinkovitim s obzirom na vrlo visok postotak objašnjenja varijance zavisne varijable. Kao najsnažniji prediktor za nastanak akutnog koronarnog sindroma je vrijednost  $EL \leq 193,8$  pg/mL koja povećava rizik za AKS 7 puta (OR 7,13, 95% CI 2,23-22,83,  $p < 0,001$ ), te vrijednost  $IL-6 > 4,05$  pg/mL koja povećava rizik za AKS gotovo 10 puta (OR 9,89, 95% CI 4,15-23,57,  $p < 0,0001$ ). Drugi značajni prediktori

za pripadnost skupini AKS bolesnika bile su povišene vrijednosti kolesterola (OR 1,54), Gensini vrijednosti (OR 1,04), dok paradoksalno, srednji arterijski tlak (OR 0,99) smanjuje taj rizik. U ovoj analizi, pušenje, šećerna bolest i postojanje hiperlipoproteinemije nisu se pokazali kao statistički značajni prediktori. (Tablica 7)

Tablica 7. Binarna logistička regresija i omjer rizika za ispitanike s AKS

	df	OR	95% CI za OR		p
			Donja vrijednost	Gornja vrijednost	
<b>Srednji arterijski tlak</b>	1	<b>0,99</b>	0,98	1,00	<b>0,018</b>
<b>Kolesterol</b>	1	<b>1,54</b>	1,11	2,13	<b>0,010</b>
<b>Gensini zbroj</b>	1	<b>1,04</b>	1,03	1,06	<b>0,000</b>
Šećerna bolest	1	0,62	0,24	1,62	0,331
Hiperlipoproteinemija	1	0,42	0,17	1,02	0,054
Pušenje	1	2,28	0,90	5,80	0,083
<b>EL ≤ 193,8 pg/mL</b>	1	<b>7,13</b>	2,23	22,83	<b>0,001</b>
<b>IL6 &gt; 4,05 pg/mL</b>	1	<b>9,89</b>	4,15	23,57	<b>0,000</b>

Najvažniji prediktori za postojanje akutnog koronarnog sindroma jesu povišena razina endotelne lipaze i interleukina 6, nakon čega slijedi povišena razina kolesterola.

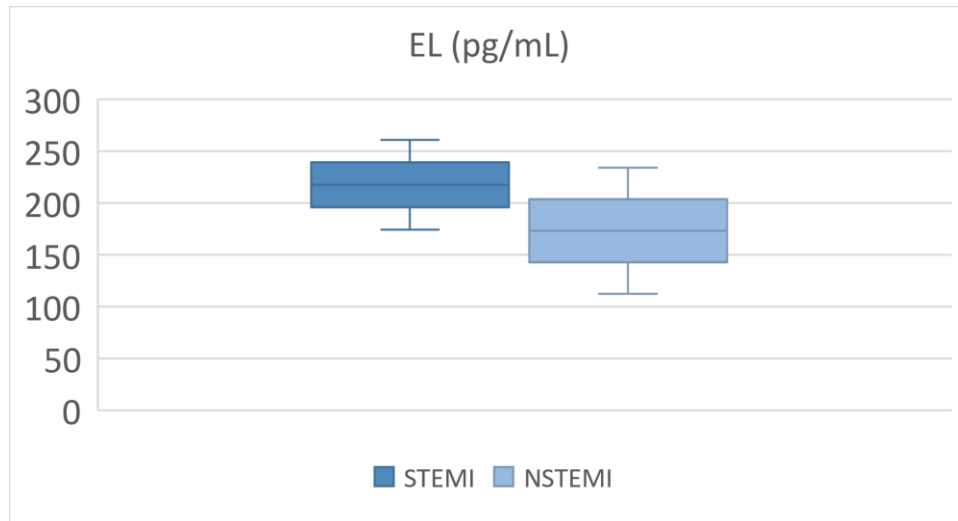
Iako je broj bolesnika s AKSom bio 187, svega 18 je imalo akutni koronarni sindrom bez ST elevacije. Navedeno je posljedica regrutiranja bolesnika u hitnoj službi, na temelju kliničke slike i elektrokardiograma, bez gotovog nalaza troponina. Kako bolesnici sa STEMI srčanim infarktom imaju nedvojbene i jasne promjene u elektrokardiogramu, dramatičniju kliničku sliku, puno ih je jednostavnije prepoznati i postaviti dijagnozu nego NSTEMI bolesnicima, jer oni nerijetko imaju

sasvim uredan EKG a jednako tako i ljudi bez dijagnoze akutnog koronarnog sindroma mogu imati nespecifične promjene završnog segmenta u elektrokardiogramu. Kako postoji velika razlika u broju ispitanika koji su se prezentirali sa STEMI infarktom u odnosu na one koji su se prezentirali NSTEMI infarktom, postoji i abnormalna distribucija podataka stoga je korišten Mann-Whitney U test. Usporedivši razinu endotelne lipaze između podskupina akutnog koronarnog sindroma (STEMI i NSTEMI) nije zabilježena statistički značajna razlika između podskupina ( $p=0,5$ ). Jednako tako, nije bilo značajne razlike niti u razini IL-6 ( $p=0,6$ ) (Tablica 8).

Tablica 8. Usporedba EL i IL-6 u podskupinama AKSa – STEMI i NSTEMI

	<b>Grupa</b>	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>IQR</b>	<b>p</b>
EL pg/mL	STEMI	169	261	168,6-359,6	0,5
	NSTEMI	18	234,2	157,7-301	
IL-6 pg/mL	STEMI	150	6,6	4,3-14,2	0,6
	NSTEMI	18	5,9	4,0-9,8	

EL – endotelna lipaza, IL-6 – interleukin 6, STEMI – srčani infarkt sa ST elevacijom, NSTEMI – srčani infarkt bez ST elevacije. Nema statistički značajne razlike između uspoređivanih podskupina



*Slika 6.* Usporedba koncentracije EL kod ispitanika sa STEMI i NSTEMI infarktom („box and whiskers plot“): premda postoji tendencija nižih vrijednosti EL u NSTEMI bolesnika razlika nije statistički značajna

## 5.4. Funkcionalne osobitosti lipoproteina visoke gustoće

Od funkcionalnih svojstava lipoproteina visoke gustoće analizirani su; efluks kolesterola kao mjera aktivnosti reverznog transporta kolesterola, protuupalna i antioksidativna aktivnost.

Sva tri ispitivana svojstva pokazala su statistički značajne varijacije između ispitivanih skupina bolesnika. Bolesnici s kroničnom koronarnom bolešću imali su značajno izraženije antioksidativno svojstvo;  $p < 0,001$  kao i izraženiju aktivnost efluksa kolesterola;  $p = 0,008$ . Nasuprot tome, ista skupina bolesnika imala je statistički značajno nižu protuupalnu aktivnost HDL-a :  $p < 0,001$  (Tablica 9).

Tablica 9. Funkcionalna svojstva HDL-a u ispitivanim skupinama

	sCAD	AKS	<i>p</i>
<b>Efluks kolesterola %</b>	11,8 [8,9-16,8]	10,2 [8,5-14,7]	<b>0,008</b>
<b>Protuupalna aktivnost %</b>	34,5 [23,0-55,8]	43,4 [33,7-59,3]	<b>&lt;0,001</b>
<b>Antioksidativna aktivnost %</b>	59,8 [45,5-65,9]	46,1 [21,1-66,0]	<b>&lt;0,001</b>

Bolesnici s AKS imaju izraženiju protuupalnu aktivnost HDL-a dok sCAD bolesnici imaju izraženiju antioksidativnu aktivnost i efluks kolesterola.

