Koncentracije N-terminalnog prohormona B-tipa natrijuretskog peptida i neuregulina-1 beta nakon perkutane koronarne intervencije

Halusek, Roberta

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:909866

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Roberta Halusek

Koncentracije N-terminalnog prohormona B-tipa natrijuretskog peptida i neuregulina-1β nakon perkutane koronarne intervencije

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre Milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić.

Zahvale

Prvenstveno zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić na iznimnom trudu, suradnji i pomoći tokom pisanja ovog rada. Također zahvaljujem Mileni Njegovan mag. med. biochem. na pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela rada te dr. Ozrenu Vinteru, dr.med., liječniku Klinike za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Sestre Milosrdnice koji je u skolopu svog znanstvenog projekta osigurao reagense i odabrao pacijente.

Posebna zahvala ide mojim roditeljima, bakama i djedovima koji su mi mnogo puta podilazili zbog obaveza na fakultetu i bili mi najveća podrška tokom studiranja. Hvala vam što ste mi maksimalno olakšali studiranje.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Akutni infarkt miokarda 1
1.1.1. Patofiziologija 1
1.1.2. Simptomi 3
1.1.3. Epidemiologija 3
1.1.4. Laboratorijska dijagnostika 4
1.1.5. Liječenje 4
1.2. Natrijuretski peptidi 6
1.2.1. B-tip natrijuretskog peptida 7
1.2.1.1. Sinteza i struktura 7
1.2.1.2. Fiziološki učinci 9
1.2.1.3. Klinička značajnost 10
1.3. Neuregulin-1 11
1.3.1. Struktura i signalizacija 11
1.3.1. Funkcija neuregulina-1 u živčanom sustavu 14
1.3.2. Funkcija neuregulina-1 u srcu 14
1.3.2.1. Neuregulin-1 u akutnom infarktu miokarda 16
2. OBRAZLOŽENJE TEME 17
3. MATERIJALI I METODE 18
3.1. Uzorci 18
3.1.1. Razlike između arterijske i venske krvi 18
3.2. Metoda određivanja N-terminalnog prohormona B-tipa natrijuretskog peptida 20
3.3. Metoda određivanja neuregulina-1β 21
3.4. Statističke metode 23
4. REZULTATI I RASPRAVA 25
4.1. Rezultati 25
4.1.1. Deskriptivna statistika 25
4.1.2. Usporedba rezultata s obzirom na vrijeme uzrokovanja 27
4.1.3. Ispitivanje povezanosti 31
4.1.4. Regresijska analiza 33
4.2. Rasprava 34
5. ZAKLJUČCI 40
6. LITERATURA 41

7. SAŽETAK 45
7.1. Sažetak 45
7.2. Summary 46
8. PRILOZI 47
8.1. Popis kratica 47

1. UVOD

1.1. Akutni infarkt miokarda

Akutni infarkt miokarda (AIM) pripada skupini ishemijskih bolesti srca. Ishemijska bolest srca može biti akutna i kronična (stabilna). Akutna se dijeli na akutni infarkt miokarda sa ST-elevacijom i bez nje, te na nestabilnu anginu pektoris (Topić i sur., ured., 2018).

Prema trećoj univerzalnoj definiciji infarkta miokarda (UDMI) koju su objavile krovne svjetske kardiološke udruge i Svjetska zdravstvena organizacija (*European Society of Cardiology/American College of Cardiology Foundation/American Heart Association/World Heart Federation)* termin „akutni infarkt miokarda" koristi se u slučaju postojanja kliničkih dokaza nekroze miokarda koja odgovara akutnoj ishemiji (Kristin Newby, 2017). Definicija definira kriterije za postavljanje dijagnoze AIM, a kriteriji uključuju detekciju porasta i/ili sniženja vrijednosti biomarkera (najbolje troponina I ili T) s minimalno jednom vrijednosti iznad 99. percentile vrijednosti zdrave populacije te barem jedan od sljedećih kriterija: prisutnost simptoma ishemije, promjene u EKG-u (npr. pojava ST-elevacije, razvoj patoloških Q-valova, novi blok lijeve grane), slikovni dokaz novog gubitka održivog miokarda ili nova abnormalnost u mobilnosti stijenke i prisutnost unutarkoronarnog tromba utvrđenog angiografijom ili obdukcijom (Thygesen i sur., 2007).

Prema trećoj UDMI postoji 5 kategorija, ili „tipova" akutnog infarkta miokarda. U praksi se najčešće susrećemo s prva dva tipa. „Tip 1" AIM nastaje zbog rupture aterosklerotskog plaka i okluzije koronarne arterije trombom, što za posljedicu ima ishemiju, leziju i nekrozu miocita, dok je „tip 2" AIM posljedica neuravnoteženosti između opskrbe i potražnje miokarda kisikom (npr. kod anemija, endotelne disfunkcije, spazma koronarne arterije, respiratornih poremećaja) (Kristin Newby, 2017).

Ponekad se kod pacijenata mogu istovremeno ili konsekutivno pojaviti više tipova AIM. Važno je napomenuti da termin AIM ne uključuje smrt stanica miokarda uzrokovanu mehaničkom ozljedom pri aortokoronarnom premošćenju (engl. *bypass*), niti nekrozu miokarda uzrokovanu npr. zatajenjem srca, sepsom i miokarditisom (Thygesen i sur., 2007).

1.1.1. Patofiziologija

S obzirom na dinamiku u EKG-u razlikujemo dvije osnovne skupine AIM: a) Akutni infarkt miokarda sa ST-elevacijom (engl. *ST-elevation myocardial infarction*, STEMI) koji je praćen potpunim gubitkom srčanog krvnog protoka, a manifestira se akutnom boli u prsima te ST-elevacijom koja traje dulje od 20 minuta; b) Akutni infarkt miokarda bez ST-elevacije

(engl. *non ST-elevated myocardial infarction*, NSTEMI) koji je praćen samo djelomičnim gubitkom srčanog protoka, a manifestira se bolovima u prsima te eventualnom dinamikom u EKG-u (koja nije ST-elevacija) (Topić i sur., ured., 2018; Čvorišćec i Čapelak ured., 2009).

Najčešći uzrok nastajanja ishemijskih bolesti srca jest sužavanje koronarnih arterija procesom ateroskleroze. Ateroskleroza je proces koji traje godinama, a počinje nakupljanjem LDL kolesterola i zasićenih masti u intimi (unutrašnjem sloju) krvnih žila. Nakon toga slijedi adhezija leukocita na endotel, a zatim dijapedeza i ulazak u intimu, gdje leukociti akumuliraju lipide i postaju pjenaste stanice koje su bogat izvor proupalnih medijatora. Nastala aterosklerotska lezija naziva se masna pruga. Idući korak je migracija i proliferacija stanica glaktih mišića iz medija te taloženje izvanstaničnog matriksa, uključujući proteoglikane, intersticijski kolagen i elastinska vlakna. Neke od stanica glatkih mišića u uznapredovalim plakovima pokazuju apoptozu. Kako se plak razvija često stvara i kalcifikacije. Plak je u početku okrenut s vanjske strane, a kasnije se izbočuje u lumen krvnih žila. Nastala stenoza uzrokuje smanjen protok kroz krvnu žilu, dovodeći do angine. Kada aterosklerotski plak probije endotel (tzv. ruptura aterosklerotskog plaka) i dođe u doticaj s krvi, dolazi do izlaganje tvari poput kolagena koje potiču aktivaciju i agregaciju trombocita. Nastaje ugrušak koji potpuno prijeći protok krvi. Upravo je STEMI najčešće uzrokovan potpunom i perzistirajućom okluzijom koronarne arterije krvnim ugruškom (trombom) s posljedičnim razvojem opsežne zone nekroze, a što uzrokuje trajnu ST-elevaciju u EKG-u (www.epocrates.com). Do STEMI-ja u rijetkim slučajevima mogu dovesti i ne-aterogena oštećenja koronarnih krvnih žila: arteritisi, traumatska disekcija aorte, spazam, zloupotreba kokaina, kontuzija srca ili urođene abnormalnosti koronarnih žila. STEMI se najčešće javlja u jutarnjim satima što se objašnjava kombinacijom β-adrenergičke stimulacije (povećan vaskularni tonus i arterijski tlak), hiperkoagubilnosti krvi i hiperaktivnosti trombocita (Nikolić i sur., 2012).

Odmah nakon akutnog koronarnog začepljenja protok krvi u koronarnim žilama iza začepljenja prestaje, s izuzetkom male količine krvi koja pritječe kolateralama iz okolnih žila. Zahvaćena zona miokarda odmah gubi sposobnost kontrakcije, dok se kod neinfraktiranih zona u početku javlja hiperkineza, vjerojatno kao rezultat kompenzacijskih mehanizama poput simpatičke aktivnosti i Frank-Starlingovog mehanizma.Tijekom nekoliko sati pošto je prestala opskrba krvlju, stanice miokarda odumiru. Kad je infarktom zahvaćen veliki dio miokarda smanjuje se sposobnost zahvaćene klijetke da izbacuje krv pa je tako smanjen i srčani minutni volumen. Kada se kontrahiraju zdravi dijelovi ventrikularnog mišića, ishemični se dio mišića ne kontrahira, već se djelovanjem tlaka u klijetki izbočuje prema van (tzv. sistoličko

istezanje). Kada se srce više ne može toliko jako kontrahirati da bi izbacilo dovoljno krvi u periferno arterijsko stablo, nastaje zatajenje srca i odumiranje perifernih tkiva zbog periferne ishemije. To se stanje zove kardiogeni šok, a nastaje gotovo uvijek kada je infarktom zahvaćeno više od 40% lijeve klijetke (www.epocrates.com; Guyton i Hall, 2006).

Na animalnim modelima je zapaženo da se ozljeda miokarda širi od unutarnjeg sloja srčanog mišića (subendokardijalni mišićni sloj) do vanjskog sloja (subepikardijalni mišićni sloj), nakon čega se kaže da je infrakcija „pune debljine". Kod onih koji prežive STEMI, odumrlo mišićno tkivo postepeno se zamjenjuje ožiljnim tkivom (fibroza), a sam stupanj oštećenja miokarda odredit će njegovu sposobnost izbacivanja krvi i moguć razvoj zatajenja srca (National Clinical Guideline Centre, 2013).

1.1.2. Simptomi

Tipični i vodeći simptom u bolesnika s AIM je snažna i naglo nastala bol u prsišu koja se često širi u donju čeljust, lijevo rame i/ili lijevu ruku i traje neprekidno kroz 30 do 60 minuta. Međutim simptomi mogu biti netipični pa se bol može osjetiti u trbuhu, širiti u desnu ruku ili bolesnik uopće nema bolova već prevladavaju nespecifični simptomi poput opće slabosti, nedostatka zraka ili mučnine. Ovoj netipičnoj kliničkoj slici skolinje su osobe sa šećernom bolesti, žene i stariji bolesnici (Sertić i sur., ured., 2015). Registri pokazuju da 30% pacijenata sa STEMI-jem ima atipične simptome infarkta (Steg i sur., 2012). Simptomi ishemije se mogu pojaviti puno prije samog AIM, međutim zbog nepravremene intervencije dolazi do samog incidenta.

1.1.3. Epidemiologija

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), 12 milijuna ljudi godišnje umre zbog kardiovaskularnih bolesti. Kardiovaskularne bolesti time uzrokuju 50% ukupne smrtnosti (Nikolić i sur., 2012). Akutni infarkt miokarda je najteža manifestacija bolesti koronarnih arterija, koja godišnje uzrokuje više od 2 milijuna smrtnih slučajeva u SAD-u i više od 4 milijuna u Europi i sjevernoj Aziji. Od akutnog infarkta miokarda, umre 50% pacijenata prije nego što dođe do bolnice, dok kod pacijenata koji su hospitalizirani mortalitet iznosi 5-10%. Od 1990-e do danas incidencija STEMI-ja se smanjila, a NSTEMI-ja blago povećala. NSTEMI je učestaliji nego STEMI i čini 60-75% svih slučajeva akutnog infarkta miokarda (Reed i sur., 2016). Godišnja incidencija pacijenata s NSTEMI-jem je oko 3/1000 stanovnika, a pacijenata sa STEMI-jem oko 66/100000. Hospitalni mortalitet je viši kada je riječ o pacijentima sa STEMI-jem, ali se taj broj s vremenom mijenja tako da se nakon 6

mjeseci izjednačuje te je mortalitet u objema skupinama oko 12 do 13% (Topić i sur., ured., 2018). Prije uvođenja koronarnih jedinica šezdesetih godina 20. stoljeća, hospitalni mortalitet je iznosio oko 25-30%. Mortalitet 1980-ih godina prije reperfuzijske terapije iznosio je 16% (Nikolić i sur., 2012), dok je razvoj moderne intervencijske kardiologije tijekom 2000-tih doveo je do sniženja unutarbolničkog mortaliteta u AIM do razine od oko 5% (Babić, 2016).

1.1.4. Laboratorijska dijagnostika

Određivanje biljega srčanog oštećenja u krvi jedna je od ključnih pretraga prilikom postavljanje dijagnoze AIM. Razlog tomu je što nisu svi slučajevi AIM praćeni promjenama u EKG-u i tipičnim simptomima. Laboratorijske pretrage mogu pomoći i pri procjeni težine oštećenja, praćenju uspješnosti terapije te u procjeni rizika i prognoze bolesti (Topić i sur., ured., 2018).

Srčani biljezi su proteinske molekule specifične za srce koje se oslobađaju pri oštećenju srčanih stanica. Najvažniji od njih je troponin (T ili I) kojeg smatramo biljegom najveće dijagnostičke specifičnosti. Njegov porast u serumu bilježi se već nekoliko sati nakon srčanog oštećenja, a vrijednosti ostaju povišene i do dva tjedna. Danas su dostupni tzv. visokoosjetljivi testovi (engl. *high sensitive,* hs) za mjerenje troponina koji omogućuju detekciju malih promjena u koncentraciji, a što je od ključne važnosti u postavljanju dijagnoze s obzirom da se tropnin mjeri tri puta u zadanim vremenskim intervalima. Delta troponina (promjena vrijednosti nakon tri sata) ključna je za razlikovanje akutnih promjena od stabilnih kronično povišenih vrijednosti. Kod pacijenata s AIM, koncentracija troponina mjerena tri ili četiri dana nakon infarkta može pomoći u procjeni jačine infarkta i u dinamici nekroze (Topić i sur., ured., 2018)..

Od općih laboratorijskih pretraga mogu se koristiti određivanje koncentracije elektrolita, kompletna krvna slika (u AIM broj leukocita u krvi poraste nakon nekoliko sati, te dosegne vrijednost 12 do 15 x 10^9/L, a ostaje povišen tri do sedam dana,a sedimentacija je lagano povišena ili unutar referentnog intervala) te određivanje acidobaznog statusa (pH, parcijalni tlak kisika i ugljikovog dioksida u krvi). Koriste se i laboratorijske pretrage koje upućuju na funkciju drugih organa poput jetre i bubrega (npr. kreatinin, ureja, jetreni enzimi) (Topić i sur., ured., 2018).

1.1.5. Liječenje

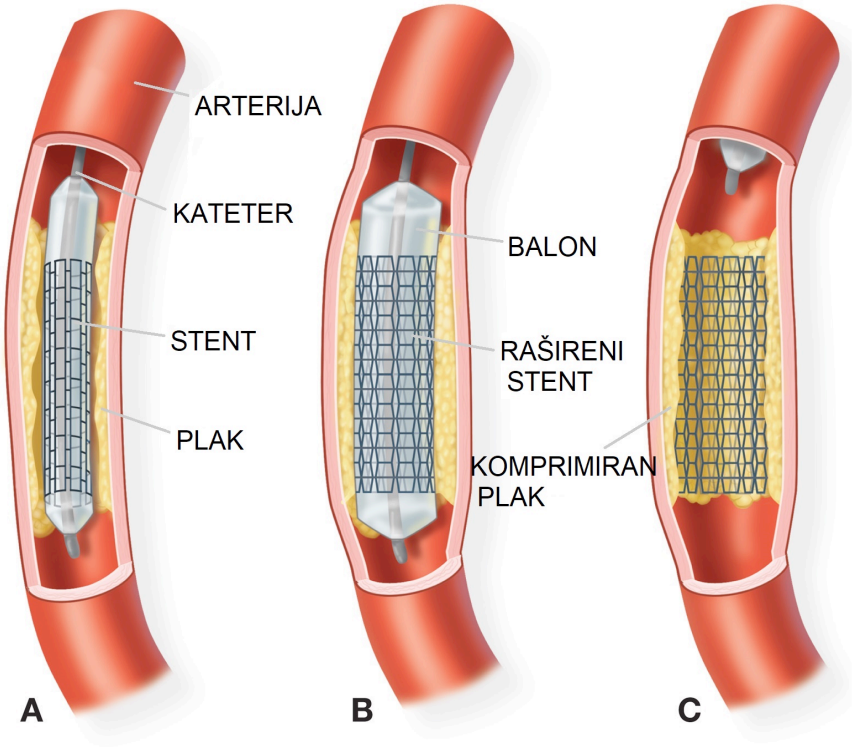
Pacijenti sa STEMI-jem zahtjevaju hitnu koronarografiju i intervenciju. Inicijalni postupci uključuju nadzor i stabiliziranje vitalnih funkcija bolesnika, ublažavanje angioznih

bolova (nitrati, pripravci morfija, β-blokatori) i primjenu antitrombocitnih lijekova. Bolenik mora što prije dobiti acetilsalicilnu kiselinu (ASK) u dozi zasićenja od 300 mg jer sama ASK umanjuje smrtnost za četvrtinu. Osim ASK obavezna je primjena još jednog antitrombocitnog lijeka iz skupine blokatora ADP receptora na trombocitima (npr. klopidogrela). Tijekom rane faze bolesnik mora biti neprekidno monitoriran zbog visokog rizika od iznenadne smrti uzrokovane zloćudnim ventrikularnim aritmijama (Sertić i sur., ured., 2015).