## 6. RASPRAVA

U disertaciji su uspoređivane vrijednosti endotelne lipaze u bolesnika koji su se prezentirali s različitom kliničkom slikom koronarne bolesti srca; akutnim koronarnim sindromom i kroničnim koronarnim sindromom, odnosno stabilnom koronarnom bolešću. Uspoređene su i funkcionalne osobitosti lipoproteina visoke gustoće. Svrha ove disertacije je bila mogući dokaz novog biomarkera za postavljanje dijagnoze ishemijske bolesti srca koja je i dalje vodeći uzrok smrtnosti diljem svijeta. Premda se o endotelnoj lipazi govori već dva desetljeća, a njezina funkcija je nedvojbeno u metabolizmu i funkciji lipoproteina koji su ključni u procesu ateroskleroze, još uvijek postoje oprečni dokazi u primjeni EL kao novog biomarkera ateroskleroze. S druge strane, razina HDL-a nije dovoljan dokaz adekvatne regulacije niti prevencije ateroskleroze, upravo suprotno, sve je više dokaza kako postoje genetski determinirane, ateroprotektivne funkcije HDL-a koje ne koreliraju s razinom istoga (120-122). Rezultati ove disertacije mogu dovesti do novih spoznaja o endotelnoj lipazi i funkciji HDL-a u bolesnika s različitim kliničkim prezentacijama koronarne bolesti a time i mogu i uputiti prema novim strategijama postavljanja ranije dijagnoze i prevencije neželjenih kardiovaskularnih događaja. Stoga je očekivani doprinos napredak i poboljšanje dijagnostike koronarne bolesti srca u bolesnika s bolovima u prsištu, te predviđanje vjerojatnosti nastanka AKS ovisno o razinama endotelne lipaze i funkcionalnim svojstvima HDL-a. Istraživanje je provedeno kao prospektivno jednocentrično, presječno, populacijsko – opservacijsko a uspoređivane su dvije skupine ispitanika; s akutnim koronarnim sindromom (N=187) i sa stabilnom koronarnom bolesti (N=72), a definirani su prema preporukama Europskog kardiološkog društva; Smjernicama za srčanu revaskularizaciju (28, 29, 43).

Udio muškaraca u obje skupine bio je podjednak, u AKS skupini 69% a u sCAD skupini 63,9%, a medijan i raspon dobi u obje skupine, također su bili podjednaki (AKS medijan dobi 65godina, raspon 36 - 88 godina, sCAD medijan dobi 64 godine, raspon 40 – 87 godina). Razlike po spolu i dobi nisu bile statistički značajne čime je potvrđeno da je uzorak ispitivane populacije adekvatan a rezultati validni (Tablica 1). Velika većina AKS bolesnika primljeni su pod dijagnozom srčanog infarkta sa ST elevacijom, čak 90,4% njih, a uzrok tome je vrlo vjerojatno najlakše postavljena dijagnoza budući da takvi bolesnici imaju dramatičnu kliničku sliku sa snažnim bolovima u prsištu te su elektrokardiografske promjene jasno vidljive, za razliku od AKS bez ST elevacije gdje vrlo često ne vidimo ishemijske promjene u inicijalnom elektrokardiogramu. Rizični čimbenici poput pozitivne obiteljske anamneze i arterijske hipertenzije nisu se pokazali značajno različitima između ispitivanih skupina bolesnika dok su AKS bolesnici češće pušili cigarete i češće nisu imali postavljenu dijagnozu šećerne bolesti i/ili dislipidemije (Tablica 2).

## **6.1 Endotelna lipaza i koronarna bolest**

Razina endotelne lipaze povezana je sa subkliničkom aterosklerozom, a Badelino i suradnici su opisali kako EL može biti proaterogeni čimbenik u ljudi (96, 97). Do sada još uvijek nije detaljno istraženo korelira li razina endotelne lipaze, u kojoj mjeri, i na koji način s različitom kliničkom prezentacijom koronarne bolesti. Naše istraživanje pokazalo je kako bolesnici s kroničnim koronarnim sindromom imaju povišenu razinu endotelne lipaze (311,29 pg/mL), odnosno, značajno višu razinu ( $p < 0,001$ ) u odnosu na bolesnike koji se prezentiraju s akutnim koronarnim (258,66 pg/mL) sindromom (Slika 2). Usporedivši vrijednosti endotelne lipaze u podskupinama AKS bolesnika, nije bilo značajne razlike između STEMI i NSTEMI bolesnika (Slika 6).

Yasuda i suradnici su 2007. dokazali kako je endotelna lipaza povezana s upalom, odnosno da upalna stanja povisuju razinu endotelne lipaze (84,120). Kako je ateroskleroza kronično upalno stanje naši rezultati potvrđuju povezanost razine EL sa stanjem kronične, nisko-aktivne upale; kakvo je kronična koronarna, aterosklerotska bolest; viša razina endotelne lipaze u kroničnoj koronarnoj bolesti. S druge strane, nismo utvrdili jasnu povezanost razine IL-6 s razinom EL.

Trbušić i suradnici dokazali su kako je ekspresija EL povišena u bolesnika sa simptomatskom karotidnom bolešću, kao i u onih s nestabilnim aterosklerotskim karotidnim plakom u odnosu na bolesnike s asimptomatskom stenozom karotidnih arterija. Također, dokazali su kako je i razina EL viša u bolesnika s opsežnijom karotidnom bolešću i u onih s više neuroloških smetnji (71). Ako uzmemo u obzir ove podatke, u kontekstu koronarne bolesti, za pretpostaviti bi bilo da bi bolesnici s izraženijom simptomatologijom koronarne bolesti, odnosno s češćim anginoznim smetnjama, time i težim stupnjem koronarne bolesti, odnosno difuznijom koronarnom bolešću imali višu razinu endotelne lipaze. Naši rezultati nisu pokazali povezanost razine endotelne lipaze s opsežnosti koronarne bolesti, kao niti izraženosti kliničke slike koronarne bolesti (Tablica 5) . Razina EL nije korelirala s težinom koronarne bolesti izraženoj po modificiranoj Gensinijevoj SCORE ljestvici, niti je korelirala s brojem segmenata koronarnih arterija zahvaćenih aterosklerozom. Jednak nedostatak korelacije EL i težine koronarne bolesti nije utvrđen niti u skupini bolesnika s AKS niti sCAD. Ali, bolesnici s kliničkom slikom kroničnog koronarnog sindroma imali su statistički značajno višu razinu endotelne lipaze (311,29 pg/mL) u odnosu na one s akutnim koronarnim sindromom (258,66 pg/mL). Ako uzmemo u obzir da je angiografski vidljiv samo 5% koronarne cirkulacije, teško je tvrditi da ostalih 95% oku nevidljivog koronarnog cirkulacijskog sustava nije aterosklerotski promijenjen i disfunkcionalnog endotela. U skladu s



posljednje navedenim rezultatom, potvrdili smo našu pretpostavku da je u kroničnoj koronarnoj bolesti EL povišena zbog spore, ali kontinuirane ateroskleroze.

Budući da EL proizvodi endotel cijelog krvožilja, ne samo koronarna cirkulacija, kod akutnog koronarnog sindroma akutna ozljeda endotela, ukoliko je lokalizirana, ne može biti odraz sustavne disfunkcije i ozlijede endotela, time i razina EL nije značajno povišena, čime bismo mogli objasniti značajnu razliku razine EL u sCAD i AKS skupinama. Premda su Trbušić i suradnici dokazali jasnu korelaciju razine endotelne lipaze i težine karotidne bolesti, izostanak koronarne korelacije može se tumačiti na način da je površina endotela koronarne cirkulacije značajno manja u odnosu na površinu endotela karotidne cirkulacije te bi to mogao biti jedan od razloga nedostatku korelacije između izraženosti simptoma karotidne i koronarne bolesti, odnosno razine EL u svakoj od navedenih (71,72,120-124).

Vrijednosti IL-6 su bile značajno više u skupini AKS (6,28 pg/mL) u odnosu na sCAD (3,02 pg/mL)  $p < 0,001$ , dok je razina EL obrnuto korelirala u navedenim skupinama te su ovi podaci kontradiktorni nekim ranijim istraživanjima (Tablica 7) (97). Southern i suradnici su istraživali postoji li obrazac izlučivanja IL-6 kod skupine zdravih muškaraca. Dokazano je kako razina IL-6 jasno pokazuje cirkadijalne varijacije razine, s time da su najviše vrijednosti izmjerene tijekom noći (između 00:12 i 5:56 sati) dok su najniže vrijednosti zabilježene u 10 sati ujutro (125). Kako su bolesnici koje smo klasificirali kao bolesnike s kroničnim koronarnim sindromom, dolazili na dogovorenu hospitalizaciju radi koronarografije u ranim jutarnjim satima, uzorci su uzeti tijekom dopodneva, što bi, prema rezultatima ove studije govorilo u prilog najnižim dnevnim vrijednostima interleukina-6. Shodno navedenom, izostanak korelacije IL-6 i razine endotelne lipaze može biti upravo iz razloga cirkadijalne varijacije razine interleukina-6.

Već je dokazano kako IL-6, kao pokazatelj akutne upale, raste vrlo rano za vrijeme akutnog koronarnog sindroma, doseže maksimalne vrijednosti tijekom 24-48 sati od početka infarkta te perzistira povišen i do 12 tjedana nakon koronarnog incidenta (126). Rezultati ove disertacije su u skladu s navedenim a odsustvo značajno povišene razine EL, tumači se odgođenim učinkom IL-6, kao markera upale, na porast razine EL u akutnom koronarnom sindromu. Nedostatak ovog istraživanja je što nisu kontrolirane razine interleukina-6 i endotelne lipaze u odgođenom vremenskom periodu nakon srčanog infarkta, a možda bi u tom kontekstu bilo odgođenog porasta endotelne lipaze stimuliranog IL-6, budući da je već dokazan učinak stimulacije IL-6 na ekspresiju endotelne lipaze, ali na stanicama aortalnog endotela (127). Robert i suradnici su 2013. ispitivali promjenu interakcije HDL-a s endotelnim stanicama kao i ekspresiju EL, stimulacijom aortalnih endotelnih stanica interleukinom 6. Nakon 24 sata mjerili su interakciju HDL-a i endotelnih stanica koja je bila čak 200% izraženija u odnosu na nestimulirane aortalne endotelne stanice, a ekspresija endotelne lipaze je porasla za dva puta. Kako je već spomenuto, premda nije dokazana povezanost razina IL-6 i endotelne lipaze, ne isključuje se odsustvo povezanosti (127).

Jedno recentno istraživanje je pokazalo pozitivnu korelaciju razinu EL i progresije aterosklerotskog koronarnog plaka u periodu od 12-14 mjeseca. Naime, bolesnici kod kojih je došlo do progresije koronarne bolesti imali su značajan porast razine EL u odnosu na prethodni, kao i u odnosu na bolesnike čiji je stupanj koronarne bolesti ostao nepromijenjen. Također je dodatnom analizom utvrđena vrijednost EL (133,8 pg/mL) koja bi mogla biti pokazatelj progresije koronarne bolesti, ali, nije bila nezavisni čimbenik (128).

Rezultati ove disertacije pokazuju kako vrijednost endotelne lipaze u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom  $\leq 193,81$  pg/mL ima visoku specifičnost testa koja iznosi 93,1%, dok je osjetljivost niska i iznosi 37,4% (95% CI 0,585-0,704;  $p < 0,001$ ) (Slika 4). Prema dosadašnjim

spoznajama nema objavljenih rezultata s kojima se ovi rezultati mogu usporediti, a dosadašnje publikacije povezanosti endotelne lipaze i akutnog koronarnog sindroma se baziraju na određenim polimorfizmima gena. Rezultati ovog ispitivanja su, prema tome, za sada jedinstveni a u budućnosti bi se moglo napraviti dodatnih istraživanja na većem uzorku bolesnika kako bi se određivanje razine EL moglo koristiti kao biomarker za isključenje ili potvrdu akutnog koronarnog sindroma.

## **6.2 Efluks kolesterola i koronarna bolest**

Proces reverznog transporta kolesterola je, prema dosadašnjim saznanjima, odgovoran za usporavanje ateroskleroze i opisan je kao protektivan čimbenik u aterosklerotskom procesu. Osnovna karika reverznog transporta kolesterola je HDL, odnosno njegov sastavni dio apolipoprotein A -1. Efluks kolesterola je prvi korak u procesu reverznog transporta kolesterola, a označava prijenos intracelularnog kolesterola iz pjenušavih makrofaga, koji su sastavni dio aterosklerotskog plaka, na HDL. Rezultati ovog ispitivanja pokazuju kako bolesnici s kroničnom aterosklerotskom bolesti imaju izraženiji efluksa kolesterola u odnosu na bolesnike s akutnim koronarnim sindromom (Tablica 9). Ovi rezultati su u skladu s više istraživanja te je sada već poznata pojava paradoksa refluksa kolesterola gdje je isti izraženiji u bolesnika sa stabilnom aterosklerozom te ga neki već koriste kao prediktor povišenog kardiovaskularnog rizika. Povišena sposobnost efluksa kolesterola bi tako mogla govoriti u prilog jednom stabilnom, ali kroničnom aterosklerotskom tijeku bolesti (128-129). Li Xin-Min i suradnici su 2013. objavili u časopisu *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* paradoks povišenog kardiovaskularnog rizika u pojedinaca s izraženijim efluksom kolesterola (129). Uspoređivali su aktivnost efluksa kolesterola u bolesnika s koronarnom bolešću i zdravih dobrovoljaca. Paradoksalno, izraženiji

efluks kolesterola bio je povezan s višim rizikom za srčani infarkt, moždani udar i smrt. Također, pokazali su kako se veći dio kolesterola oslobođenog iz makrofaga tijekom efluksa ne veže na HDL, već svega 40% , a čak 50 % se veže na albumine. Rezultat većeg udjela vezanja kolesterola na albumine plazme je bio posljedica veće razine istih dok je afinitet vezanja albumina za kolesterol svega deset posto onog afiniteta koji posjeduje apolipoprotein –A1. Za napomenuti je kako su primijetili da albumini različitog porijekla imaju drugačiji afinitet vezanja za kolesterol što implicira kako određene karakteristike albumina, možda i konformacija i struktura istih mijenjaju ulogu albumina u procesu vezanja kolesterola pri efluksu (129,130). Ako pretpostavimo da HDL veže svega 40% kolesterola oslobođenog tijekom efluksa, ranije pretpostavke o višoj razini HDL-a kao ateroprotektivnoj komponenti dovode se u pitanje, a i onda postaje jasnije zašto su ishodi studija ILLUMINATE , dal-OUTCOMES i ACCELERATE bili loši i da su prijevremeno prekinuti.

Sukladno navedenom, funkcija HDL-a ne može se temeljiti samo na procjeni efluksa kolesterola, kao mjere reverznog transporta kolesterola. U kontekstu kolesterola oslobođenog tijekom efluksa kolesterola jasno je da se sav ne veže na HDL već i na albumine i vjerojatno na druge proteine, premda još nije u potpunosti jasno za koje.

Postoji vjerojatnost da se dio kolesterola oslobođen tijekom efluksa ponovno inkorporira u pjenušave makrofage i u aterosklerotski plak čime se stvara začarani krug cirkulacije kolesterola, efluksa kolesterola, smanjenja aterosklerotskog plaka i povećanja plaka. Sama aktivnost efluksa kolesterola, ne mora nužno biti i mjera efikasnosti istoga što bi moglo objasniti paradoks efluksa kolesterola ali i rezultate ove disertacije. Rezultati pokazuju da bolesnici s akutnim koronarnim sindromom imaju slabije izraženu aktivnost efluksa kolesterola (Tablica 9), čime nije potvrđen paradoks, a uz raniji kontekst samog procesa reverznog transporta kolesterola, postaje evidentno

da postoji još čimbenika uključenih u reverzni transport kolesterola, kao i u njegovu učinkovitost, koje je potrebno još istražiti.