Osnovni cilj u bolesnika sa STEMI-jem je što prije započeti reperfuzijsko liječenje jer se odgađanjem rekanalizacije začepljene koronarne arterije gubi sve više miokarda pri čemu raste rizik od smrti i ostalih komplikacija infarkta, osobito srčanog popuštanja. Reperfuzijsko liječenje uključuje fibrinolizu i perkutanu koronarnu intervenciju (PCI) (Sertić i sur., ured., 2015). Perkutana koronarna intervencija u akutnom infarktu miokarda obuhvaća primarnu PCI, PCI kombiniranu s farmakološkom reperfuzijskom terapijom i spašavajuću ili tzv. rescue PCI nakon neuspjele fibrinolize. Primarna ili direktna angioplastika s implantacijom stenta ili bez nje znači primjenu perkutane transluminalne koronarne angioplastika (PTCA) u bolesnika s akutnim infarktom miokarda bez prethodne fibrinolitičke terapije. Primarna PCI-a danas je terapija izbora u liječenju AIM-a (Mihatov, 2003). PTCA se izvodi perkutanom punkcijom femoralne, radijalne ili brahijalne arterije. Žičana vodilica se umeće u veliku perifernu arteriju i uvodi do odgovarajućeg koronarnog ušća. Kateter s balonom navođen fluoroskopski ili intravaskularnom ultrasonografijom se uvede do mjesta stenoze te napuše da razbije aterosklerotski plak i proširi arteriju (www.msd-prirucnici.placebo.hr). Prije nego se kateter ukloni napravi se još jedan angiogram kako bi se potvrdilo da je blokada adekvatno otvorena.

Ugradnja intrakoronarnih stentova (potpornica) u bolesnika s AKS-om pomaže mehaničkoj stabilizaciji rupturiranog aterosklerotskog plaka na mjestu lezije (Mihatov, 2003). Stent je sitni, šuplji cilindrični uređaj izrađen od nehrđajućeg čelika koji je usmjeren na mjesto blokade koronarnih arterija na isti način kao i balon u gore spomenutom postupku. Za razliku od balona koji jednostavno pritisne aterosklerotski plak na zidove arterije i zatim se uklanja, stent ostaje unutar arterije kako bi se spriječila ponovna stenoza (Slika 1.) (anushrava.wordpress.com). Stentovi presvučeni djelotvornom farmakološkom supstancijom još su uspješniji u smanjenju pojave restenoze (Mihatov, 2003).

Obavezan dio liječenja su i statini u visokim dozama koji osim što povoljno utječu na razinu serumskih lipida i progresiju ateroskleroze, smiruju upalu u aterosklerotskim plakovima što omogućuje njihovu stabilizaciju i tako umanjuju rizik od ponavljanja akutnog koronarnog sindroma (Sertić i sur., ured., 2015).



Slika 1. Perkutana koronarna intervencija
(preuzeto i prilagođeno s: https://biology-forums.com, pristupljeno: 22.03.2018.)

1.2. Natrijuretski peptidi

Natrijuretski peptidi su peptidni hormoni koji se sintetiziraju u srcu, mozgu i drugim organima. Oslobađanje tih peptida iz srca je potaknuto rastezanjem atrija i ventikula kao i neurohumoralnim stimulansom pri srčanom zatajenju. Natrijuretski peptidi članovi su porodice koju čine 4 neurohormona: atrijski natrijuretski peptid (ANP), moždani natrijuretski peptid (b-tip natrijuretskog peptida, BNP), C-tip natrijuretskog peptida (CNP) i urodilatin. 1983. godine, u srcu štakora, otkriven je prvi narijuretski peptid, ANP (engl. *atrial natriretic peptide*), polipeptid od 28 aminokiselina. Za razliku od BNP-a, ANP najveću koncentraciju ima u srčanom atriju (pretklijetci) te se brzo izlučuje kao odgovor na njegovo istezanje. Zdravo srce izlučuje izuzetno male količine ANP-a, a povišene vrijednosti u krvi nađene su u pacijenata sa hipertrofijom lijeve klijetke i bolesti mitralnih zalistaka (Schreiber, 2018). BNP (engl. *brain natriuretic peptide*) otkriven je 1988. godine u mozgu svinje kao supstanca slična atrijskom natrijuretskom peptidu. Premda se danas zna da se najveće koncentracije nalaze u ventrikulu (klijetci) srca, naziv se zadržao. CNP (engl. *capillary natriuretic peptide*) se uglavnom stvara u stanicama vaskularnog endotela i kao autokrini i parakrini faktor važan je za regulaciju vaskularnog tonusa. Urodilatin je lokaliziran u bubrezima i sudjeluje u

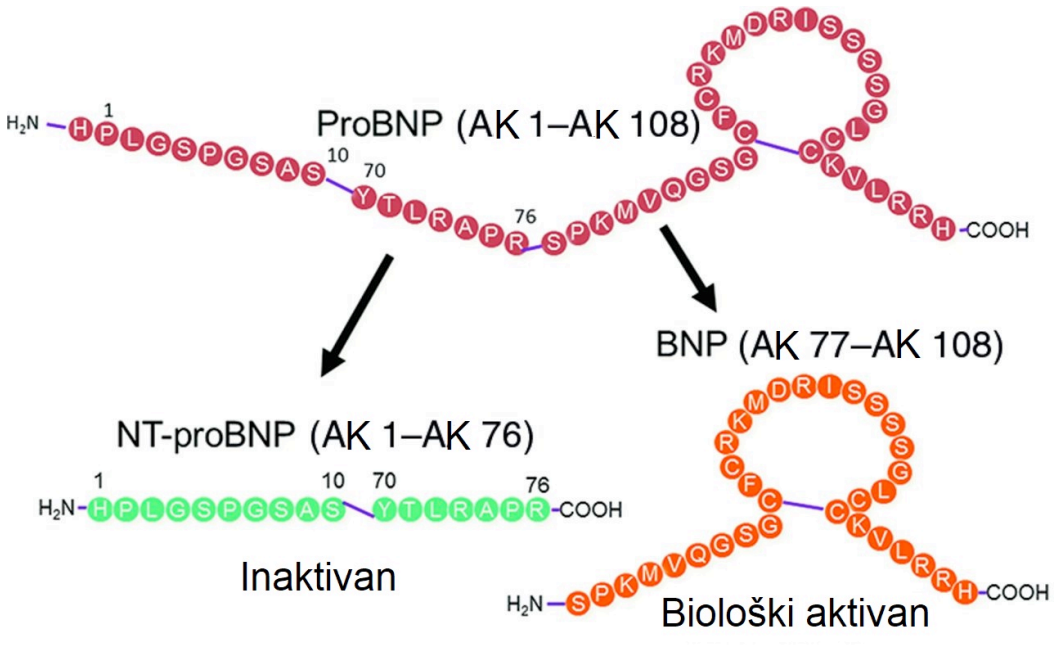
reapsorpciji vode i elektrolita iz urina. To su strukturno slični peptidi s 12 zajedničkih aminokiselina koje su identično postavljene unutar prstena koji nastaje stvaranjem disulfidnog mosta između dviju molekula cisteina. Glavna funkcija im je regulacija sistemskog krvnog tlaka i homeostaze vode i elektrolita u organizmu (Dajak i sur., 2003; Topić i sur., ured., 2018).

1.2.1. B-tip natrijuretskog peptida

1.2.1.1. Sinteza i struktura

Iako su niske razine BNP-a pohranjene zajedno s ANP-om u atrijskim granulama, BNP je nađen u najvećim koncentracijama u srčanom ventrikulu. U tom tkivu, BNP se ne pohranjuje u granulama, veće se sintentizira prema potrebi kao odgovor na stanja srčanog stresa kao što je volumno i tlačno preopterećenje. Sinteza BNP-a je regulirana transkripcijskim faktorom GATA4, a sam gen za BNP je lokaliziran na prvom kromosomu. Genska ekspresija BNP može se jako brzo povećati kao odgovor na određeni stimulans (Potter i sur., 2016).

Srce kontinuirano proizvodi malu količinu proteina prekursora preproBNP-a. PreproBNP sastavljen od 134 aminokiseline, cjepa se na proBNP (108 aminokiselina) i signalni peptid (26 aminokiselina). ProBNP se dalje proteolitički cijepa pomoću enzima korina i furina na aktivni hormon BNP (32 aminokiseline) i inaktivni N – terminalni kraj NT – proBNP (76 aminokiselina) koji se u cirkulaciju izlučuju u ekvimoralnim količinama (Slika 2.). Premda je izlučivanje ekvimoralno, zbog razlike u poluvremenu života između BNP-a i NT-proBNP-a, njihove koncentracije u krvi su različite. Naime, NT-pro BNP ima poluvrijeme života 60-120 minuta, a BNP samo 20 minuta. Razlog su različiti putovi eliminacije molekula iz cirkulacije, dok se BNP eliminira iz tijela različitim metaboličkim putevima (specifični stanični receptori, endopeptidaze), NT-proBNP se eliminira samo renalnom ekskrecijom (Flegar Meštrić i sur., 2017). Iz tog razloga koncentracije NT-proBNP-a u krvi su 3-5 puta više od koncentracija BNP-a Bitna razlika je i u stabilnosti na sobnoj temperaturi. NT-proBNP je stabilan 72 sata, a BNP manje od 4 sata. Iz navedenih razloga NT-proBNP se preferira kao biomarker pred BNP-om (Topić i sur., ured., 2018; Čvorišćec i Čapelak ured., 2009).



ProBNP – prohormon B-tipa natrijuretskog peptida; NT-proBNP – N-terminalni prohormon B-tipa natrijuretskog peptida; BNP – B-tip natrijuretskog peptida; AK – aminokiselina

Slika 2. Cjepanje proBNP-a na BNP (aktivan – povisuje cGMP) i NT-proBNP (neaktivan) (preuzeto i prilagođeno s: http://clinchem.aaccjnls.org, pristupljeno: 25.02.2018.)

Identificirana su tri receptora natrijuretskih peptida: NPR-A, NPR-B i NPR-C (engl. *natriretic peptide receptor*). Vezanje natrijuretskih peptida na receptore A i B na površini ciljnih stanica vodi ka stvaranju drugog glasnika cGMP (engl. *cyclic guanosine monophosphate;* ciklički gvanozin monofosfat) koji posreduje u većini bioloških učinaka natrijuretskih peptida. BNP se prvenstveno veže na NPR-A receptore (Eroglu i sur., 2008). Natrijuretski peptidi se uklanjaju iz cirkulacije pomoću receptora C. Ovi receptori su naručito zastupljeni u bubrezima i vaskularnom tkivu. Natrijuretički peptidi se razgrađuju i pod utjecajem jedne membranski vezane neutralne endopeptidaze (engl. *neutral endopeptidase,* NEP), cinkmetaloproteinaze. NEP je široko rasprostranjena u organizmu, a nalazi se na površini endotelnih stanica, glatkih mišićnih stanica, srčanih mišićnih stanica, bubrežnog epitela i fibroblasta. S obzirom da BNP ima najmanji afinitet za NRP i NEP od svih natrijuretskih peptida, ima i najdulje poluvrijeme života (Dajak i sur., 2003; Eroglu i sur., 2008).

1.2.1.2. Fiziološki učinci

BNP je uključen u dugoročnu regulaciju ravnoteže vode i elektrolita, volumena krvi i arterijskog tlaka. Postoje dva glavna puta djelovanja BNP-a, a to su vazodilatatorni učinci i učinci na bubrege koji dovode do natrijureze i dijureze. BNP izravno dilatira vene čime se u njima snižava krvni tlak. BNP također dilatira arterije što smanjuje sistemski vaskularni otpor i sistemski arterijski tlak. Mehanizam sistemske vazodilatacije uključuje aktivaciju NPR receptora koja dovodi do rasta cGMP-a u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama, kao i smanjenje simpatičkog vaskularnog tonusa. Taj mehanizam može biti aktivan i u središnjem živčanom sustavu gdje također imamo NPR receptore, kao i inhibicija otpuštanja norepinefrina (www.cvphysiology.com).

Učinci na bubrege uključuju povećanje brzine glomerularne filtracije (GFR) koja rezultira natrijurezom (povećanim izlučivanjem natrija) i dijurezom (povećanim izlučivanjem tekućine). Renalni učinci BNP-a su kalij štedeći, za razliku od većine dijuretskih lijekova koji se koriste za izazivanje dijureze i natrijureze kod bolesnika. Ostala djelovanja BNP-a na bubrege uključuju smanjeno lučenje renina te posljedično smanjenje razina angiotenzina II i aldosterona u krvi. Sniženje angiotenzina II također pridonosi sistemskoj vazodilataciji i smanjenju sistemskog vaskularnog otpora. Ovi učinci zajedno smanjuju volumen krvi, arterijski tlak, središnji venski pritisak, plućni kapilarni tlak i srčani izbačaj. Ukratko, BNP služi kao antagonist renin-angiotenzin-aldosteronskom sustavu (www.cvphysiology.com).

Razlog zbog kojeg se kod srčanog zatajenja proizvodnja BNP-a značajno poveća je njegovo zaštitno djelovanje. Naime, kod slabijeg rada srca dolazi do povećanja volumena tjelesnih tekućina. Tada se u srcu, zbog proširenja stijenke ventrikula i pojačanog pritiska na nju stvara i izlučuje BNP - sa zadatkom da pojača izlučivanje tekućine kroz bubrege, smanji pritisak u srcu, plućima, olakša disanje i smanji edeme nogu. BNP opušta glatke mišićne stanice, ima antiproliferativno i antifibrotičko djelovanje na krvožilno tkivo. Time se spriječava rast i hipertrofiju srčanog mišića. Krajnji učinak je smanjenje ventrikularnog opterećenja koje je i uzrokovalo povećano stvaranje i izlučivanje BNP-a (www.cvphysiology.com).

Zbog kardioprotektivnih uloga BNP-a razvijen je rekombinantni ljudski BNP ili nesiritid koji je odobren za akutno liječenje kongestivnog srčanog zatajenja uzrokovanog sistoličkom disfunkcijom (www.cvphysiology.com).

1.2.1.3. Klinička značajnost

Kako kod slabijeg rada srca dolazi do pojačanog stvaranja i oslobađanja BNP-a u cirkulaciju, on se koristi kao biomarker u dijagnostici, prognozi i praćenju terapije srčanog zatajenja. Studije su pokazale odličnu povezanost između povišenih koncentracija BNP-a u krvi i smanjene funkcije srčanih klijetki, a posebno lijeve klijetke. Zbog toga BNP ima odličnu negativnu prediktivnu vrijednost u ispitivanju disfunkcije lijeve klijetke, odnosno srčanog zatajenja (Eroglu i sur., 2008; Dajak i sur., 2003). Zbog njegove visoke negativne prediktivne vrijednosti (98%) NT-proBNP se smatra korisnim biopokazateljem za isključenje srčanog zatajenja ako mu je koncentracija ispod granične vrijednosti (125 ng/L), dok se koncentracija iznad granične vrijednosti ne može rabiti za postavljanje dijagnoze već je potrebno napraviti testove potvrde (ehokardiografija) (Flegar Meštrić i sur., 2017). Mjerenje BNP-a je korisno za „screening" kod visoko rizične populacije. Također je pogodan za „screening" hipertenzivnih pacijenata za otkrivanje hipertrofije ili/i disfunkcije lijeve klijetke, kao i za procijenu rizika kod subakutne faze akutnog infarkta miokarda (Dajak i sur., 2003). Studije su pokazala da je BNP vrlo koristan u optimiziranju terapije pacijenata sa srčanim zatajenjem. Naime, unatoč napretku u liječenju, i dalje je prisutan visok stupanj morbiditeta i mortaliteta zbog srčanog zatajenja. To je djelomično zbog toga što se optimalna doza lijeka teško procjeni jer ne postoje rutinski testovi koji bi ukazivali na ozbiljnost srčanog zatajenja. No, BNP može pružiti objektivne podatke o stanju srca i tako pomoću u optimiziranju terapije. Razine BNP-a u krvi padaju kao odgovor na najčešće pripisanu terapiju (npr. ACE inhibitorima) (Ghashghaei i sur., 2016).