### **6.3 Protuupalno i antioksidativno svojstvo lipoproteina visoke gustoće**

Osim efluksa kolesterola ispitivana su protuupalna i antioksidativna svojstva HDL-a. Protuupalni kapacitet HDL-a bio je izraženiji u bolesnika koji su imali akutni koronarni sindrom (Tablica 9).

Niža antiinflamatorna sposobnost HDL-a u sCAD skupini može objasniti pojavu stabilne ateroskleroze u ovoj skupini bolesnika, jer je ateroskleroza kronično upalno stanje.

Ali, ateroskleroza je osnovni patofiziološki mehanizam i u akutnom koronarnom sindromu te povećana antiinflamatorna sposobnost HDL-a AKS ispitanika u odnosu na sCAD nameće nekoliko pitanja, prvenstveno je li povišena protuupalna aktivnost uzrok nastanku koronarnog incidenta ili je ona pak posljedica.

Protuupalna aktivnosti HDL-a je kompleksna te se temelji na nekoliko činjenica. Postoji jasan dokaz uloge HDL-a u urođenoj imunosti a aktivira se noksom, prvenstveno lipopolisaharidom (koji je osnovna komponenta staničnog zida gram negativnih bakterija) i IL-6, odnosno u fazi akutne upale. Postoji i posredovana imunost, putem makrofaga, dominantno M2 loze koji se aktiviraju glukokortikoidima i IL-4, a nastaju iz monocita. Prema dosadašnjim saznanjima makrofazi kao takvi imaju već dobro poznatu ulogu u procesu ateroskleroze te je antiinflamatorna uloga HDL-a u aterosklerozi vjerojatnije posredovana ovim oblikom imunosti, dakle posredovanom, putem makrofaga (131,132).

Kako je u ovom istraživanju ispitivana protuupalna sposobnost HDL-a tako što su stimulirani humani monociti uz dodatak lipopolisaharida moguće da se na taj način stimulirao i testirao drugi

oblik imunološke sposobnosti. Već je spomenuto da su bolesnici s AKS imali statistički značajno višu razinu IL-6 (Slika 3, Tablica 6 i 7), a isti potiče aktivaciju urođenog imunološkog sustava, za pretpostaviti je da je u AKS skupini interleukin potaknuo i protuupalnu aktivnost HDL-a, koja se uz dodatak LPS-a samo pojačala. Mendez i suradnici su dokazali kako HDL suprimira upalni odgovor induciran LPS-om a DeNardo i suradnici kako suprimira i ekspresiju proupalnih molekula čime indirektno smanjuje upalni odgovor u sepsi (76,133).

Postavlja se još velik broj pitanja, posebice vezano uz protuupalnu aktivnost HDL-a na koje je teško dati odgovor ali jasno je kako HDL ima multipla svojstva koja još nerazjašnjena. S druge strane, bolesnici s akutnim koronarnim sindromom imali su značajno sniženu antioksidativnu sposobnost HDL-a u odnosu na one sa stabilnom koronarnom bolešću (Tablica 9). Jednostavno rečeno, antioksidativno svojstvo je sposobnost neutralizacije djelovanja slobodnih radikala i oksidiranog LDL-a na endotel (103,134). Oksidativni stres na već narušenom i fragilnom endotelu iznad aterosklerotskog plaka, kao i na tanku fibroznu kapu, lako uzrokuje oštećenje endotela i fibrozne kape koje rezultira okluzijom koronarne arterije i nastankom akutnog koronarnog sindroma. Do okluzije žile dolazi ili uslijed rupture plaka ili uslijed aktivacije unutarnjeg puta koagulacije na oštećenoj stijenci krvne žile. Ovi rezultati su u skladu s velikim brojem dosadašnjih ispitivanja antioksidativne uloge HDL-a. Cheung i suradnici su još 2001. opisali kako uzimanje antioksidansa interferira s adekvatnim odgovorom na kombiniranu terapiju statinima i niacinom. Ispitivali su dvije skupine bolesnika od kojih su jedni uzimali samo simvastatin i niacin a druga skupina je uzimala i antioksidativne suplemente koji su uključivali vitamin C, vitamin E, beta karoten i selen. Skupina bolesnika koji su uzimali samo simvastatin i niacin su imali dobar terapijski odgovor u smislu da se povisila razina HDL-a a snizila razina LDL-a, dok je kod druge

skupine bolesnika ovakav terapijski odgovor izostao. Zapravo, došlo je do smanjenja razine LDL-a ali ne i do očekivanog porasta razine HDL-a (135).

HDL-ovo antioksidativno svojstvo leži u sposobnosti protekcije oksidacije LDL-a. HDL uspješno sprječava oksidaciju LDL-a tako što inhibira učinak slobodnih radikala na LDL ali i uspješno otklanja oksidirane lipide s LDL-a. Na ovaj način se snižava lokalna koncentracija oksidiranog LDL-a a te se proinflamatorni učinak LDL-a suprimira (103,134,136). Prvi proces u nastanku aterosklerotskog plaka je nastanak pjenušavih makrofaga koji nastaju kao posljedica ulaska LDL-a u makrofage . Da bi se uopće dogodio nastanak pjenušavog makrofaga i da bi došlo do procesa endocitoze potrebna je kemijska modifikacija LDL-a u proaterogenu česticu. Proaterogena modifikacija uključuje agregaciju, enzimsku digestiju i oksidaciju LDL-a. Oksidacija LDL-a značajno povećava afinitet makrofaga čime dolazi do brzog ulaska LDL-a u makrofag, posljedičnog nastanka pjenušavih stanica i masnih pruga (137). Cirkulirajući HDL inhibira oksidaciju LDL-a te na taj način smanjuje afinitet makrofaga za LDL i posljedični rast aterosklerotskog plaka ali i sprječava direktno oštećenje endotela oksidiranim radikalima. HDL je dakle, multifunkcionalna protuupalna i antioksidativna molekula koja inaktivira proterogene lipide i na taj način usporava aterosklerotski proces. Manjkavo antioksidativno svojstvo HDL-a rezultira slabijom ateroprotekcijom, bržim rastom aterosklerotskog plaka s češćim oštećenjima endotela iznad fibrozne kape i nastankom rupture plaka i trombozom koji su osnovni patofiziološki mehanizam nastanka akutnog infarkta miokarda. Rezultati ovog ispitivanja potvrđuju slabije antioksidativno svojstvo HDL-a u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (Tablica 9).

Na posljjetku, može se reći da je ateroskleroza koronarnih arterija kompleksan proces a klinička slika i opsežnost bolesti varira kako između pojedinaca, tako i između skupina bolesnika. Još uvijek nije dovoljno razjašnjeno zašto neki pojedinci sa svim čimbenicima rizika za koronarnu

bolest ne razviju koronarnu bolest, dok neki bez čimbenika rizika imaju opsežnu koronarnu aterosklerozu. Endotelna lipaza kao enzim odgovoran u biotransformaciji i nastanku lipidnih čestica zasigurno igra važnu ulogu, ali vjerojatno je da njezina uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Jednako tako, vrijeme je da se istraživanja fokusiraju na funkcionalne osobitosti HDL-a a ne samo na razinu istoga, jer HDL-ova ateroprotektivna uloga ne leži u brojevima nego u njegovoj funkciji.