Mjerenje natrijuretskih peptida korisno je i u diferencijalnoj dijagnostici dispneje. Najčešći uzroci dispneje nepoznatog uzroka u hitnoj službi su kongestivno zatajenje srca, kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB), akutni koronarni sindrom (ACS), astma, upala pluća i plućna embolija. Povišene vrijednosti BNP-a najčešće govore da je prisutna dispneja srčanog porijekla. No, nove studije pokazuju da je BNP često izrazito povišen i u plućnoj emboliji, tako da pozitivna vrijednost BNP-a zapravo nije 100% kardiospecifična. U oko 20% bolesnika sa bolestima pluća, vrijednosti natrijuretskih peptida su povišene. Zbog toga natrijuretski peptidi imaju prognostičko značenje, ne samo u srčanim već i u plućnim bolestima, što su pokazale novije studije (Rogić, 2015).

Akutni koronarni sindrom također inducira povećanje koncentracije BNP-a u plazmi (Rogić, 2015). U prvim satima akutnog infarkta miokarda, BNP se oslobađa kao posljedica ishemije i nekroze stanica miokarda. Nakon toga, BNP se oslobađa kao rezultat dijastoličke

i/ili sisitoličke disfunkcije i rastezanja srčane klijekte (Fazlinezhad i sur., 2011). Kao komplikacija akutnog infarkta miokarda može se javiti preuredba lijeve klijetke, koja je karakterizirana njezinim širenjem, promjenom geometrije i progresivnim pogoršanje funkcije. Preuredba je direktno povezano s razvojem srčanog zatajenja i lošom prognozom. Stoga je važno otkriti pacijente s visokim rizikom od preuredbe lijeve klijetke u ranim fazama. Studije su pokazale izravnu koleraciju disfunukcije i progresivne preuredbe lijeve klijetke sa vrijednostima BNP-a. Stoga se čini da mjerenje razine BNP u plazmi u ranoj fazi miokardijalnog infarkta može biti korisno kao neinvazivna metoda za identifikaciju pojedinaca, kod većeg rizika od komplikacija poput zatajenja srca i smrtnosti nakon AIM (Günefl i sur., 2008; Fazlinezhad i sur., 2011). BNP i NT- proBNP su se pokazali kao dobri prediktivni biomarkeri mortaliteta kod pacijenata s akutnim infarktom miokarda s ST-elevacijom podvrgnutim primarnoj perkutanoj koronarnoj intervenciji (PPCI). U tom slučaju pacijenti s koncentracijom BNP-a višom od 600 ng/L imaju dvostruko viši rizik od smrti (Rogić, 2015).

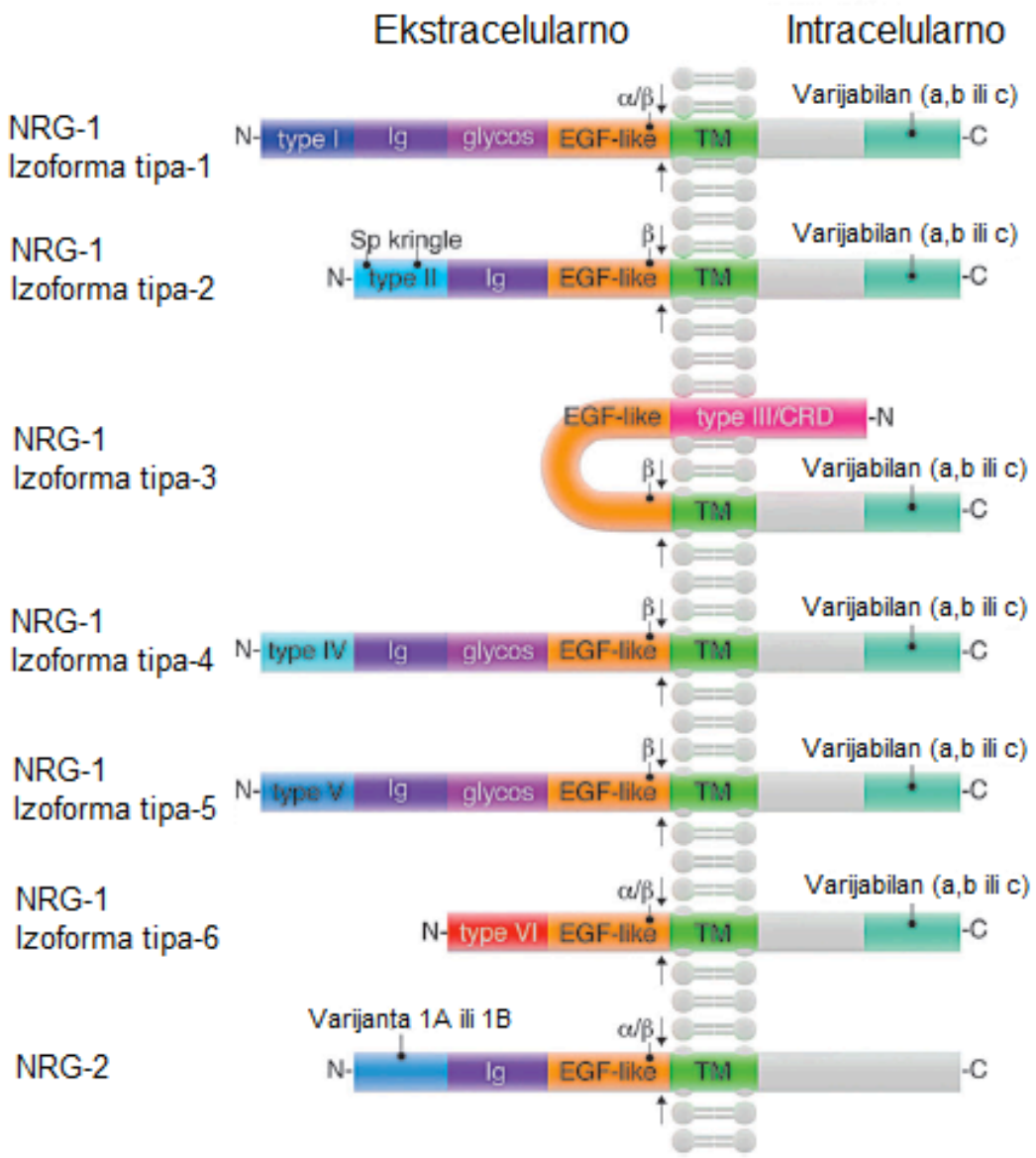
Budući da se NT-proBNP prvenstveno izlučuje kroz bubrege, njegova vrijednost raste paralelno s pogoršanjem funkcije bubrega, pa je to potrebno uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata kod bubrežnih bolesnika Također je vrlo važno uzeti u obzir pacijentov BMI jer su vrijednosti u pretilih pacijenata znatno niže nego kod pacijenata s normalnom težinom. Drugim riječima, one su obrnuto proporcionalne BMI-u, pa postoji opasnost od pogrešne klasifikacije pretilih pacijenata na temelju vrijednosti natriuretskih peptida (Rogić, 2015).

1.3. Neuregulin-1

1.3.1. Struktura i signalizacija

Neuregulini (NRG-i) pripadaju obitelji epidermalnih faktora rasta koji imaju važnu ulogu u razvoju i popravku živčanog sustava. Neuregulin je prvo izoliran iz živčanog tkiva gdje je otkriveno da potiče proliferaciju Schwannovih stanica, stoga se naziva i glijalnim faktorom rasta (engl. *glial growth factor*, GGF). Vezanjem na receptorsku ErbB2 tirozin kinazu, dolazi do fosforilacije čime se aktivira signalni put kojim se potiče mitogena aktivnost Schwannovih stanica. Naknadne studije otkrile su srodne fosfoErbB2 aktivirajuće proteine, za koje je utvrđeno da su izoforme produkta jednog gen, nazvanog neuregulin-1 (NRG-1). Identifikacija tri dodatna gena (NRG-2, NRG-3 i NRG-4) koja kodiraju funkcionalno slične izoforme, rezultiraju u različitoj nomeklaturi NRG obitelji. NRG nomenklatura uključuje gen,

N-terminalnu sekvencu, C-terminalnu sekvencu koju čini domena slična epidermalnom faktoru rasta (EGF) i citoplazmatsku domenu. NRG-1 gen sadrži NRG-1 je najčešće proučavan gen, lokaliziran na koromosomu 8. NRG-1 gen sadrži 21 ekson te ima 31 potencijalnih proteinskih izoformi. Prema N-terminalnoj domeni razlikujemo NRG-1 izoforme: tip 1, tip 2, tip 3, tip 4, tip 5 i tip 6. NRG-1 amino teminlna regija može sadžavati signalni peptid, kringle-sličnu domenu, cisteinom bogatu domenu, imunoglobulin sličnu domenu i glikoziliranu regiju (Parodi i Kuhn, 2014). Sve izoforme NRG-1 sadrže EGF sličnu domenu koja posreduje u vezanju NRG-a-1 za receptor. Prema toj domeni razlikujemo izoforme α i β NRG-a-1, koje također mogu postojati u različitim varijantama. In vitro studije su pokazale da su β izoforme puno potentnije od α izoformi, što ne znači da su α izoforme biološki nevažne. Otkriveno je da su upravo α izoforme ključne u razvoju dojki. EGF slična domena sadrži jukstamembransku regiju koja služi kao mjesto proteolitičkog cijepanja.



NRG – neuregulin; TM – transmembranska domena; Ig – imunoglobulinu slična domena; EGF-like – domena slična epidermalnom faktoru rasta; SP – signalni peptid

Slika 3. Strukture izoformi NRG-a-1 i NRG-a-2 (strelice pokazuju mjesta proteolize)

(preuzeto i prilagođeno s: https://www.escardio.org, pristupljeno: 25.02.2018.)

Neureguline eksprimiraju različite vrste stanica u kojima su podvrgnuti cjepanju prilikom parakrine/jukstakrine signalizacije ili se u slučaju NRG β-3 izoforme izravno izlučuju u izvanstanični prostor. Nakon izlučivanja u izvanstanični prostor NRG-i se vežu za ErbB tirozin kinazni receptor eksprimiran na ciljnim stanicama. ErbB obitelj receptora čine 4 člana: ErbB1 (također poznat kao receptor epidermalnog faktora rasta), ErbB2, ErbB3 i ErbB4. Vezanje NRG-a dovodi do dimerizacije i fosforilacije receptora (kanonska Nrg/ErbB signalizacija), ili do cjepanja receptora i do njegove internalizacije (nekanonska Nrg/ErbB signalizacija) (Parodi i Kuhn, 2014).

1.3.1. Funkcija neuregulina-1 u živčanom sustavu

NRG je važan u razvoju i funkcioniranju živčanog sustava, pa je tako uključen u modulaciju neuronske migracije, sinaptogenezu, gliogenezu, neuron-glija komunikaciju, mijelinaciju i neurotransmisiju (Harrison i Law, 2006).

NRG-i i njihovi receptori, ErbB-i, identificirani su kao geni osjetljivosti za bolesti poput shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Nedavne studije su otkrile kompleksne NRG/ErbB signalne puteve koji reguliraju stvaranje neuralnih veza, mijelinizaciju, neurotransmisiju i sinaptičku plastičnost. Dokazi ukazuju da postoji optimalna razina signalizacije NRG/ErbB u mozgu, a odstupanje od nje pogoršava funkcioniranje mozga. NRG/ErbB signalni putevi mogli bi biti terapijske mete za specifične neuropsihijatrijske simptome (Mei i Nave, 2014).

1.3.2. Funkcija neuregulina-1 u srcu

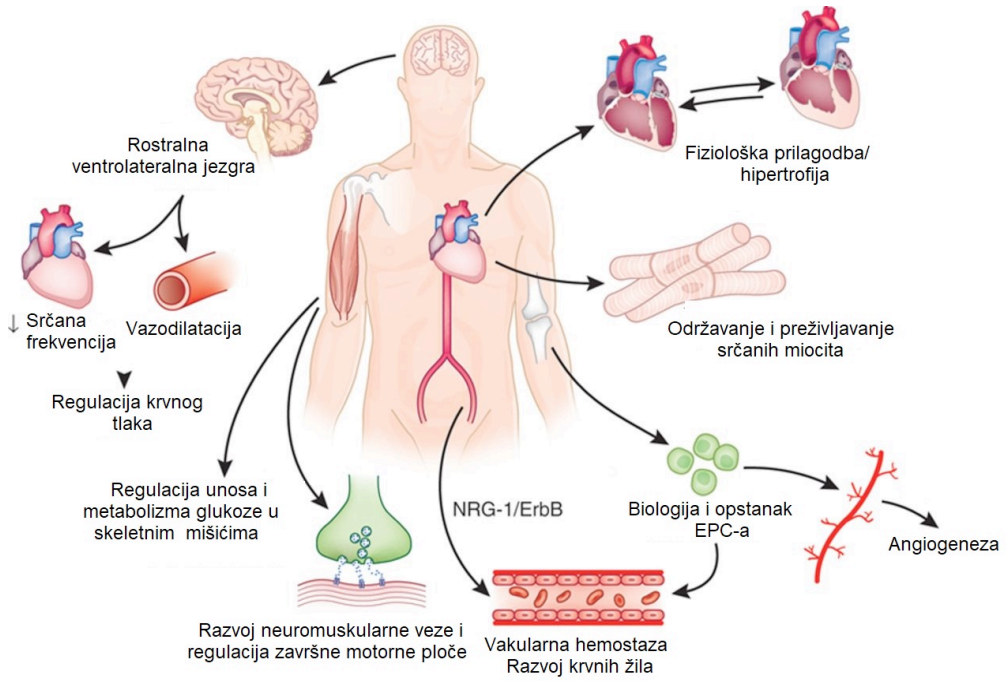
Više studija otkrilo je da su NRG-1 i njegovi receptori (ErbB2, ErbB3 i ErbB4) ključni u razvoju srca (Lai i sur., 2017). U prenatalnom srcu NRG-1 i NRG-2 sintetiziraju mikrovaskularne endotelne stanice. Nakon otpuštanja u izvanstanični prostor NRG se veže za ErbB4 receptor eksprimiranim u miokardu. Vezanje NRG-1 ili NRG-2 na ErbB4 i dimerizacija s ErbB2, rezultira signalnom kaskadom koja promovira proliferaciju i diferencijaciju kardiomiocita. Osim proliferacije i diferencijacije radnih kardiomiocita, NRG-1 također promovira diferencijaciju i regrutaciju kontraktilnih kardiomiocita u sustavu srčanog provođenja. U odraslom srcu, NRG se eksprimira kao odgovor na fiziološki stres. Naime, otkriveno je da endogeni i egzogeni NRG-1 pokazuje nekoliko kardioprotektivnih i kardioregenerativnih funkcija, a to su zaštitu od: apoptoze, miofibrilarnog poremećaja, kardiomiopatije inducirane antraciklinom i nastanka ožiljka. Otkriveno je da NRG-1 ima ulogu i u srčanoj hipertrofiji, međutim ta uloga nije u potpunosti razjašnjena.

Važnost NRG-1 u postnatalnoj srčanoj homeostazi dodatno je dokazana nastalom kardiotoksičnosti kod pacijentica koje primaju Herceptin kao kemoteraputik u liječenju karcinoma dojke. Naime, Herceptin je usmjeren na ErbB2 receptor, pa time spriječava djelovanje NRG-1. Taj rezultat je u skladu i sa ispitivajima koja pokazuju da uklanjajnje ErbB2 receptora kod miševa rezultira kardiomiopatiom, iako se detaljan stanični mehanizam Herceptinom uzrokovane kardiomiopatije tek treba razjasniti (Parodi i Kuhn, 2014). Otkriveno je da nakon prestanka terapije kardiomiopatija često nestaje. Nova humana antitumorska anti-ErbB2 antitijela, Erb-hcAb , koji su selektivno citotoksična za ErbB2-pozitivne stanice karcinoma in vitro i vivo, prepoznaju epitop različit od Herceptina i ne

pokazuje kardiotoksične efekte s obzirom da ne zahvaćaju ErbB2-ErbB4 signalni put kojeg aktivira NRG-1 u srčanim stanicama (Fedele i sur., 2012).

NRG-1 također može promicati srčanu funkciju djelovanjem na stanice koje nisu kardiomiociti. Ekspresija NRG-1 dovodi do poboljšanja srčane funkcije nakon ozljede induciranjem angiogeneze. Pokazalo se da NRG-1 prisutan u endotelu promiče angiogenezu, kako in vitro tako i in vivo, te je utvrđeno da redukcija NRG-a korelira sa smanjenjem angiogeneze nakon ishemijske ozljede. Studije su pokazale da endotelin-1 i povećani mehanički stres u srcu povećavaju ekspresiju NRG-1, dok ju angiotenzin II i fenilefrin smanjuju. Koncept regulacije ekspresije NRG- stresom dodatno podupiru studije koje pokazuju da je ekspresija NRG-a u srcu povećana tijekom trudnoće, kada hemodinamski stres povećava srčano opterećenje (M. Parodi i Kuhn, 2014).

Eksperimentalna in vivo istraživanja pokazala su da NRG-1 može značajno poboljšati srčanu funkciju kod akutne i kronične ishemične kardiomiopatije i miokarditisa te su klinička ispitivanja faze 2 otkrila da kratkotrajna primjena rekombinantnog NRG-1 može poboljšati srčanu funkciju kod pacijenata sa srčanim zatajenjem .Međutim, faza 3 kliničkih ispitivanja primjene rekombinantnog NRG-1 u zatajenju srca je još u tijeku (Lai i sur., 2017). Slika 4 prikazuje potencijalne funkcije NRG-a-1 u odraslom srcu.



NRG-1 – neuregulin-1; EPC-epidermalne progenitorske stanice

Slika 4. Funkcije NRG-a-1 u odraslom organizmu

(preuzeto i prilagođeno s: http://circres.ahajournals.org, pristupljeno: 23.3.2018.)

1.3.2.1. Neuregulin-1 u akutnom infarktu miokarda

Velika količina adrenalina oslobađa se simpatičkim živčanim sustavom tijekom akutne ishemije miokarda, a vrhunac simpatičke preuredbe postiže se tjedan dana nakon infarkta. U isto vrijeme dolazi do simpatičke hiperinervacije, pa tako prisutna inervacijska neravnoteža igra bitnu ulogu u razvoju ventrikularnih aritmija. Nakon infarkta miokarda javlja se i ozljeda vagusnog živca, nekroza, regeneracija i rekonstrukcija. Neke studije usmjerene su na ispitivanje uloga NRG-1 u popravku živaca i neurohumoralnoj regulaciji srčane ozljede, međutim učinci NRG-a-1 u neuranoj preuredbi nakon AIM ostaje nejasna. Lai i sur. dokazali su da rekombinantni NRG-1 može poboljšati funkciju srca i regulirati simpatičko i vagusno remodeliranje nakon AIM-a kod štakora. Time se postiže nova živčana uravnoteženost što štiti srce od ozljede (Lai i sur., 2017).

Predkliničke studije su pokazale da ishemijska ozljeda miokarda aktivira NRG-1β. Ranije kliničke studije govore o povezanost između razina NRG-1β u krvi i ozbiljnosti zatajenja srca i koronarnih bolesti. Neke studije upućuju na to da bi NRG-1β mogao biti koristan biomarker, ne samo u dijagnostici infarkta miokarda, nego i svih oblika akutnog koronarnog sindroma. (MaameYaa i sur., 2016).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

S obzirom da je akutni infarkt miokarda jedan od vodećih uzroka mortaliteta i morbiditeta u razvijenim državama, u tijeku su brojna istraživanja kojima se nastoje otkriti prikladni klinički pokazatelji stanja miokarda, prognoze i odgovora na terapiju. Prvu kateterizaciju srca izveo je 1929.-te godine njemački liječnik Verner Forsman na samome sebi, a perkutanu koronarnu intervenciju kao metodu liječenja akutnog koronarnog sindroma uveo je 1977.-e švicarski liječnik Andreas Grincig. Perkutana koronarna intervencija značajno je smanjila hospitalnu smrtnost pacijenata sa STEMI-jem, međutim još uvijek se traga za specifičnim pokazateljima uspješnosti same reperfuzije. Mnoge studije su otkrile da BNP i neuregulin-1 imaju važnu ulogu u oporavku miokarda nakon ishemijske ozljede, a i da njihove vrijednosti u krvi mogu ukazivati na mogući ishod. Eksperimentalni dio ovog rada obuhvaćao je mjerenje NT-proBNP-a i NRG-a u serumu pacijenata oboljelih od akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom, i to neposredno prije perkutane koronarne intervencije te 6 sati i 12 sati nakon iste. Cilj ovog rada je ispitati dinamiku NT-proBNP-a i neuregulina-1 u krvi pacijenata prije i nakon perkutane koronarne intervencije.

Specifični ciljevi:

1) Ispitati zastupljenost pojedinih dobnih skupina u akutnom infarktu miokarda sa ST-elevacijom.
2) Ispitati zastupljenost spolova u akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom.
3) Usporediti koncentracije NT-proBNP-a u serumu prije i nakon perkutane koronarne intervencije.
4) Usporediti koncentracije NRG-a-1β u serumu prije i nakon perkutane koronarne intervencije.
5) Usporediti koncentracije NT-proBNP-a/NRG-a-1β u serumu muških i ženskih ispitanika.
6) Ispitati povezanost koncentracija NT-proBNP-a/NRG-a s dobi.
7) Ispitati povezanost koncentracija NT-proBNP-a i NRGa-1.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

U ovom istraživanju sudjelovali su pacijenti Klinike za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Sestre milosrdnice. Jedini osobni podaci uzeti od pacijenata bili su dob i spol. Svi pacijenti oboljeli su od akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom te su podvrgnuti pekutanoj koronarnoj intervenciji. Ukupan broj ispitanika bio je 104, od toga 71 muškarac i 33 žene, starosti 36 do 86 godina. Uzorci krvi prikupljeni su u tri navrata u periodu od 8 mjeseci tijekom 2016.-e godine. Prvo uzrokovanje provedeno je neposredno prije PCI-e, a uzrokovana je arterijska krv. Drugo uzrokovanje provedeno je 6 sati nakon PCI-e, a uzrokovana je venska krv iz kubitalne vene. Treće uzrokovanje provedeno je 12 sati nakon PCI-e te je također uzrokovana venska krv. Uzorci krvi prikupljeni su u standardizirane plastične serumske epruvete (Greiner Bio-one, Austrija) bez antikoagulansa. Nakon zgrušavanja, odvojen je serum centrifugiranjem pri centrifugalnoj sili od 2000×g, 10 minuta. Serum je potom alikvotiran u plastične mini epruvete (Eppendorf, Njemačka) volumena 1,5 mL te pohranjen na -20°C do početka analize.

3.1.1. Razlike između arterijske i venske krvi

Parametar koji se određuje kao i korištena metoda određivanja uvjetuju i vrstu potrebnog uzorka krvi koji može biti ovisno o sustavu iz kojeg potječe: venska krv, arterijska krv i kapilarna krv. Važno je znati da postoje razlike u sastavu venske, arterijske i kapilarne krvi (npr. glukoza, kalij, kalciji, ukupni proteini). Najčešći uzorak u medicinsko-biokemijskim laboratorijima je venska krv. Venska krv uzima se venepunkcijom iz kubitalne vene. Uzorak arterijske krvi može se uzimati iz postavljenog arterijskog katetera ili punkcijom arterije pomoću igle i heparinizirane šprice. Najčešće to čini liječnik anesteziolog ili tehničko zdravstveno osoblje u jedinicama intenzivnog liječenja pod nadzorom liječnika anesteziologa (Leniček Krleža, 2013). Razlika između venske i arterijske krvi prikazana je u tablici 1. Arterijska krv je vrsta uzoraka koja se koristi za točnu procjenu izmjene plinova, funkcije pluća (pO_2 i pCO_2), a posebice za procjenu oksigenacijskog statusa. Sastav arterijske krvi je jedinstven i ne ovisi o promjenama u sistemskoj i lokalnoj cirkualaciji. Arterijski uzorak je uzorak izbora za procjenu respiratornog statusa i metaboličkih acidobaznih poremećaja (Dukić i sur., 2016).

Tablica 1. Razlike između arterijske i venske krvi

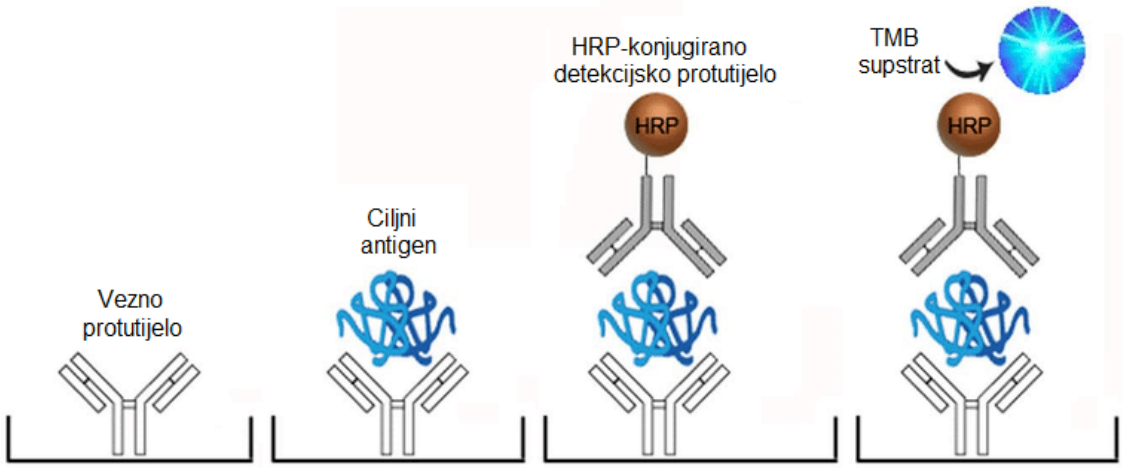
ARTERIJSKA KRV	VENSKA KRV
Oksigenirana krv	Deoksigenirana krv
Teče plućim, plućnom venom, lijevom srčanom klijetkom i pretklijetkom, arterijama	Teče kapilarama svih organa, osim pluća, venama, plućnom arterijom i desnom srčanom klijetkom i pretklijetkom
Teče od srca prema periferiji	Teče od periferije prema srcu
Srčane kontrakcije omogućuju protok	Mišićne kontrakcije omogućuju protok
Svjetlocrvene boje	Tamnocrvene boje
Bogata kisikom i nutrijentima poput glukoze, aminokiselina i vitamina	**Bogata hidrogenkarbonatom i otpadnim metaboličkim produktima poput ureje**
pH je 7,4	**pH niži nego u arterijskoj krvi**
Temperatura je 37°C	Temperatura niža nego u arterijskoj krvi
Uzorak za mjerenje plinova u krvi	**Uzorak za rutinske laboratorijske testove**

Pacijenti koji su sudjelovali u našem istraživanju bili su u kritičnom stanju te su zahtjevali hitnu koronarografiju i intervenciju. Zbog toga, da se ne gubi vrijeme na dodatnu venepunkciju, pacijentima je izvađena arterijska krv kod uvođenja katetera. Druga dva puta uzrokovana je venska krv iz kubitalne vene. S obzirom da nema nekog logičnog objašnjenja zašto bi postojale razlike koncentracija NT-proBNP-a i NRG-a-1β između venske i arterijske krvi, a ni literaturnih podataka, pretpostavili smo da navedeno nije moglo utjecati na konačne rezultate.

3.2. Metoda određivanja N-terminalnog prohormona B-tipa natrijuretskog peptida

Koncentracije NT-proBNP-a u serumu određivana je sendvič ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodom pomoću reagens kita tvrtke Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien.

Kod tipične sendvič-metode analit (antigen u pacijentovom uzorku) reagira s veznim (poliklonalnim) protutijelom vezanim na čvrstu fazu, pri čemu nastaje kompleks analit-protutijelo. Nakon ispiranja dodaje se obilježeno detekcijsko protutijelo (reagens enzimom obilježenog protutijela) u suvišku, koji reagira s prvim kompleksom. Tako nastaje sendvič (čvrsti nosač – vezno protutijelo – analit – detekcijsko protutijelo). Nakon ponovnog ispiranja i dodatka odgovarajućeg supstrata nastaje obojeni produkt koji se mjeri spektrofotometrijski (Slika 5.) (Dodig, 2015).



HRP - hren peroksidaza; TMB - tetrametilbenzidin

Slika 5. Načelo „sandwich“ ELISA-e

(preuzeto i prilagođeno s: https://www.lsbio.com/, pristupljeno: 1.3.2018.)

Postupak:

1. Svi reagensi i uzorci moraju biti termostatirani na sobnoj temperaturi (18-26°C) prije analize.
2. Na protokolnom obrascu zabilježiti pozicije standarada, kontrola i uzoraka.
3. Izvaditi mikrotitarsku pločicu.
4. Dodati 50 µL standarda/kontrole/uzorka u svaku jažicu mikotitarske pločice i nježno pomješati. Na svih 96 jažica mikrotitarske ploče prethodno su imobilizirana poliklonalna ovčja anti NT-proBNP protutijela koja vežu NT-proBNP iz uzorka.
5. Dodati 200 µL konjugata (ovčje anti-humano NT-proBNP protutijelo obilježeno enzimom – peroksidazom iz hrena (HRP)) i nježno pomješati.
6. Prekriti mikrotitarsku ploču i inkubirati 3 sata na sobnoj temperaturi.
7. Aspirirati i isprati višak detekcijskog protutijela 5x s 300µL puferom za ispiranje.
8. Dodati 200 µL TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) substrata u svaku jažicu. TMB stupa u reakciju s hren-peroksidazom čime nastaje produkt plave boje.
9. Inkubirati 30 minuta na sobnoj temperaturi (18-26°C) u mraku.
10. Dodati 50 µL stop otopine (sumporna kiselina) koja zaustavlja enzimsku reakciju, što je praćeno promjenom boje iz plave u žutu.
11. Mjeriti apsorbanciju na automatiziranom čitaču mikrotitarskih ploča, na 450 nm.

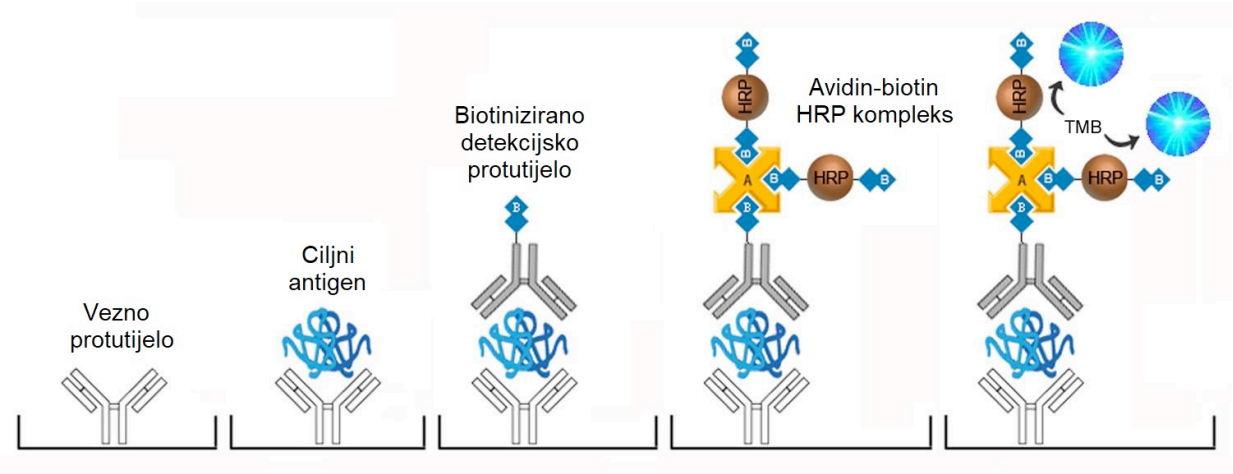
Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija standardnih otopina, pomoću softvera, izradi se standardna krivulja. Iz standardne krivulje možemo očitati koncentracije uzoraka. Mjerno područje metode je od 0 - 640 pmol/L. Medijan koncentracija NT-proBNP-a kod zdravih pojedinaca iznosi 3 pmol/L. Uzorci koji imaju vrijednosti NT-proBNP-a više od 640 pmol/L mogu se razrijediti sa standardnom otopinom 1 ili NT-proBNP negativnim humanim serumom nakon čega se ponovi mjeriti. Tako dobivena nova koncentracija pomnoži se s odgovarajućim faktorom razrijeđenja.

3.3. Metoda određivanja neuregulina-1β

Koncentracija NRG-1β u serumu određivana je sendvič ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodom pomoću reagens kita tvrtke RayBiotech, Inc., SAD.