## 7. ZAKLJUČCI

1. Serumska razina endotelne lipaze značajno je povišena ( $p < 0,001$ ) u bolesnika koji su se prezentirali kliničkom slikom stabilne koronarne bolesti.
2. Razine interleukina 6, kao reaktanta aktivne upale bile su značajno više ( $p < 0,001$ ) u skupini bolesnika koju su se prezentirali kao AKS.
3. Vrijednosti endotelne lipaze  $\leq 193,81$  pg/mL, uz specifičnost testa od 93,1% i osjetljivost od 37,4% (95% CI 0,585-0,704;  $p < 0,001$ ) kod bolesnika koji imaju bolove u prsištu mogle bi se koristiti kao isključni kriterij za postavljanje dijagnoze akutnog koronarnog sindroma.
4. Stupanj opsežnosti koronarne bolesti klasificiran prema modificiranom Gensini bodovnom sustavu ne korelira s razinom endotelne lipaze.
5. Između bolesnika koji se prezentiraju sa srčanim infarktom sa ST elevacijom i onih koji se prezentiraju bez ST elevacije nema značajne razlike u razini endotelne lipaze.
6. Efluks kolesterola koji je korišten kao indirektni pokazatelj aktivnosti i efikasnosti reverznog transporta kolesterola, statistički je značajno viši u bolesnika s kroničnom koronarnom bolešću.
7. Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom imaju izraženija protuupalna svojstva lipoproteina visoke gustoće.
8. Bolesnici s kroničnom koronarnom bolešću imaju izraženija antioksidativna svojstva HDL-a.
9. Razine HDL-a između ispitivanih skupina nisu se značajno razlikovale.

10. Uz praktički jednake razine HDL-a klinička slika i stupanj težine koronarne bolesti variraju, stoga se uvriježena ateroprotektivna razina HDLa dovodi u pitanje i potrebno se orijentirati na alteracije funkcije HDL-a.

## 8. SAŽETAK

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok pobola i smrtnosti u svijetu a veliku većinu čini koronarna bolest sa svojim posljedicama. Najučestalije kliničke prezentacije koronarne bolesti su akutni koronarni sindrom i stabilna angina pectoris, prema novoj nomenklaturi zvana, kronični koronarni sindrom. Uz sve bolje farmakointerventne metode liječenja koronarne bolesti bilježi se porast prevalencije ishemijske bolesti srca, a ukupni mortalitet je i dalje visok. Čimbenici rizika za aterosklerotsku bolest su već više desetljeća poznati ali se farmakoterapija u modificirajućim čimbenicima rizika nije pokazala visoko učinkovitom, posebice ako govorimo o dislipidemiji.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti razinu endotelne lipaze i ispitati funkcionalne karakteristike lipoproteina visoke gustoće (HDL-a) u bolesnika s akutnim i kroničnim koronarnim sindromom te ih međusobno usporediti. U istraživanju je sudjelovalo 187 bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i 72 bolesnika sa stabilnom koronarnom bolešću.

Razina endotelne lipaze, efluks kolesterola i antioksidativna aktivnost HDL-a bili su statistički značajno viši u bolesnika s kroničnim koronarnim sindromom, odnosno stabilnom koronarnom bolešću. U ovoj skupini bolesnika razina EL ipak nije korelirala s težinom koronarne bolesti. U skupini bolesnika koji su se prezentirali s akutnim koronarnim sindromom razina IL-6 i protuupalna sposobnost HDL-a bila je značajno viša u odnosu na sCAD bolesnike. Jednako tako, bolesnici s AKS imali su više aterosklerozom zahvaćenih segmenata koronarnih arterija. Vrijednosti endotelne lipaze  $\leq 193,81$  pg/mL, uz specifičnost testa od 93,1% i osjetljivost od 37,4% kod bolesnika koji imaju bolove u prsištu mogle bi se koristiti kao isključni kriterij za postavljanje dijagnoze akutnog koronarnog sindroma.

## 9. SUMMARY

Endothelial lipase serum levels and functional characteristics of high density lipoprotein in patients with different clinical presentations of coronary artery disease

Tomislava Bodrožić Džakić Poljak, 2024.

Cardiovascular diseases are the leading causes of morbidity and mortality worldwide, with the vast majority being coronary diseases and their consequences. The most common clinical presentations of coronary disease are acute coronary syndrome and stable angina pectoris, now referred to as chronic coronary syndrome under the new nomenclature. Despite advances in pharmacointerventional methods for treating coronary heart disease, the prevalence of ischemic heart disease is increasing, but overall mortality remains high. Risk factors for atherosclerotic disease have been known for decades; however, pharmacotherapy has not proven highly effective in modifying risk factors, particularly in cases of dyslipidemia.

The aim of this research was to determine the level of endothelial lipase and examine the functional characteristics of high-density lipoproteins (HDL) in patients with acute and chronic coronary syndromes, and to compare these two groups. The study included 187 patients with acute coronary syndrome and 72 patients with stable coronary disease.

The levels of endothelial lipase, cholesterol efflux, and the antioxidant capacity of HDL were statistically significantly higher in patients with chronic coronary syndrome (stable coronary artery disease). However, in this group of patients, the level of endothelial lipase did not correlate with the severity of coronary disease. In the group of patients who presented with acute coronary syndrome, the level of IL-6 and the anti-inflammatory capacity of HDL were significantly higher

compared to those with stable coronary artery disease. Additionally, patients with acute coronary syndrome had more coronary artery segments affected by atherosclerosis. Endothelial lipase values  $\leq 193,81$  pg/mL, with test specificity of 93,1% and sensitivity of 37,4% in patients with chest pain, could be used as an exclusion criterion for establishing the diagnosis of acute coronary syndrome.

## 10. LITERATURA

1. Pahwa R, Jialal I. Atherosclerosis [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing (US); 2001. [pristupljeno 27.02.2021]. Dostupno na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507799>
2. Insull W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am J Med.* 2009;122(1):S3–14.
3. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell.* 2001;104(4):503–16.
4. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, i sur. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primer.* 2019;5(1):56.
5. Link JJ, Rohatgi A, de Lemos JA. HDL cholesterol: physiology, pathophysiology, and management. *Curr Probl Cardiol.* 2007;32(5):268–314.
6. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135–43.
7. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(11):42.
8. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan Z qun. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105(10):1158–61.
9. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res.* 2019 May 10;124(10):1505-1518.
10. Smart EJ, Ying Y shu, Donzell WC, Anderson RGW. A Role for Caveolin in Transport of Cholesterol from Endoplasmic Reticulum to Plasma Membrane. *J Biol Chem.* 1996;271(46):29427–35.
11. Wilson PW, Garrison RJ, Castelli WP, Feinleib M, McNamara PM, Kannel WB. Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterols. *Am J Cardiol.* 1980;46(4):649–54.
12. Zaratin ACM, Quintão ECR, Sposito AC, Nunes VS, Lottenberg AM, Morton RE i sur. Smoking prevents the intravascular remodeling of high-density lipoprotein particles: implications for reverse cholesterol transport. *Metabolism.* 2004;53(7):858–62.

13. Beulens JWJ, Sierksma A, Tol A van, Fournier N, Gent T van, Paul JL i sur. Moderate alcohol consumption increases cholesterol efflux mediated by ABCA1. *J Lipid Res.* 2004; 45(9):1716–23.
14. Brites F, Verona J, De Geitere C, Fruchart JC, Castro G, Wikinski R. Enhanced cholesterol efflux promotion in well-trained soccer players. *Metabolism.* 2004; 53(10):1262–7.
15. Wu JH, Lee YT, Hsu HC, Hsieh LL. Influence of CETP gene variation on plasma lipid levels and coronary heart disease: a survey in Taiwan. *Atherosclerosis.* 2001; 159(2):451–8.
16. Briel M, Ferreira I, You J, Karanicolas P, Akl E, Wu P i sur. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: Systematic review and meta-regression analysis. *BMJ.* 2009; 338:b92.
17. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet Lond Engl.* 1994; 344(8934):1383–9.
18. Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med.* 1998; 339(19):1349–57.
19. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002; 106(25):3143–421.
20. Miller M, Cannon CP, Murphy SA, Qin J, Ray KK, Braunwald E i sur. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51(7):724–30.
21. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C i sur. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet Lond Engl.* 2005; 366(9493):1267–78.
22. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1273042.
23. Matsuura Yunosuke, Kanter Jenny E., Bornfeldt Karin E. Highlighting Residual Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019; 39(1):e1–9.
24. Lee DY, Chiu JJ. Atherosclerosis and flow: roles of epigenetic modulation in vascular endothelium. *J Biomed Sci.* 2019; 26(1):56.