The Ray BioHuman NRG1-beta 1 ELISA kit je in vitro enzim-imunokemijski test za kvantitativno određivanje humanog NRG-1β u serumu, plazmi (antikoagulansi EDTA i citrat; heparin nije prihvatljiv) i staničnim kulturama. Koncentracija humanog NRG-1β je vrlo niska u serumu/plazmi zdravih ispitanika pa može biti nedektabilna ovim testom.

Specifična anti-NRG-1β antitijela imobilizirana su na površini mikrotitarske pločice. Standardi i uzorci pipetiraju se u jažice pri čemu se NRG-1β prisutan u uzorku veže za imobilizirana protutijela. Jažice se isperu te se dodaju biotinilirana anti-humana detekcijska antitijela. Nakon specifične imunokemisjke reakcije i ispiranja nevezanih biotiniliranih antitijela, u jažice se pipetira streptavidin HRP konjugat (streptavidin obilježen enzimom). Jažice se ponovno isperu, doda se otopina supstrata, a intenzitet razvijene boje izravno je proporcionalan količini vezanog NRG-1β. Dodatkom stop otopine dolazi do promjene boje iz plave u žutu, a intenzitet obojenja mjeri se forometrijski na 450 nm (Slika 6.).



HRP - hren peroksidaza; TMB - tetrametilbenzidin

Slika 6. Princip sendvič ELISA metode sa sustavom avidin-biotin
(preuzeto i prilagođeno s: https://www.lsbio.com, pristupljeno: 25.2.2018)

Sustavom avidin-biotin povećavaju se brzina i osjetljivost imunokemijske reakcije. Analit ili detekcijsko protutijelo konjugiraju se s biotinom, a obilježivač (enzim) s streptavidinom. Četri istovjetne podjedinice streptavidina imaju velik afinitet vezanja s biotinom. Stoga se imunokemijske metode koje imaju sustav avidin-biotin odlikuju mnogo većim primarnim signalom intereakcije analita i specifičnog protutijela. Biotinizirana protutijela ne smanjuju afinitet protutijela prema analitu. Na svako protutijelo može se konjugirati više molekula biotina, što, nakon vezanja za konjugat streptavidina i obilježivača, ima za posljedicu povećanje konačnog signala imunokemijske reakcije. Time se povećava osjetljivost metode. Budući da avidin ima četiri vezna mjesta za biotin, može djelovati kao most između biotiniziranih molekula. Sustav avidin-biotin primjenjuje se u različitim

imunokemijskim metodama, kad god se zbog male koncentracije analita, signal mora povećati (Dodig, 2015).

Postupak:

1. Svi reagensi i uzorci moraju biti termostatirani na sobnoj temperaturi (18-25°C) prije analize.
2. Dodati 100 µL standarda i uzorka u odgovarajuću jažicu mikrotitarske pločice. Dobro pokriti i inkubirati 2 i pol sata na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4°C uz nježno mješanje.
3. Aspirirati otopinu i isprati jažice 4 puta puferom za ispiranje.
4. Dodati 100 µL biotiniliranih antitijela. Inkubirati 1 sat na sobnoj temperaturi uz nježno mješanje.
5. Aspirirat otopinu i isprati jažice 4 puta puferom za ispiranje.
6. Dodati 100 µL otopine streptavidina. Inkubirati 45 minuta na sobnoj temperaturi uz nježno mješanje.
7. Aspirirati otopinu i isprati jažice 4 puta puferom za ispirranje.
8. Dodati 100 µL TMB supstrata u svaku jažicu. Inkubirati 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku uz nježno mješanje.
9. Dodati sumpornu kiselinu (stop otopinu) za zaustavljanje reakcije. Odmah očitati apsorbanciju na 450 nm.

Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija standardnih otopina, pomoću softvera, izradi se standardna krivulja. Iz standardne krivulje mogu se očitati koncentracije NRG-1β u uzorcima pacijenata. Osjetljivost testa odnosno minimalna detektabilna vrijednost testa je 50 pg/mL. Minimalna detektabilna vrijednost je definirana kao koncentracija analita kojem je apsorbancija dvije standardne devijacije višlja od apsorbancije diluenta.

3.4. Statističke metode

Za statističku obradu podataka korišteni su statistički programi Microsoft Excel 2010 (2010 Microsoft Corporation, USA) i MedCalc v. 12.1.3.0 (1993-2011 MedCalc Software, Belgija). Prvi korak u statističkoj obradi podataka je svrstavanje podataka u odgovarajuće kategorije. Razlikujemo kvalitativne (kategoričke) i kvantitativne (numeričke ili brojčane) varijable. Kategorička varijabla u ovom eksperimentalnom radu je spol ispitanika, a prikazuje

se nominalnom mjernom ljestvicom. Dob ispitanika, koncentracije NT-proBNP-a i NRG-a-1β u serumu su brojčane varijable koje se prikazuju omjernom mjernom ljestvicom.

Kvantitativne podatke najčešće prikazujemo postotkom ili udjelom. Prvi korak prikaza numeričkih podataka je izrada histograma, odnosno grafičkog prikaza u kojem na os x nanosimo izmjerene vrijednosti grupirane u kategorije, a na os y učestalost pojavljivanja pojedinačne vrijednosti.

Kod velikog broja bioloških varijabli, raspodjela je takva da je prisutno najviše srednjih, a najmanje ekstremno visokih i ekstremno niskih vrijednosti. Takva se raspodjela naziva normalnom ili Gaussovom raspodjelom. Međutim, vrijednosti pojedinih laboratorijskih parametara često imaju rapodjelu u kojoj prevladavaju niže ili više vrijednosti, a ne srednja pokazuju centralnu tendenciju. U tom slučaju se radi o nenormalno raspodijeljenoj varijabli (Topić i sur., ured., 2018). Za utvrđivanje normalnosti raspodjele, u ovom radu, korišten je Kolmogorov-Smirnovljev test.

U sklopu analize deskriptivne statistike izračunata je aritmetička sredina, medijan, 95% interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu i medijan, minimalna vrijednost, maksimalna vrijednost, interkvartilni raspon i normanlnost raspodjele. Ovisno o broju skupina, broju ispitanika, vrsti podataka i normalnosti raspodjele, odabiru se odgovarajući testovi za daljnju statističku obradu. U slučajevima kada varijabla prati normalnu raspodjelu, u daljnjoj statističkoj obradi, kao mjera središnjice koristi se aritmetička sredina, a kao mjera rapršenja standardna devijacija. Kada nemamo normalno raspodijeljenu varijablu, kao mjera središnjice koristi se isključivo medijan, a kao mjera raspršenja interkvartilni raspon. Kod varijable koja je normalno raspodjeljena odabiremo parametrijski test, a kod nenormalno raspodjeljene varijable odabiremo neparametrijski test. Svi rezultati se interpretiraju u odnosu na razina značajnosti manjoj od 0,05 ($p<0,05$).

Za testiranje razlike između više skupina podataka koji su međusobno zavisni korištena je neparametrijska Friedmanova ANOVA. Za ispitivanje povezanosti između dviju varijebli sa nenormalnom raspodjelom računao se Spearmanov koeficijent korelacije. Vrijednosti koeficijenta korelacije kreću se od -1(savršena negativna povezanost) do 1 (savršena pozitivna povezanost). Varijeble između kojih je postojala značajna korelacija, podvrgnute su testu linearne regresije.

Za grafički prikaz rezultata koristili su se histogrami frekvencija te dijagrami rasprostiranja mjerenih podataka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

4.1.1. Deskriptivna statistika

U tablicama 2 i 3 prikazani su podaci deskriptivne statistike za koncentracije NT-proBNP-a i NRG-a-1β. Izračunate su mjere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijan, interkvartilni raspon), mjere raspršenja (standardna devijacija, interkvartilni raspon), 95% intervali pouzdanosti te maksimalna i minimalna vrijednost. Za ispitivanje normalnosti raspodjele korišten je Kolmogorov-Smirnovljev test. Dobivena p-vrijednost u svim slučajevima bila je <0,0001, što znači da varijable ne prate normalnu raspodjelu. Iz tog razloga, u daljnjoj statističkoj obradi, korišteni su neparametrijski testovi.

Tablica 2. Podaci deskriptivne statistike za koncentracije NT-proBNP-a (n=104)

	NT-proBNP [pmol/L] (0)	**NT-proBNP [pmol/L] (6)**	**NT-proBNP [pmol/L] (12)**
Aritmetička sredina (x̄)	32,6	47,0	58,6
95% interval pouzdanosti za x̄	20,0 - 44,2	27,6 - 66,5	41,8 - 75,3
Standardna devijacija (σ)	59,6	66,3	86,0
Medijan (M)	9,9	21,2	30,7
95% interval pouzdanosti za M	6,6 - 15,7	15,9 - 33,8	22,6 - 39,2
Minimum	0,0	1,9	1,7
Maksimum	429,7	385,2	640,0
Interkvartilni raspon	2,5 - 37,4	10,9 - 55,2	15,4 - 64,9
Normalnosti distribucije (p)	<0,0001	<0,0001	<0,0001

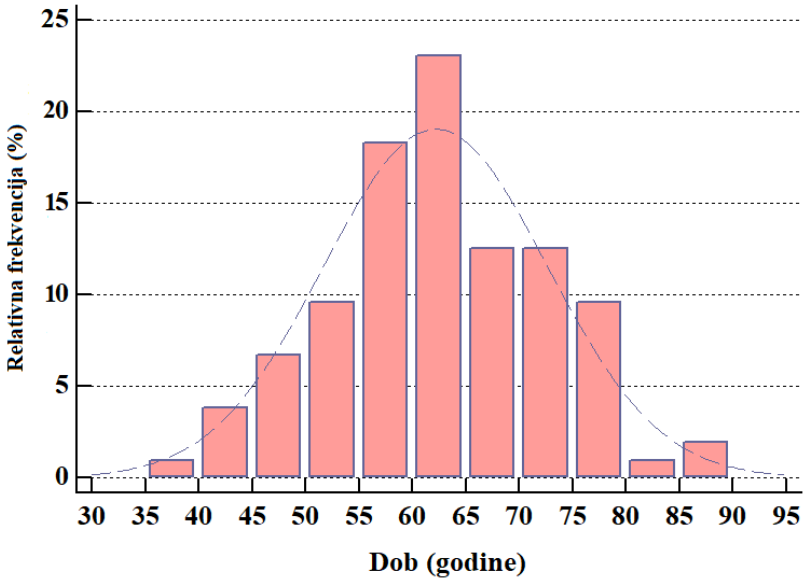
(0) – koncentracija prije PCI; (6) – koncentracija 6 sati nakon PCI; (12) – koncentracija 12 sati nakon PCI; PCI– perkutana koronarna intervencija; NT-proBNP – N-terminalni prohormon B-tipa natrijuretskog peptid

Tablica 3. Podaci deskriptivne statistike za koncentracije NRG-a-1 (n=104)

	NRG-1β [pg/mL] (0)	**NRG-1β [pg/mL] (6)**	**NRG-1β [pg/mL] (12)**
Aritmetička sredina (x̄)	143,1	152,6	159,5
95% interval pouzdanosti za x̄	117,0 - 169,2	129,8 - 175,3	136,5 - 182,6
Standardna devijacija (σ)	134,0	116,4	118,6
Medijan (M)	134,4	141,5	147,7
95% interval pouzdanosti za M	99,6 - 146,6	105,4 - 159,2	107,0 - 162,8
Minimum	0,0	0,0	0,0
Maksimum	1173,5	737,2	709,5
Interkvartilni raspon	76,7 - 167,4	77,7 - 189,3	81,6 - 195,5
Normalnosti distribucije (p)	<0,0001	<0,0001	<0,0001

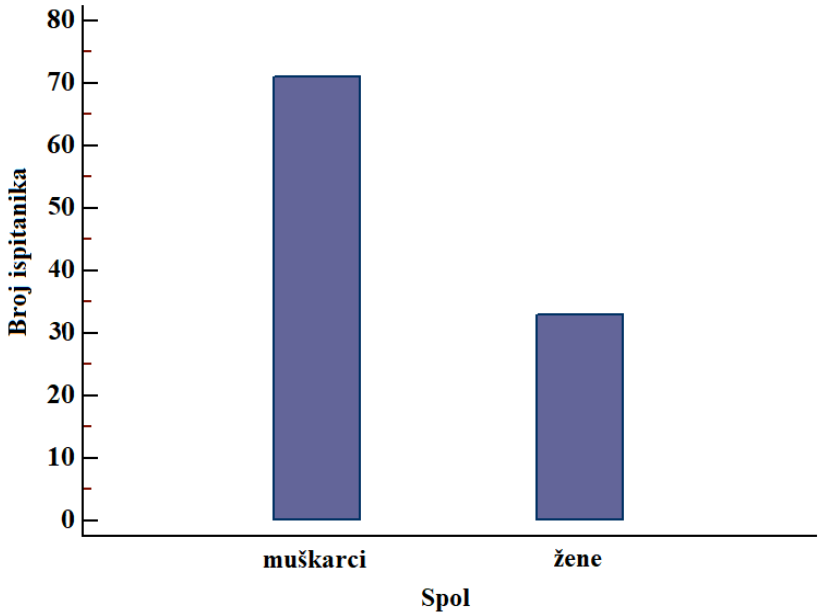
(0) – koncentracija prije PCI; (6) – koncentracija 6 sati nakon PCI; (12) – koncentracija 12 sati nakon PCI; PCI – perkutana koronarna intervencija; NRG-1 – neuregulin-1

Za dob ispitanika izračunati su isti statistički parametri kao i za prethodne dvije varijable (koncentracije NT-proBNP-a i NRG-a-1). Minimalna dob ispitanika bila je 36 godina, a maksimalna 86 godina. Srednja vrijednost i medijan iznosili su 62-ije godine. Kolmogorov-Smirnovljevim testom ispitivanja normalnosti raspodjele, dobivena je p-vrijednost od 0,6497. S obzirom da je p vrijednost veća od odabrane razine značajnosti 0,05 (p=0,6497), zaključujemo da varijabla (dob) prati normalnu (Gaussovu) raspodjelu. Normalnost raspodjele vidljiva je i iz grafičkog prikaza histograma frekvencija (Slika 7.), gdje je na osi x prikazana varijabla (dob) podijeljena u kategorije, a na osi y relativna frekvencija (%) ispitanika u pojedinim kategorijama.



Slika 7. Histogram raspodjele dobi ispitanika (p=0,6497)

Spol ispitanika je kategorička varijabla pa smo za statističku obradu primjenili hi-kvadrat test (χ^2). Broj muških ispitanika bio je 71 (68,3%), a ženskih 33 (31,7%). Hi-kvadrat testom dobivena je p-vrijednost od 0,0003, što znači da je razlika u prevalenciji spolova statistički značajna (Slika 8.).



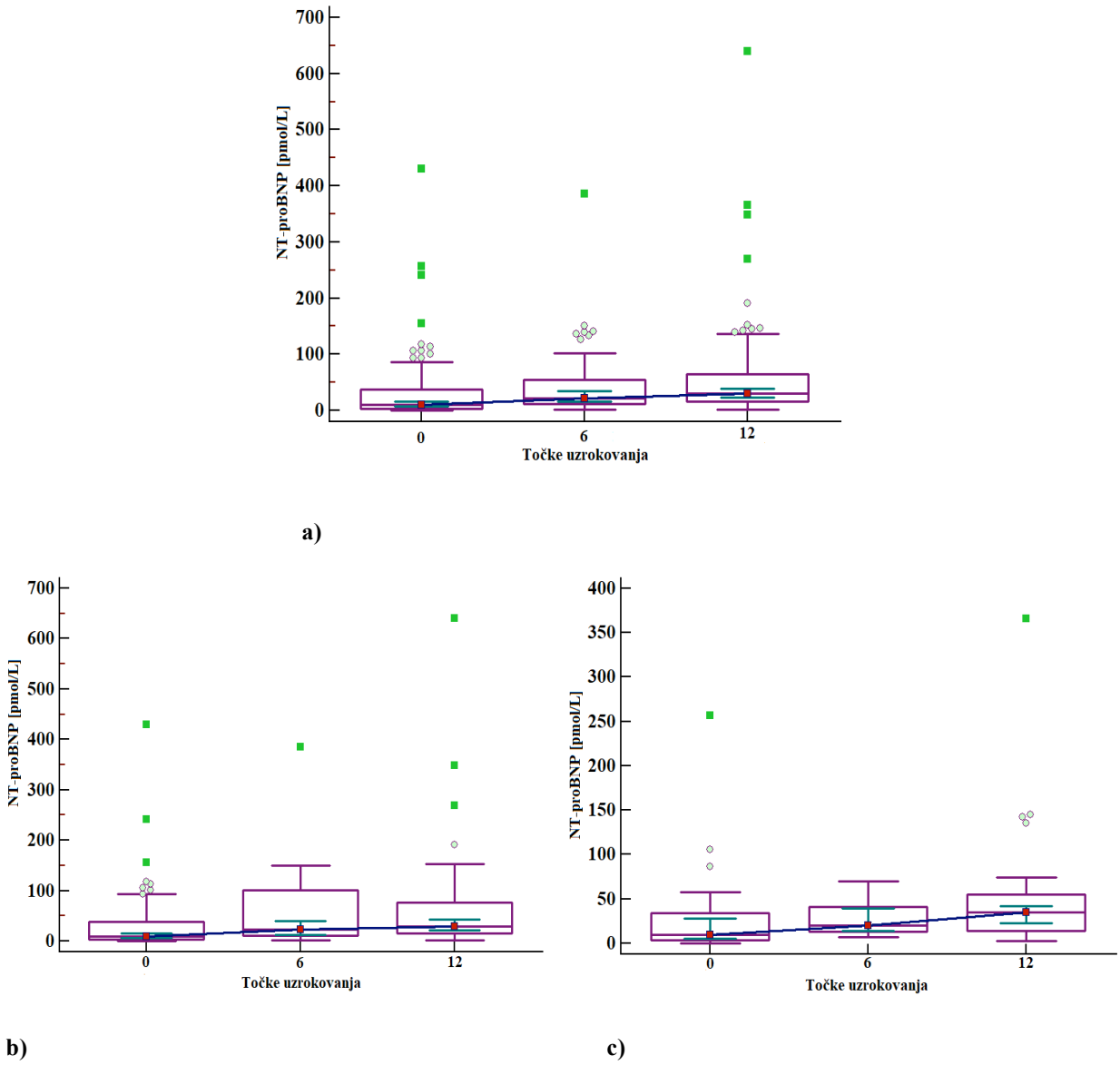
Slika 8. Podjela ispitanika prema spolu (p=0,0003)

4.1.2. Usporedba rezultata s obzirom na vrijeme uzrokovanja

Daljnja statistička obrada uključivala je usporedbu rezultata s obzirom na vrijeme uzrokovanja. Uspoređivane su koncentracije NT-proBNP-a/NRG-1 dobivene prije PCI, 6 sati nakon PCI i 12 sati nakon PCI. S obzirom da imamo 3 međusobno zavisne skupine podataka koje ne prate normalnu raspodjelu, za ispitivanje prisudstva statistički značajne razlike između skupina, korištena je Friedmanova ANOVA. Rezultati testa prikazani su dijagramom. P-vrijednost za koncentracije NT-proBNP-a bila je <0,001. To znači da se vrijednosti NT-proBNP-a u različitim vremenima uzrokovanja statistički značajno razlikuju, odnosno vrijednosti NT-proBNP-a s vremenom pravilno rastu što se vidi na samom dijagramu (Slika 9a.). P-vrijednost za koncentracije NRG-a iznosila je 0,021, što znači da se vrijednosti NRG-a-1 u različitim vremenima uzrokovanja također razlikuju, međutim ta razlika je posljedica razlike samo između prvog i trećeg vremena uzrokovanja (Slika 10a). Statistička značajnost te razlike ispitana je Wilcoxsonovim testom i iznosi p=0,0126. Razlika između prvog i drugog (p=0,1483) te drugog i trećeg (p = 0,3951) vremena uzrokovanja nije statistički značajna.

Uspoređivani su rezultati s obzirom na vrijeme uzrokovanja, posebeno za muškarce, posebno za žene. Porast vrijednosti NT-proBNP-a jače je izražen kod žena (Slika 9a i 9b). Kod muškaraca je dobivena statistički značajna razlika koncentracija NRG-a-1β između različitih vremena uzrokovanja sa p-vrijednosti od 0,007 (Slika 10b). Najveća razlika je između prvog i trećeg vremena uzrokovanja (p=0,0033), dok razlike između prvog i drugog

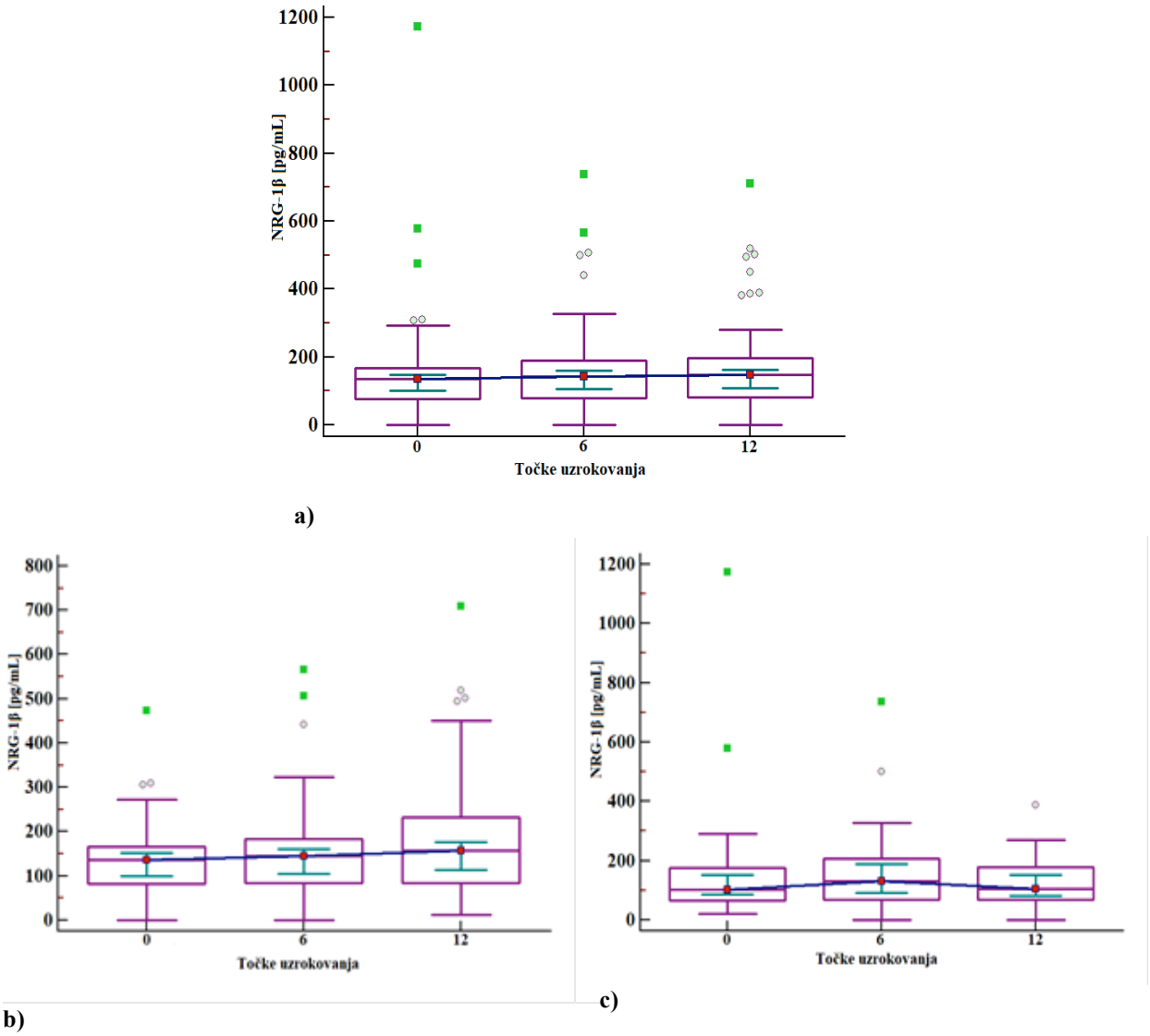
vremena uzrokovanja nema (p=0,3659). Razlika između drugog i trećeg vremena uzrokovanja nije toliko izražena kao između prvog i trećeg, ali je statistički značajna (p=0,0452). Kod žena, međutim, nema statistički značajne razlike niti između jednog vremena uzrokovanja (p=0,199) (Slika 10c). Za razliku od muškaraca kod kojih je najizraženija razlika između prvog i trećeg vremena uzrokovanja (p=0,0033), kod žena je ona najmanja (p=0,9644).



Točke uzrokovanja: 0- neposredno prije PCI, 6- 6 sati nakon PCI i 12- 12 sati nakon PCI
PCI – perkutana koronarna intervencija; NT-proBNP – N-terminalni prohormon B-tipa natrijuretskog peptida;

Slika 9. Usporedba koncentracija NT-proBNP prije i nakon PCI:

a) Usporedba koncentracija NT-proBNP-a s obzirom na vrijeme uzrokovanja kod svih ispitanika ($p<0,001$); b) kod muškaraca ($p<0,001$); c) kod žena ($p<0,001$). U dijagramu centralni ljubičasti kvadrat predstavlja vrijednosti između 1. i 3. kvartila, središnja ljubičasta linija u kvadratu i crveni kvadratić predstavljaju medijan, a plava linija povezuje medijane različitih skupina podataka. Vertikalna ljubičasta linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti s time da su isključene outside vrijednosti, koje su 1,5 puta veće od interkvartilnog raspona, te far out vrijednosti koje su 3 puta veće od interkvartilnog raspona - zeleni kvadratići.



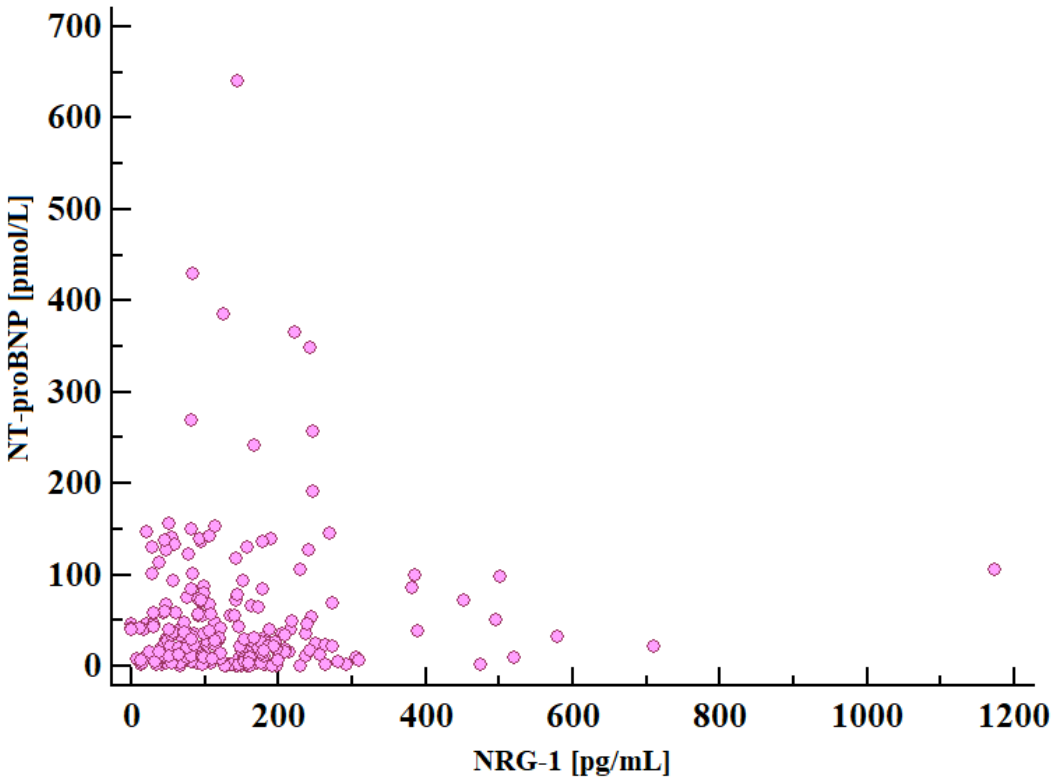
Točke uzrokovanja: 0- neposredno prije PCI; 6- 6 sati nakon PCI; 12- 12 sati nakon PCI
PCI – perkutana koronarna intervencija; NRG-1β – neuregulin-1β

Slika 10. Usporedba koncentracija NRG-a-1β prije i nakon PCI:

Usporedba koncentracija NRG-a-1β s obzirom na vrijeme uzrokovanja kod svih ispitanika (p=0,021) b) kod muškaraca (p=0,007) c) kod žena (p=0,199). U dijagramu centralni ljubičasti kvadrat predstavlja vrijednosti između 1. i 3. kvartila, središnja ljubičasta linija u kvadratu i crveni kvadratić predstavljaju medijan, a plava linija povezuje medijane različitih skupina podataka. Vertikalna ljubičasta linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti s time da su isključene outside vrijednosti, koje su 1,5 puta veće od interkvartilnog raspona, te far out vrijednosti koje su 3 puta veće od interkvartilnog raspona - zeleni kvadratići.

4.1.3. Ispitivanje povezanosti

Ispitivana je povezanost između vrijednosti NT-proBNP-a i NRG-a-1β. Korelacije nema niti u jednom vremenu uzrokovanja (r=-0,0382; p=0,5449) (Slika 11). Koeficijent korelacije ocijenjen na sljedeći način: 0 do ±0,25 – nema povezanosti; ± 0,26 do ±0,50 – slaba povezanost; ±0,51 do ± 0,75 – umjerena do dobra povezanost; ±0,76 do ±1 – dobra do izvrsna povezanost (Colton, 1974).



NT-proBNP – N-terminalni prohormon B-tipa natrijuretskog peptida; NRG-1β – neuregulin-1β

Slika 11. Korelacija između vrijednosti NT-proBNP i NRG-1 (r=-0,0382; p=0,5449)

Ispitivana je i povezanost dobi s vrijednostima NT-proBNP-a/NRG-a-1. Iz koeficijenta korelacije i p-vrijednosti (Tablica 4) zaključujemo da korelacije uglavnom nema. Slaba korelacija (r=0,310) i statistički značajna (p=0,0013) nađena je za NT-proBNP prije PCI-e.

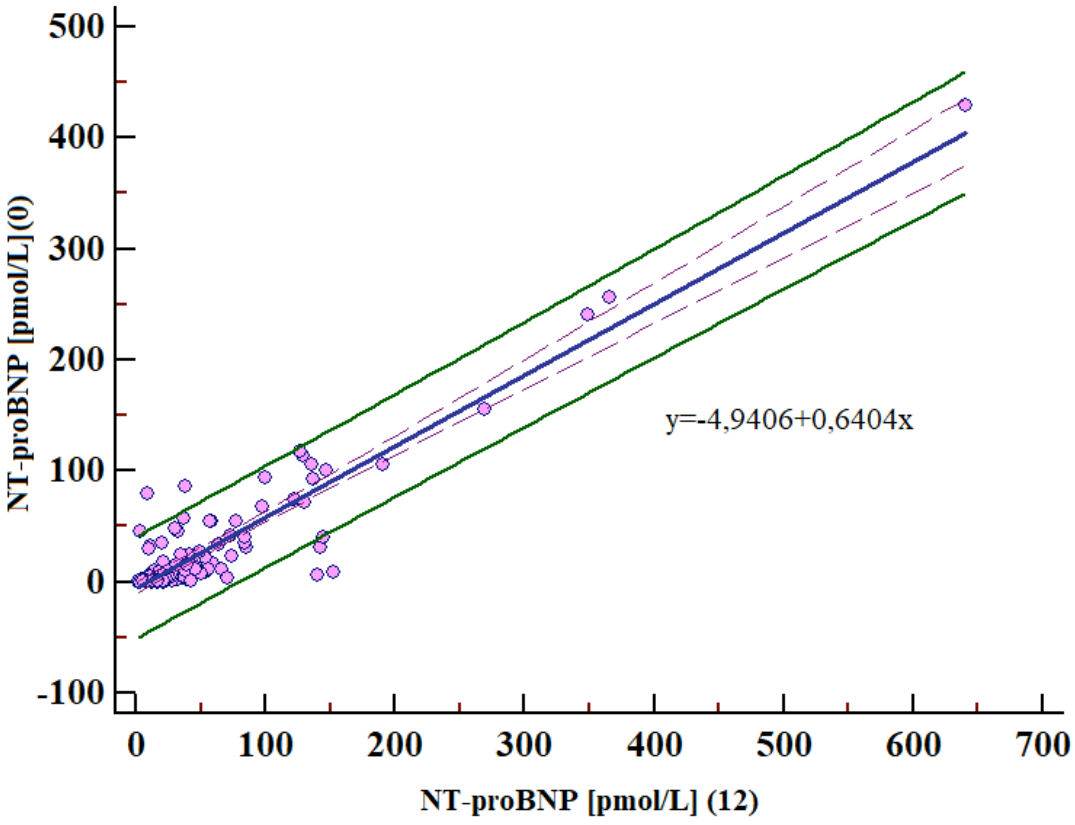
Tablica 4. Korelacija između koncentracija NT-proBNP-a/NRG-a-1 i dobi ispitanika (n=104)

		Dob [godine]
NRG-1 [pg/mL] (O)	Koeficijent korelacije	0,017
	p-vrijednost	0,8658
NRG-1 [pg/mL] (6)	Koeficijent korelacije	0,174
	p-vrijednost	0,0766
NRG-1 [pg/mL] (12)	Koeficijent korelacije	-0,049
	p-vrijednost	0,6201
NT-proBNP [pmol/L] (0)	Koeficijent korelacije	0,310
	p-vrijednost	0,0013
NT-proBNP [pmol/L] (6)	Koeficijent korelacije	-0,099
	p-vrijednost	0,5077
NT-proBNP [pmol/L] (12)	Koeficijent korelacije	0,236
	p-vrijednost	0,0157

(0) – koncentracija prije PCI; (6) – koncentracija 6 sati nakon PCI; (12) – koncentracija 12 sati nakon PCI; NT-proBNP – N-terminalni prohormon B-tipa natrijuretskog peptida; NRG-1β – neuregulin-1β

4.1.4. Regresijska analiza

Ispitivanjem povezanosti između varijabli nađena je dobra korelacija vrijednosti NT-proBNP-a prije PCI i 12 sati nakon PCI. Spearmanovim koeficijentom korelacije iznosio je 0,718 sa p-vrijednosti <0,0001. Iz tog razloga izračunata je jednadžba regresije koja nam omogućuje da poznavenjem jedne varijable predvidimo iznos druge. Jednadžba regresije iznosi y=-4,9406+0,6404x. Vrijednost koeficijenta determinacije je 0,8538, što znači da 85,38% podataka možemo opisati ovom jednadžbom (Slika 12).