25. Penson P, Long DL, Howard G, Howard V, Jones S, Martin S i sur. Associations between cardiovascular disease, cancer, and very low high-density lipoprotein cholesterol in the REasons for Geographical and Racial Differences in Stroke (REGARDS) study. *Cardiovasc Res.* 2019;115(1):204–12.
26. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C i sur. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2020; 41(3):407–77.
27. Grech ED, Ramsdale DR. Acute coronary syndrome: unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction. *BMJ.* 2003; 326(7401):1259–61.
28. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H i sur. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2018; 39(2):119–77.
29. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL i sur. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2021 Apr 7;42(14):1289-1367.
30. Timmis A. Acute coronary syndromes. *BMJ.* 2015;h5153.
31. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2019. godinu. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2019 [pristupljeno 04.05.2022]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2019-tablicni-podaci/>
32. Bueno H. Epidemiology of acute coronary syndromes. U: James S, Camm AJ, Lüscher TF, Maurer G, Serruys PW, ur. *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine.* 3. izd. Oxford: Oxford University Press; 2018. Str. 1214–1218.
33. *Kardiovaskularne bolesti u Republici Hrvatskoj - Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb 2013.*
34. Puymirat E, Simon T, Cayla G, Cottin Y, Elbaz M, Coste P i sur. Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation.* 2017; 136(20):1908–19.



35. Chan Mark Y., Sun Jie L., Newby L. Kristin, Shaw Linda K., Lin Min, Peterson Eric D i sur. Long-Term Mortality of Patients Undergoing Cardiac Catheterization for ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction. *Circulation*. 2009; 119(24):3110–7.
36. Wilson PWF. Established Risk Factors and Coronary Artery Disease: The Framingham Study. *Am J Hypertens*. 1994;7:7-12.
37. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2005; 111(25):3481–8.
38. Schaar JA, Muller JE, Falk E, Virmani R, Fuster V, Serruys PW i sur. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. *Eur Heart J*. 2004; 25(12):1077–82.
39. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(5):1262–75.
40. Arnett EN. Coronary Artery Narrowing in Coronary Heart Disease: Comparison of Cineangiographic and Necropsy Findings. *Ann Intern Med*. 1979;91(3):7.
41. Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res*. 1974;35(3):156–72.
42. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol*. 1983; 52(2):72A-81A.
43. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA i sur. 2018 ESC Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2019; 40(3):237–69.
44. Montecucco F, Carbone F, Schindler TH. Pathophysiology of ST-segment elevation myocardial infarction: novel mechanisms and treatments. *Eur Heart J*. 2016; 37(16):1268–83.
45. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 65(14):1454–71.
46. Di Diego JM, Antzelevitch C. Acute Myocardial Ischemia: Cellular Mechanisms Underlying ST Segment Elevation. *J Electrocardiol*. 2014;47(4):486–90.
47. Li Danshi, Li Chuan Yong, Yong Ah Chot, Kilpatrick David. Source of Electrocardiographic ST Changes in Subendocardial Ischemia. *Circ Res*. 1998; 82(9):957–70.
48. Diamond GA. A clinically relevant classification of chest discomfort. *J Am Coll Cardiol*. 1983; 1:574–5.

49. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F i sur. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016;37(3):267–315.
50. Jangaard N, Sarkisian L, Saaby L, Mikkelsen S, Lassen AM, Marcussen N i sur. Incidence, Frequency, and Clinical Characteristics of Type 3 Myocardial Infarction in Clinical Practice. *Am J Med*. 2017; 130(7):862.e9-862.e14.
51. Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris. *Circulation*. 1976; 54(3):522–3.
52. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K i sur. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet*. 1999; 21(4):424–8.
53. Kobayashi J, Mabuchi H. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2015;52(6):632-637.
54. Hirata K ichi, Ishida T, Matsushita H, Tsao PS, Quertermous T. Regulated Expression of Endothelial Cell-Derived Lipase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 272(1):90–3.
55. Schilcher I, Kern S, Hrzenjak A, Eichmann T, Stojaković T, Scharnagl H. i sur. Impact of Endothelial Lipase on Cholesterol Efflux Capacity of Serum and High-density lipoprotein. *Sci Rep*. 2017; 7: 12485.
56. Bartelt A, John C, Schaltenberg N, Berbee JFP, Worthmann A, Cherradi ML i sur. Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. *Nat Commun*. 2017; 8:15010.
57. Miller GC, Long CJ, Bojilova ED, Marchadier D, Badellino KO, Blanchard N i sur. Role of N-linked glycosylation in the secretion and activity of endothelial lipase. *J Lipid Res*. 2004;45(11):2080–7.
58. Paradis ME, Lamarche B. Endothelial lipase: Its role in cardiovascular disease. *Can J Cardiol*. 2006; 22(Suppl B):31B-34B.
59. Chuan W, Kazutoshi N, Shuji K, Manabu N, Haizhao Y., Yajie C, i sur. Increased Hepatic Expression of Endothelial Lipase Inhibits Cholesterol Diet-Induced Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Transgenic Rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1282-89.
60. Adam RC, Mintah IJ, Alexa-Braun CA, Shihanian LM, Lee JS, Banerjee P, i sur. Angiopoietin-like protein 3 governs LDL-cholesterol levels through endothelial lipase-dependent VLDL clearance. *J Lipid Res*.2020;61:1271–86.

61. Ishida T, Zheng Z, Dichek HL, Wang H, Moreno I, Yang E i sur. Molecular cloning of nonsecreted endothelial cell-derived lipase isoforms. *Genomics*. 2004; 83(1):24–33.
62. Yang P, Belikova NA, Billheimer J, Rader DJ, Hill JS, Subbaiah PV. Inhibition of endothelial lipase activity by sphingomyelin in the lipoproteins. *Lipids*. 2014; 49(10):987–96.
63. Maugeais C, Tietge U. J.F., Broedl UC., Marchadier D, Cain W, McCoy MG i sur. Dose-Dependent Acceleration of High-Density Lipoprotein Catabolism by Endothelial Lipase. *Circulation*. 2003;108(17):2121–6.
64. Schilcher I, Ledinski G, Radulović S, Hallström S, Eichmann T, Madl T, Zhang F, i sur. Endothelial lipase increases antioxidative capacity of high-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(10):1363-1374.
65. Jin W, Millar JS, Broedl U, Glick JM, Rader DJ. Inhibition of endothelial lipase causes increased HDL cholesterol levels in vivo. *J Clin Invest*. 2003; 111(3):357–62.
66. Ishida T, Choi S, Kundu RK, Hirata KI, Rubin EM, Cooper AD i sur. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J Clin Invest*. 2003; 111(3):347–55.
67. Ma K, Cilingiroglu M, Otvos JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(5):2748–53.
68. Ma K, Forte T, Otvos JD, Chan L. Differential additive effects of endothelial lipase and scavenger receptor-class B type I on high-density lipoprotein metabolism in knockout mouse models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(1):149–54.
69. Dobrowolski P, Prejbisz A, Kuryłowicz A, Baska A, Burchardt P, Chlebus K i sur. Metabolic syndrome – a new definition and management guidelines. *Arch Med Sci*. 2022; 1134-56.
70. Potočnjak I, Trbušić M, Terešak SD, Radulović B, Pregartner G, Berghold A i sur. Metabolic Syndrome Modulates Association between Endothelial Lipase and Lipid/Lipoprotein Plasma Levels in Acute Heart Failure Patients. *Sci Rep*. 2017;7(1):1165.
71. Trbušić M, Riederer M, Vučić M, Lovričević I, Krušlin B, Gauster M i sur. Increased expression of endothelial lipase in symptomatic and unstable carotid plaques. *J Neurol*. 2012;259(3):448–56.
72. Trbušić, M, Potočnjak I, Tiran B, Bodrožić-Džakić T, Milošević M, Degoricija V. i sur. Endothelial lipase plasma levels are increased in both sexes in stable coronary artery disease and only in women with acute coronary syndrome but not associated with the severity of coronary artery disease. *CMJ*.2016; 57 (5), 482-492.