NT-proBNP – N-terminalni prohormon B-tipa natrijuretskog peptida

Slika 12. Pravac regresije (R=0,8538). Pravac regresije označen je plavom linijom. Ljubičaste iscrtkane linije predstavljaju granice 95% intervala pouzdanosti, a zelene linije granice 95% intervala predviđanja

4.2. Rasprava

Ovo istraživanje je pokazalo da je najveća učestalost akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom u dobi između 60 i 64 godine. Također, istraživanje je pokazalo veću učestalost AIM sa ST-elevacijom kod muškaraca (68,3%), u odnosu na žene (31,7%). S obzirom da je istraživanje uključivalo mali broj isptanika (n=104) ne možemo donjeti generalni zaključak o učestalosti AIM sa ST-elevacijom u pojedinim dobnim skupinama i kod pojedinog spola. Prema *Nacionalnoj strategiji razvoja zdravstva 2012.-2020.* analiza bolničkog pobola prema dobi pokazuje da se i u muškaraca i u žena stope hospitalizacija za kardiovaskularne bolesti povećavaju s dobi te su veće u muškaraca nego u žena u svim dobnim skupinama. Intenzivnije povećanje bolničkog pobola počinje u dobi iznad 40 godina (Ostojić, ured., 2012). Kod žena je učestalost opstruktivnih koronarnih bolesti manja nego u muškaraca. Razlika među spolovima očitava se u različitom kardiovaskularnom profilu, vaskularnoj funkciji i debljini karotidne medije i intime. Studija koja je ispitivala razlike u koronarnim arterijama između spolova pokazala je veću učestalost razvoja kalcifikacija kod muškaraca, u odnosu na žene u svim dobnim skupinama. Nicholls i sur. otkrili su da žene s bolestima koronarnih arterija imaju manji volumen ateroma nego muškaraci, uključujući i intraluminalni plak i aterom unutar medije, unatoč prisutnosti više kardiovaskularnih faktora rizika.

Endotelne progenitorske stanice (EPS) igraju važnu ulogu u popravku endotela krvnih žila nakon ozljede. Endovaskularna mobilizacija EPS-a je povezana s re-endotelizacijom, poboljšanjem funkcije endotela i smanjenjem aterosklerotskog opterećenja. Nedavna studija pokazala je da fertilne žene imaju višu razinu stabilnih EPS-a (CD34 + KDR +) nego muškaraci, dok razlike između žena u postmenopauzi i muškaraca iste dobi nije bilo. EPS-e se ciklički mobiliziraju ovisno o menstrualnom ciklusu u sinkroniji sa razinama cirkulirajućeg 17β-estradiola. Estrogeni inhibiraju razvoj ateroskleroze promičući re-endotelializaciju, inhibirajući proliferaciju glatkih mišićnih stanica i nakupljanje izvanstaničnog matriksa nakon vaskularne ozljede. Također smanjuju sistemski vaskularni otpor, poboljšavaju koronarnu i perifernu funkciju endotela i sprječavaju koronarni arterijski spazam kod žena s i bez koronarne ateroskleroze. Estrogeni uzrokuju vazodilataciju brzim povećanjem produkcije NO te moduliraju relaksaciju putem endotelnog hiperpolarizacijskog faktora inducirajući vazodilatatorne prostaglandine (PGE2 i PGI2) i inhibirajući proizvodnju endotelina-1. Zanimljivo je da intrakoronarna infuzija estradiola poboljšava endotelnu funkciju i prokrvljenost koronarnih krvnih žila kod žena, ali ne i kod muškaraca s bolestima koronarnih arterija. To možemo objasniti manjim udjelom estregenskih receptora kod muškaraca, u

odnosu na žene. Estrogen stoga predstavlja važan zaštitni mehanizam žena od kardiovaskularnih bolesti u predmenopauzi. S druge strane, testosteron pokazuje suprotne učinke na krvni tlak i kardiovaskularni morbiditet i mortalitet (Vaccarino i sur. , 2011).

Odkako je perkutana koronarna intervencija uvedena kao terapijska metoda znatno se poboljšao ishod bolesnika sa STEMI-ijem. Rano obnavljanje arterijskog koronarnog protoka spriječava širenje infarkta i disfunkciju lijevog ventrikula poboljšavajući kratkoročni i dugoročni ishod (Blom i sur., 2004). Problem nastaje kada trebamo procijeniti dali je reperfuzija bila uspiješna ili ne. Mjerenje NT-proBNP-a nakon PCI može imati značajnu prognostičku vrijednost te biti dobar pokazatelj uspješnosti reperfuzije. Ovim eksperimentalnim radom uočena je pravilna dinamika porasta koncentracija NT-proBNP u serumu nakon perkutane koronarne intervencije. Koncentracije su bile najniže neposredno prije PCI-e sa medijanom od 9,9 pmol/L. Medijan koncentracija NT-proBNP-a 6 sati nakon PCI iznosio je 21,2 pmol/L,a najviše koncentracije bile su 12 sati nakon PCI-e s medijanom od 30,7 pmol/L. Kod žena porast koncentracija bio je izraženiji. Slični rezultati dobiveni su i drugim istraživanjima. Tako je više studija ispitivalo promjene koncentracija NT-proBNP-a kod pacijenata sa STEMI-jem. Studije su pokazale da koncentracije NT-proBNP-a značajno rastu unutar 24 sata nakon PCI-e, a ako je reperfuzija bila uspješna, u tom periodu postiže se maksimalna vrijednost, nakon čega vrijednosti padaju. U slučaju neuspješne reperfuzije vrijednosti nastavljaju rasti 48-96 sati nakon PCI-e (Schellings i sur., 2016). Stoga bi mjerenje koncentracija NT-proBNP-a 24 i 48 sati nakon PCI moglo biti klinički korisno u procjeni uspješnosti reperfuzije. Posebno je važno otkriti pacijenate s vizokim rizikom kod koji je reperfuzijska terapija bila neuspješna. U tom slučaju, pacijenti s povišenim NT-proBNP mogu biti prikladani kandidati za nove terapijske metode koje bi poboljšale reperfuzijsku učinkovitost.U nekim studijama je zapaženo da vrlo rana reperfuzija može čak spriječiti porast serumskih koncentracija NT-proBNP-a (Klinieken i sur., 2004). Valente i sur. svojim istraživanjem pokazali su da koncentracije NT-proBNP-a značajno koreliraju s biomarkerima miokardijalne nekroze (npr. TnI) i obrnuto koreliraju sa frakcijom izbacivanja. Također uočena je dobra korelacija NT-proBNP-a s upalnim biomarkerima poput C-reaktivnog proteina (CRP-a), sedimentacije i firbrinogena. NT-proBNP ima i prognostičku ulogu u predviđanju mogućeg smrtnog ishoda tijekom boravka u intenzivnim koronarnim jedinicama. Naime, svi pacijenti koji su preminuli tijekom boravka u intenzivnim koronarnim jedinicama imali su vrijednosti NT-proBNP-a unutar četvrtog kvartila (Valente i sur., 2009).

Iako je ishemija pokretač za otpuštanje BNP-a i NT-proBNP-a, postoje neki kontroverzni podaci o povezanosti tih peptida i opsega infarkta. Neke studije nisu pronašle poveznicu između koncentracija NT-proBNP-a i opsega infarkta, međutim većina ipak je. Sama koralacija ovisi i o tome koje područje srca je zahvaćeno STEMI-jem. Što se tiče uporabe TnI u procjeni opsega infarkta, TnI se ne smije uzeti kao jedini pouzdani pokazatelj opsega infarkta od kad se zna da reperfuzija uzrokuje visoko varijabilno oslobađanje enzima. NT-proBNP se pokazao kao osjetljiviji prediktor ishoda nego frakcija izbacivanja lijeve klijetke (Lorgis i sur., 2007). Neki istraživači su zaključili da i drugi patofiziološki mehanizmi osim difunkcije miokarda mogu pridonjeti porastu BNP-a i NT-proBNP-a. Povišene vrijednosti zabilježene su i kod bolesnika sa teškom sepsom i septičkim šokom. Rezultati istraživanja na životinjama i kulturama tkiva pokazali su da je proizvodnja i sekrecija natrijuretskih peptida aktivirana endotoksinima i upalnim medijatorima. Kliničke studije sugeriraju da su razine natrijuretskih peptida, barem djelomično povišene zbog povećane sekrecije ili smanjenje degradacije uzrokovane upalom (Valente i sur., 2009).

Dinamika neuregulina-1 u krvi nakon akutnog inafrkta miokarda i reperfuzije puno je manje istražena. Ni o samoj funkciji neuregulina-1 u miokardu ne zna se puno. Ono što se predpostavlja je da neuregulin ima kardioprotektivnu funkciju i da je ključan u razvoju srca. Većina istraživanja provedeno je na laboratorijskim životinjama, a tek nekoliko na ljudskoj populaciji.

Ovim istraživanjem je utvrđeno da su koncentracije NRG-a-1β statistički značajno više 12 sati nakon PCI-e, u odnosu na koncentracije prije PCI-e. Navedenom zaključku najviše pridonose koncentracije muškaraca kod kojih koncentracije NRG-a-β rastu nakon PCI-e. Kod žena, naime, koncentracije rastu unutar 6 sati nakon PCI te se u idućih 6 sati (12 sati nakon PCI-e) vraćaju na početne vrijednosti.

Predkliničke studije su pokazale da ishemijska ozljeda miokarda aktivira NRG-1β. Ranije kliničke studije govore o povezanost između razina NRG-1β i ozbiljnosti zatajenja srca i koronarnih bolesti. U studiji koja je obuhvaćala gotovo 900 pacijenata utrđeno je da pacijenti sa ishemičnom kardiomiopatijom imaju više razine cirkulirajućeg NRG-1β, od pacijenata sa neishemičnom kardiomiopatijom. Dodatna studija od 60 pacijenata koji su bili podvrgnuti kardijalnoj kateterizaciji pokazala je višu plazmatsku razinu NRG-1β kod pacijenata sa stres induciranom kardijalnom ishemijom. Ove studije upućuju na to da bi NRG-1β mogao biti koristan biomarker, ne samo u dijagnostici infarkta miokarda, nego i svih oblika akutnog koronarnog sindroma. Druge studije, pak nisu uspjele naći poveznicu između razina NRG-1β

i akutnog koronarnog sindroma (MaameYaa i sur., 2016). Potrebno je provesti još velik broj istraživanja kako bi se razjasnila uloga NRG-1 u akutnom infarktu miokarda i njegova potencijalna primjena kao biomarkera.

Ovo istraživanje uglavnom nije našlo povezanost između koncentracija NT-proBNP-a i dobi ispitanika. Slaba povezanost, ali statistički značajna nađena je samo za NT-proBNP prije PCI-e. Literaturni navodi govore da koncentracije NT-proBNP-a i BNP-a normalno rastu s dobi, zbog čega neke studije preporučaju korištenje dobnih graničnih vrijednosti. Međutim, iako se razine natriuretskih peptida povećavaju s godinama, to može imati posljedice na specifičnost testa, ali ne i na njegovu osjetljivost, tj. njegovu sposobnost isključenja srčanog zatajenja (Rogić, 2015). Fazlinezhad i sur. u svom istraživanju dobili su pozitivnu korelaciju vrijednosti BNP-a i dobi ispitanika s akutnim infarktom miokarda. Valente i sur. u svom istrživanju dobili su pozitivnu korelaciju vrijednosti NT-proBNP-a i dobi ispitaniak sa STEMI-jem. Također, u ovom istraživanju nije nađena povezanosti između koncentracija NRG-a-1β i dobi.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da nema nikakve povezanost između koncentracija NT-proBNP-a i NRG-a-1β ni u jednom vremenu uzrokovanja (r=-0,0382; P=0,5449). Radova na tu temu vrlo je malo. Ky i sur. ispitivali su povezanost NRG-a-1β i BNP sa rizikom od smrti kod kroničnog zatajenja srca. U svom istraživanju nisu našli povezanost između NRG-a-1β i BNP. Spearmanovim koeficijentom korelacije bio je 0,09 (P=0,02). Međutim, pronašli su snažnu poveznicu između visokih vrijednosti NRG-a-1β i rizika od smrti kod pacijenata sa ishemičnim srčanim zatajenjem. Povezanost se može objasniti na različite načine. Jedan od njih je da NRG-1β ima negativan učinak na srce, slično kao kateholamini koji pogoršavaju funkciju srca. Drugo moguće objašnjenje je da oštećeno srce kao pozitivan kompenzatorni mehanizam povećano stvara NRG-1β, kao i BNP, koji onda ima kardioprotektivnu funkciju. Mnoga istraživanja na laboratorijskim životinjama dokazala su kardioprotektivnu ulogu NRG-a-1β pa je većina istraživača ipak priklonjenija teoriji o kardioprotektivnosti. Visoke razine BNP-a povezana su sa značajnim rizikom od smrti, međutim povezanost NRG-a-1β i rizika od smrti neovisna je o BNP-u. Isto istraživanje je zaključilo da su BNP i NRG-1β u kombinaciji superiorniji u procjeni rizika od smrti kod zatajenja srca u odnosu na samostalno promatranje biomarkera. Promatranje više biomarkera istovremeno moglo bi biti korisnije u postavljanju dijagnoze, prognozi i praćenja odgovora na terapiju (Ky i sur., 2010).