73. Wang C, Niimi M, Kitajima S. Sex hormones affect endothelial lipase-mediated lipid metabolism and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2019;18:226.
74. Yancey PG, Kawashiri MA, Moore R, Glick JM, Williams DL, Connelly MA i sur. In vivo modulation of HDL phospholipid has opposing effects on SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2004; 45(2):337–46.
75. Broedl UC, Maugeais C, Millar JS, Jin W, Moore RE, Fuki IV i sur. Endothelial lipase promotes the catabolism of ApoB-containing lipoproteins. *Circ Res.* 2004;94(12):1554-61.
76. Jahangiri A, Rader DJ, Marchadier D, Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 2005; 46(5):896–903.
77. Fuki IV, Blanchard N, Jin W, Marchadier DHL, Millar JS, Glick JM i sur. Endogenously produced endothelial lipase enhances binding and cellular processing of plasma lipoproteins via heparan sulfate proteoglycan-mediated pathway. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34331–8.
78. Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis. *PLoS Med.* 2006; 3(2):e22.
79. Strauss JG, Zimmermann R, Hrzenjak A, Zhou Y, Kratky D, Levak-Frank S i sur. Endothelial cell-derived lipase mediates uptake and binding of high-density lipoprotein (HDL) particles and the selective uptake of HDL-associated cholesterol esters independent of its enzymic activity. *Biochem J.* 2002; 368(Pt 1):69–79.
80. Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJF. Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem.* 2009; 284(10):6093–100.
81. Wiersma H, Gatti A, Nijstad N, Kuipers F, Tietge UJF. Hepatic SR-BI, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice. *J Lipid Res.* 2009; 50(8):1571–80.
82. Brown RJ, Lagor WR, Sankaranarayanan S, Yasuda T, Quertermous T, Rothblat GH i sur. Impact of combined deficiency of hepatic lipase and endothelial lipase on the metabolism of both high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Circ Res.* 2010; 107(3):357–64.
83. Edmondson AC, Brown RJ, Kathiresan S, Cupples LA, Demissie S, Manning AK i sur. Loss-of-function variants in endothelial lipase are a cause of elevated HDL cholesterol in humans. *J Clin Invest.* 2009; 119(4):1042–50.

84. Yasuda T, Hirata KI, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T i sur. Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes LDL uptake in macrophages. *J Atheroscler Thromb.* 2007; 14(4):192–201.
85. Kruth HS, Huang W, Ishii I, Zhang WY. Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2002; 277(37):34573–80.
86. Constantinou C, Karavia EA, Xepapadaki E, Petropoulou PI, Papakosta E, Karavyraki M i sur. Advances in high density lipoprotein physiology: surprises, overturns and promises. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;310(1):E1–14.
87. Inoue T, Hayashi M, Takayanagi K, Morooka S. Lipid-lowering therapy with fluvastatin inhibits oxidative modification of low density lipoprotein and improves vascular endothelial function in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2002; 160(2):369–76.
88. Jin W, Fuki IV, Seidah NG, Benjannet S, Glick JM, Rader DJ. Proprotein convertases [corrected] are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *J Biol Chem.* 2005; 280(44):36551–9.
89. Shimamura Mitsuru, Matsuda Morihiro, Yasumo Hiroaki, Okazaki Mitsuyo, Fujimoto Kazunori, Kono Keita i sur. Angiopietin-Like Protein3 Regulates Plasma HDL Cholesterol Through Suppression of Endothelial Lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(2):366–72.
90. Ishida T, Choi SY, Kundu RK, Spin J, Yamashita T, Hirata K. i sur. Endothelial lipase modulates susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice. *J Biol Chem.* 2004; 279(43):45085–92.
91. Kojima Y, Hirata K, Ishida T, Shimokawa Y, Inoue N, Kawashima S i sur. Endothelial Lipase Modulates Monocyte Adhesion to the Vessel Wall: A potential role in inflammation. *J Biol Chem.* 2004; 279(52):54032–8.
92. Qiu G, Hill JS. Endothelial lipase enhances low density lipoprotein binding and cell association in THP-1 macrophages. *Cardiovasc Res.* 2007; 76(3):528–38.
93. Azumi H, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Rikitake Y, Takeuchi S i sur. Immunohistochemical localization of endothelial cell-derived lipase in atherosclerotic human coronary arteries. *Cardiovasc Res.* 2003; 58(3):647–54.
94. Bartels ED, Nielsen JE, Lindegaard MLS, Hulten LM, Schroeder TV, Nielsen LB. Endothelial lipase is highly expressed in macrophages in advanced human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 2007; 195(2):e42-49.

95. Qiu G, Hill JS. Atorvastatin decreases lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in human THP-1 macrophages. *J Lipid Res.* 2007; 48(10):2112–22.
96. 96. Paradis ME, Badellino KO, Rader DJ, Deshaies Y, Couture P, Archer WR i sur. Endothelial lipase is associated with inflammation in humans. *J Lipid Res.* 2006; 47(12):2808–13.
97. Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial lipase is increased in vivo by inflammation in humans. *Circulation.* 2008; 117(5):678–85.
98. Chiesa ST, Charakida M. High-Density Lipoprotein Function and Dysfunction in Health and Disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2019; 33(2):207–19.
99. Degoricija V, Potočnjak I, Gastrager M, Pregartner G, Berghold A, Scharnagl H, i sur. HDL subclasses and mortality in acute heart failure patients. *Clin Chim Acta.* 2019;490:81-87.
100. Jansen H, Samani NJ, Schunkert H. Mendelian randomization studies in coronary artery disease, *European Heart Journal.* 2014; 35(29):1917–24.
101. Holmes MV, Asselbergs FW, Palmer TM, Drenos F, Lanktree MB, Nelson CP i sur. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease, *European Heart Journal.* 2015;36(9):539-50
102. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJP, Komajda M i sur. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007; 357(21):2109–22.
103. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, Barter PJ, Brewer HB, Fox KAA i sur. Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(20):1933-1942.
104. Jomard A, Osto E. High Density Lipoproteins: Metabolism, Function, and Therapeutic Potential. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:39.
105. Rahman F, Blumenthal RS, Jones SR, Martin SS, Gluckman TJ, Whelton SP. Fasting or Non-fasting Lipids for Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Assessment and Treatment? *Curr Atheroscler Rep.* 2018; 20(3):14.
106. Radulović S, Gottschalk B, Hörl G, Zardoya-Laguardia P, Schilcher I, Hallström S, i sur. Endothelial lipase increases eNOS activating capacity of high-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(4):158612.
107. Schilcher I, Stadler JT, Lechleitner M, Hrzenjak A, Berghold A, Pregartner G, i sur. Endothelial Lipase Modulates Paraoxonase 1 Content and Arylesterase Activity of HDL. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):719.

108. Xepapadaki E, Maulucci G, Constantinou C, Karavia E, Zvintzou E, Daniel B i sur. Impact of apolipoprotein A1- or lecithin:cholesterol acyltransferase-deficiency on white adipose tissue metabolic activity and glucose homeostasis in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(6):1351–60.
109. Pamir N, Pan C, Plubell DL, Hutchins PM, Tang C, Wimberger J i sur. Genetic control of the mouse HDL proteome defines HDL traits, function, and heterogeneity. *J Lipid Res*. 2019;60(3):594–608.
110. Bojanic DD, Tarr PT, Gale GD, Smith DJ, Bok D, Chen B i sur. Differential expression and function of ABCG1 and ABCG4 during development and aging. *J Lipid Res*. 2010;51(1):169-81.
111. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol*. 2010; 21(4):312–8.
112. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L i sur. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res*. 2000; 41(9):1481–94.
113. Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D i sur. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(35):14978–83.
114. Viswambharan H, Ming XF, Zhu S, Hubsch A, Lerch P, Vergères G i sur. Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2004; 94(7):918–25.
115. Holy EW, Besler C, Reiner MF, Camici GG, Manz J, Beer JH i sur. High-density lipoprotein from patients with coronary heart disease loses anti-thrombotic effects on endothelial cells: impact on arterial thrombus formation. *Thromb Haemost*. 2014; 112(5):1024–35.
116. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD i sur. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012; 33(20):2551–67.
117. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C i sur. 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. *Eur Heart J*. 2013; 34(38):2949–3003.
118. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M i sur. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of

arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J*. 2018; 39(33):3021–104.

119. Nascimento CR, Rodrigues Fernandes NA, Gonzalez Maldonado LA, Rossa Junior C. Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochem Biophys Rep*. 2022;32:101383.
120. Yasuda T, Hirata KI, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T i sur. Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes LDL uptake in macrophages. *J Atheroscler Thromb*. 2007; 14(4):192–201.
121. Zanoni P, Khetarpal SA, Larach DB, Hancock-Cerutti WF, Millar JS, Cuchel M, i sur. Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease. *Science*.2016; 351:1166–71.
122. Zeng WP, Zhang R, Li R, Luo JF, Hu XF. Association of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene T786C Polymorphism with In-Stent Restenosis in Chinese Han Patients with Coronary Artery Disease Treated with Drug-Eluting Stent. *PLoS One*. 2017;12:e0170964.
123. Yue-e W, Lan M, Hao Z, Xin-ran C, Xin-yi X, Ze-ping H. Significant association between the endothelial lipase gene 584C/T polymorphism and coronary artery disease risk. *Biosci Rep*.2020; 40(9): 1-13.
124. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur Heart J*. 2017;38(32):2478–86.
125. Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Kanabrocki EL, Yager JG, Roodell MM, Weatherbee JA i sur. Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *J Allergy Clin Immunol*. 1995; 95(5):1029–35.
126. Gabriel AS, Martinsson A, Wretling B, Ahnve S. IL-6 levels in acute and post myocardial infarction: their relation to CRP levels, infarction size, left ventricular systolic function, and heart failure. *Eur J Intern Med*. 2004; 15(8):523–8.
127. Robert J, Lehner M, Frank S, Perisa D, von Eckardstein A, Rohrer L. Interleukin 6 stimulates endothelial binding and transport of high-density lipoprotein through induction of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(12):2699-706.
128. Han H, Dai D, Wang W, Zhu J, Zhu Z, Lu L i sur. Impact of serum levels of lipoprotein lipase, hepatic lipase, and endothelial lipase on the progression of coronary artery disease. *J Interv Med*. 2019; 2(1):16–20.



129. Li XM, Tang WHW, Mosior MK, Huang Y, Wu Y, Matter W i sur. Paradoxical association of enhanced cholesterol efflux with increased incident cardiovascular risks. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33(7):1696–705.
130. Ha JS, Ha CE, Chao JT, Petersen CE, Theriault A, Bhagavan NV. Human serum albumin and its structural variants mediate cholesterol efflux from cultured endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1640(2–3):119–28.
131. Labonte AC, Tosello-Tramont AC, Hahn YS. The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. *Mol Cells.* 2014; 37(4):275–85.
132. Smythies LE, White CR, Maheshwari A, Palgunachari MN, Anantharamaiah GM, Chaddha M i sur. Apolipoprotein A-I mimetic 4F alters the function of human monocyte-derived macrophages. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2010; 298(6):C1538–48.
133. Mendez AJ, Lin G, Wade DP, Lawn RM, Oram JF. Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276(5):3158–66.
134. Xepapadaki E, Zvintzou E, Kalogeropoulou C, Filou S, Kypreos KE. The Antioxidant Function of HDL in Atherosclerosis. *Angiology.* 2020; 71(2):112–21.
135. Cheung MC, Zhao XQ, Chait A, Albers JJ, Brown BG. Antioxidant supplements block the response of HDL to simvastatin-niacin therapy in patients with coronary artery disease and low HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(8):1320–6.
136. Rojas, M.; Prado, Y.; Tapia, P.; Carreño, L.J.; Cabello-Verrugio, C.; Simon, F. Oxidized High-Density Lipoprotein Induces Endothelial Fibrosis Promoting Hyperpermeability, Hypotension, and Increased Mortality. *Antioxidants* 2022;11:2469.
137. Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin.* 2017; 8:66–77.

# **POPIS PRILOGA**

## **Popis slika**

Slika 1. Hodogram regrutiranja ispitanika

Slika 2. Usporedba razina endotelne lipaze kod bolesnika sa sCAD i AKS

Slika 3. Usporedba razina IL-6 kod ispitanika sa sCAD i AKS

Slika 4. ROC analiza vrijednosti EL kod ispitanika s AKS

Slika 5. ROC analiza vrijednosti IL-6 kod ispitanika s AKS

Slika 6. Usporedba koncentracije EL kod ispitanika sa STEMI i NSTEMI infarktom

## **Popis tablica**

Tablica 1. Opće karakteristike ispitanika

Tablica 2. Prikaz rizičnih čimbenika za koronarnu bolest

Tablica 3. Ehokardiografske i elektrokardiografske značajke ispitanika, intrahospitalna smrtnost

Tablica 4. Usporedba laboratorijskih nalaza

Tablica 5. Usporedba težine koronarne bolesti, EL i IL-6

Tablica 6. Spearmanov koeficijent korelacije rizičnih čimbenika, EL i IL-6

Tablica 7. Binarna logistička regresija i omjer rizika za ispitanike s AKS

Tablica 8. Usporedba EL i IL-6 u podskupinama AKSa : STEMI i NSTEMI

Tablica 9. Funkcionalna svojstva HDL-a u ispitivanim skupinama

## 11. ŽIVOTOPIS

Tomislava Bodrožić Džakić Poljak, dr.med. rođena je 1986. u Slavonskom Brodu gdje je završila osnovnu školu i franjevačku klasičnu gimnaziju. Upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2004. godine te s odličnim uspjehom diplomirala 2010. godine, a 2009. dobitnica je Dekanove nagrade za najboljeg studenta godine. Pripravnički staž odradila je u Kliničkom bolničkom centru Sestara Milosrdnica a specijalizaciju iz kardiologije započela je 2012. godine u Kliničkoj bolnici Dubrava. Godine 2019. položila je specijalistički ispit te postala specijalist kardiolog. Nakon položenog specijalističkog ispita, dvije godine je radila na Odjelu za bolesti srčanih zalistaka i krvnih žila gdje je započela edukaciju iz invazivne i interventne kardiologije, a od 2021. radi kao liječnik u Odjelu intenzivne kardiološke skrbi koja joj je od samog početka fokus stručnog interesa. Od 2019. je voditelj podskupine za akutni koronarni sindrom, Radne skupine mladih kardiologa Hrvatskog kardiološkog društva. Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim kardiološkim skupovima kao predavač a kroz specijalizaciju sudjelovala u više međunarodnih edukacijskih programa iz kardiologije. Jedan je od autora knjige „Intervencijsko liječenje kardiovaskularnih bolesti“.

Udata je i majka dvije kćeri.