Ograničenja ovog istraživanja uključuju mali broj ispitanika (n=104), korištenje nedovoljno precizne metode određivanja, mjerenje samo β izoforme NRG-a-1 (moguće je da druge izoforme imaju ulogu u AIM) i nespecifičnost NRG-1β za srce (može poticati i iz drugih tkiva). ELISA metoda je ručna metoda koja zahtjeva veliku koncentraciju pri izvođenju. Unatoč velikom trudu koji je uložen u izvođenje eksperimentalnog dijela rada, pogreške su uvijek moguće. Uzroci nepouzdanih rezultata mogu biti nedovoljno ispiranje, pogreška pipetiranja, nejednako miješanje reagensa, pogreška prijenosa uzorka (engl. *caryover*) , upitna kvaliteta mikrotitarskih pločica (zbog koje dolazi do različite adsorpcije reagensa na pločicu), rubni učinak (učinak svjetla na reakciju u rubnim jažicama). Najčešće slučajne pogreške nastaju zbog utjecaja tehnike rada, utjecaja temperature odigravanja reakcija, utjecaja temperature čuvanja na stabilnosti reagensa te utjecaja svjetla. Temepreatura provedbe enzimoimunokemijskih metoda važna je i zbog odigravanja specifične imunokemijske reakcije i zbog enzimske reakcije. Promjena temperature za 1°C znatno mijenja optičku gustoću, što utječe na konačan rezultat određivanja. Enzimoimunokemijske metode izvode se ili na sobnoj temperaturi (23-25°C) ili pod kontroliranim uvjetima na 37°C. Povećana sobna temperatura smanjuje osjetljivost testa. Reagens se do uporabe čuva na 4-8°C. Prije izvođenja metoda potrebno je da reagens postigne sobnu temperaturu. Problem nastaje ako se ne potroši sav reagens isti dan pa se nepotrošeni reagens višekratno pohranjuje u hladnjak do ponovne uporabe (učinjeno i u ovom eksperimentalnom radu). U takvim prilikama dolazi do temperaturnog šoka reagensa, što znatno može utjecati na konačan rezultat (Dodig, 2015). Što se tiče križne reaktivnosti, proizvođač navodi da ELISA kit ne pokazuje križnu reaktivnost sa velikim brojem strukturno sličnih molekula. Međutim zbog mogućnosti uzimanja monoklonalnih antitijela u dijagnostičke i terapijske svrhe te kod osoba koje su u kontaktu sa životinjskim antigenima ne može se isključiti križna reaktivnost, interferencija heterofilnih antitijela (humana anti-ovčja antitijela) (Flegar Meštrić i sur., 2017). Također, ono što je moglo utjecati na rezultate mjerenja NRG-a-1β je interferencija heparina koji je apliciran pacijentima. Prvu dozu nefrakcioniranog heparina pacijenti su dobili nakon vađenja arterijske krvi za analizu, a drugu dozu neposredno po intervenciji ovisno o kilaži. Kompresija mjesta punkcije je trajala 3 sata,a 6 i 18 sati nakon kompresije pacijenti su dobili dozu niskomolekularnog heparina. S obzirom da je arterijska krv vađena prije aplikacije heparina, heparin nije mogao utjecati na mjerenje NRG-a-1β u uzorcima krvi uzrokovanih neposredno prije PCI. Drugi uzorak krvi je uzrokovan 6 sati nakon PCI, a s obzirom da nefrakcionirani heparin ima poluvrijeme života samo 1,5 sata, vjerojatno niti u ovom slučaju nije došlo do interferencije. Tek u trećem uzorku krvi uzrokovanom 12 sati

nakon PCI je bila moguća interferencija heparina, jer niskomolekularni heparin kojeg su pacijenti primili 6 sati nakon kompresije ima poluvrijeme života 3-7 sati. Proizvođač ne spominje utjecaj heparina na mjerenje NT-proBNP-a, ali je nekoliko istraživanja provedeno na tu temu. Jedno istraživanje je pokazalo kak nema statistički značajne razlike u koncentraciji NT-proBNP-a između seruma i heparinizirane plazme, dok je više istraživanja uočilo razliku u koncentraciji NT-proBNP-a između EDTA-plazme i heparinizirane plazme (koncentracija je bila značajno niža u EDTA-plazmi). (Lippi i sur., 2007; Santos i sur., 2010).

5. ZAKLJUČCI

1. Najveća učestalost akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom je u dobi između 60-e i 64-e godine života, što je u skladu sa epidemiološkim podacima.
2. Muškarci češće oboljevaju od akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom u odnosu na žene, što je također u skladu sa epidemiološkim podacima.
3. Dobivena je statistički značajna razlika u koncentracijama NT-proBNP-a prije i nakon perkutane koronarne intervencije. Koncentracije NT-proBNP-a u serumu rastu nakon perkutane koronarne intervencije. Također, uočena je pravilna dinamika rasta vrijednosti NT-proBNP-a kroz 12 sati nakon intervencije. Kod žena je zapažen jači porast.
4. Utvrđeno je da su koncentracije NRG-a-1β statistički značajno više 12 sati nakon PCI-e, u odnosu na koncentracije prije PCI-e. Navedenom zaključku najviše pridonose koncentracije muškaraca kod kojih koncentracije NRG-a-β rastu kroz 12 sati nakon intervencije. Kod žena, naime, koncentracije rastu unutar 6 sati nakon PCI-e te se u idućih 6 sati (12 sati nakon PCI-e) vraćaju na početne vrijednosti.
5. Vrijednosti NT-proBNP-a i vrijednosti NRG-a-1β uglavnom ne koreliraju sa dobi. Slaba povezanost, ali statistički značajna nađena je samo za NT-proBNP prije PCI-e.
6. Nije nađena povezanosti između koncentracija NT-proBNP-a i NRG-a-1β.

6. LITERATURA

Angioplasty and stents: Is it worth undergoing for?, 2015., https://anushrava.wordpress.com, pristupljeno 16.3.2018.

Atrial and Brain Natriuretic Peptides, 2016., http://www.cvphysiology.com, pristupljeno 16.3.2018.

Babić Z, Pavlov M. Akutni koronarni sindrom u Republici Hrvatskoj. *Cardiol Croat*, 2016, 11, 309.

Bloma JR, van 't Hofa AWJ, Henriquesa JPS, Geertmana JH. Slingerlandb R, Hoorntjea JCA. NT-proBNP: a marker for successful myocardial reperfusion in AMI patients treated with primary percutaneous coronary intervention. *Eur J Heart Fail*, 2004, 6, 749-752.

Colton T. Statistics in Medicine. Boston, Little, Brown and Company, 1974, str. 211.

Čeplak I. Funkcija srca U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čeplak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 411-424.

Dajak M, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Značaj određivanja srčanih natriuretičkih peptida u srčanoj insuficijenciji. *Jugoslov Med Biohem*, 2003, 22, 311-313.

Dodig S. Imunokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 151-152, 154.

Dukić L, Kopčinović LM, Dorotić A, Baršić I. Nacionalne preporuke za analizu acidobazične ravnoteže. Zagreb, Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM), 2016, str. 10.

Eroglu S, Bozbas H, Muderrisoglu H. Dijagnostička vrijednost BNP-a kod dijastoličkog zatajivanja srca. *Biochem Med*, 2008, 18, 183-185.

Fazlinezhad A, Khadem Rezaeian M, Yousefzadeh H, Ghaffarzadegan K, Khajedaluee M. plasma Brain natriuretic peptide (Bnp) as an Indicator of Left Ventricular Function, early Outcome and Mechanical complications after Acute Myocardial Infarction. *Clin Med Insights*, 2011, 5, 78.

Fedele C, Riccio G, Malara AE, D'Alessio G, De Lorenzo C. Mechanisms of cardiotoxicity associated with ErbB2 inhibitors. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134, 595.

Flegar Meštrić Z, Vučić Lovrenčić M i sur. Preglednik medicinsko-biokemijskih pretraga. Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 151.

Ghashghaei R, Arbit B, Maisel AS. Current and novel biomarkers in heart failure. *Curr Opin Cardiol*, 2016, 31, 191-193.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 252-256.

Günefl Y, Ökçün B, Kavlak E, Erbafl C, Karc›er S. Value of brain natriuretic peptide after acute myocardial infarction. *Anatol J Cardiol*, 2008, 8, 183-187.

Harrison PJ, Law AJ. Neuregulin 1 and Schizophrenia: Genetics, Gene Expression, and Neurobiology. *Biol psychiatry*, 2006, 60, 132.

Kristin Newby L. Reconciling Systems for Acute Myocardial Infarction Definition and Coding Classification. *Clin Chem*, 2017, 63, 24.

Ky B, Kimmel SE, Radwan, Safa RN, Putt ME, Sweitzer NK, Fang JC. Neuregulin-1β is Associated with Disease Severity and Adverse Outcomes in Chronic Heart Failure. *Circulation*, 2009, 120, 314-317.

Lai X, Zhong L, Fu H, Dang S, Wang X, Zhang N i sur. Effects of neuregulin-1 on autonomic nervous system remodeling postmyocardial infarction in a rat model. *Neural Regen Res*, 2017, 12, 1906.

Leniček Krleža J. Potencijalni izvori pogrešaka prilikom vađenja krvi. U: Predanalitička faza laboratorijskog rada, Šimundić AM, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, str. 7-20.

Lippi L, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Measurement of Elecsys NT-proBNP in serum, K2 EDTA and heparin plasma. *Clin Biochem*, 2007, 40, 247-248.

Lorgis L, Zeller M, Dentan G, Sicard P, Jolek M, L'Huillier I. High levels of N-terminal pro B-type natriuretic peptide are associated with ST resolution failure after reperfusion for acute myocardial infarction, *Q J Med*, 2007, 100, 211-213.

Mei L, Nave KA. Neuregulin-ERBB signaling in nervous system development and neuropsychiatric diseases. *Neuron*, 2014, 83, 27.

Mihatov Š. Perkutane koronarne intervencije u akutnom koronarnom sindromu. *Medicus*, 2003, 12, 70-71.

National Clinical Guideline Centre. Myocardial Infarction with ST-Segment Elevation, London, NICE Clinical guideline, 2013, str. 11-12.

Natriuretic Peptides in Congestive Heart Failure, 2018., https://login.medscape.com, pristupljeno 16.3.2018.

Nikolac Gabaj N. Biostatistika u kliničkoj praksi. U: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i sur., urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 36-57.

Ostojić R. Nacionalna strategija razvoja zdravstva 2012.-2020. Vlada Republike Hrvatske, Zagreb, 2012, str. 63-66.

Parodi EM, Kuhn B. Signalling between microvascular endothelium and cardiomyocytes through neuregulin. *Cardiovasc Res*, 2014, 102, 194-203.

Perkutane koronarne intervencije, 2014., http://www.msd-prirucnici.placebo.hr, pristupljeno 16.3.2018.

Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications. *Handb Exp Pharmacol*, 191, 2009, 1.

Reed GW, JE, Cannon CP, Acute myocardial infarction, *The Lancet*, 2016, 389, 197.

Rogić D. NTpro-BNP – diagnostic significance and recommended clinical applications. *Signa vitae*, 2015, 10, 89-91.

Santos H, Cauliez B, Tron C, Brunel V, Lavoinne A. Is heparin plasma suitable for the determination of B-type natriuretic peptide on the Beckman-Coulter Access 2?. *Clin Chem Lab Med*, 2010, 48, 399.

Schellings DAAM, van ’t Hof AWJ, ten Berg JM, Elvan A, Giannitsis E, Hamm C I SUR. NT-proBNP during and after primary PCI for improved scheduling of early hospital discharge. *Neth Heart J*, 2017, 25, 243-249.

Skorić B. Akutni koronarni sindrom. U: Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Sertić J, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 108-112.

ST-elevation myocardial infarction, 2018., https://online.epocrates.com, pristupljeno 16.3.2018.

Steg G, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom Lundqvist C, Borger MA i sur. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*, 2012, 33, 2569-2571.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60, 7.

Thygesen K, Alpert JS, Harvey D. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2007, 28, 2528.

Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 64.

Yiadom MYAB, Greenberg J, Smith HM, Sawyer DB, Liu D, Carlise J i sur. Diagnostic Utility of Neuregulin for Acute Coronary Syndrom. *Dis Markers*, 2016, 2016, 1-4.

Vaccarino V, Badimon L, Corti R, Cor de Wit C, Dorobantu M, Hall A i sur. Ischaemic heart disease in women: are there sex differences in pathophysiology and risk factors?. *Cardiovasc Res*, 2011, 90, 13-15.

Valente S, Lazzeri C, Chiostri M, Giglioli C, Sori A, Tigli S i sur. NT-proBNP on admission for early risk stratification in STEMI patients submitted to PCI. Relation with extension of STEMI and inflammatory markers. *Int J Cardiol*, 2009, 132, 84-89.

7. SAŽETAK

7.1. Sažetak

Akutni infarkt miokarda (AIM) jedan je od vodećih uzroka hospitalizacije i smrti u razvijenim zemljama. Akutni infarkt miokarda sa ST-elevacijom (STEMI) nastaje kao posljedica potupne okluzije koronarnih krvnih žila trombom. Od kako je perkutana koronarna intervencija uvedena kao terapijska metoda, značajno se poboljšao ishod bolesnika sa STEMI-jem. No, ona ne mora uvijek biti uspješna. Zbog toga je vrlo bitno što ranije prepoznati pacijente kod kojih je reperfuzija bila neuspješna kako bi se poduzele odgovarajuće mjere. Istraživači stoga nastoje otkriti specifične i osjetljive pokazatelje uspješnosti reperfuzije. NT-proBNP i neuregulin-1β našli su se na meti istraživača kao potencijalni biomarkeri prognoze i ishoda bolesnika sa STEMI-jem. NT- proBNP nastaje cjepanjem proBNP-a na BNP i NT-pro BNP. BNP ima zaštitnu funkciju kod AIM zbog čega njegove koncentracije u krvi rastu. Neuregulin-1β je faktor rasta ključan za funkcioniranje živčanog sustava. Neuregulin-1β također pokazuje potencijalnu zaštitnu funkciju, međutim dinamika vrijednosti neuregulina-1β u krvi nakon AIM nije razjašnjena kao kod BNP-a. Cilj ovog rada bio je ispitati dinamiku NT-proBNP-a i neuregulina-1β u krvi pacijenata prije i nakon perkutane koronarne intervencije. U istraživanju je sudjelovalo 104 pacijenata oboljelih od akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom. Krv je uzrokovana tri puta: prije PCI-e, 6 i 12 sati nakon PCI-e. Koncentracija NT-proBNP-a/NRG-a-1β u serumu određivana je ELISA (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) metodom, čija se reakcija temelji na nekompetitivnom sendvič principu. Istraživanje je pokazalo pravilnu dinamiku rasta koncentracija NT-proBNP-a nakon PCI-e s time da je porast izraženiji kod žena. Vrijednosti neuregulina-1β razlikuju se samo između prvog i trećeg vremena uzrokovanja, a toj razlici uglavnom pridonose vrijednosti muškaraca koje rastu kroz 12 sati nakon intervencije. Kod žena vrijednosti neuregulina-1β rastu unutar 6 sati nakon intervencije, nakon čega se vraćaju na početne vrijednosti. Koncentracije NT-proBNP-a i neuregulina-1β uglavnom ne koreliraju s dobi. Također, nije nađena povezanost između NT-proBNP-a i neuregulina-1β. Na temelju ovog istraživanja ne možemo donjeti generalni zaključak o dinamici ovih biomarkera nakon PCI-e, međutim uzimajući u obzir druge studije, NT-proBNP bi mogao biti klinički koristan biomarker u praćenju pacijenata nakon PCI-e. Dinamika neuregulin-1β, naprotiv, nije dovoljno istražena pa se o njemu još ne može govoriti kao potencijalnom biomarkeru u praćenju ishoda bolesnika.

7.2. Summary

Acute Myocardial Infarction (AIM) is one of the leading causes of hospitalization and death in developed countries. Acute myocardial infarction with ST elevation (STEMI) is the result of the occlusion of coronary vessel with thrombus. Since percutaneous coronary intervention (PCI) was introduced as a therapeutic method, the outcome of patients with STEMI was significantly improved. But it is not always successful. Therefore, it is very important to early identify patients in which the reperfusion was unsuccessful in order to take appropriate measures. Researchers are therefore trying to find specific and sensitive reperfusion performance indicators. NT-proBNP and neuregulin-1β are targets of reasearch as potential prognosis and outcome biomarkers of patients with STEMI. NT-proBNP is generated by cleaving proBNP to BNP and NT-pro BNP. BNP has a protective function in AIM due to which its blood concentration increases. Neuregulin-1β is a growth factor crucial for the functioning of the nervous system. Neuregulin-1β also exhibits a potential protective function, but the dynamics of neurelguline 1β in blood after AIM is not as clear as in BNP. The aim of this study was to examine the dynamics of NT-proBNP and neuregulin-1 in the blood of patients before and after percutaneous coronary intervention. The study included 104 patients with acute myocardial infarction with ST elevation. Blood was sampled three times: before PCI, 6 and 12 hours after PCI. NT-proBNP / NRG-α-1β concentration in serum was determined by an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method, in which reaction is based on a non-competitive sandwich principle. Research has shown a fair growth dynamics of NT-proBNP concentration after PCI, with increased growth in women. Neuragulin-1β values differ only between the first and third time of causation, and this difference mainly contributes to the values of men who grow 12 hours after the intervention. In women the value of neuregulin-1β increases within 6 hours after the intervention, after which they return to the initial values. NT-proBNP and neuregulin-1β concentrations generally do not correlate with age. Also, there was no correlation between NT-proBNP and neuragulin-1β. Based on this study we can not make a general conclusion about the dynamics of these biomarkers after PCI, but considering other studies, NT-proBNP could be a clinically useful biomarker in PCI tracking patients. Dynamics of neuregulin-1β, on the contrary, have not been sufficiently studied and can not yet be said to be a potential biomarker for monitoring patient outcomes.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

ADP – adenozin-difosfat

AIM – akutni infarkt miokarda

ANP – atrijski natrijuretski peptid (engl. *Atrial Natriretic Peptide*)

ASK – askorbinska kiselina

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*)

BNP – B-tip natrijuretskog peptida (engl. *Brain Natriuretic Peptide*)

cGMP – ciklički gvanozin-monofosfat

CNP – vaskularni natrijuretski peptid (engl. *Capillary Natriuretic Peptide*)

CRP – C-reaktivni protein

EGF – epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*)

EKG – elektrokardiografija

ELISA – enzimoimunokemijska metoda (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPS – endotelne progenitorske stanice

GFR – brzina glomerularne filtracije (engl. *Glomerular Filtration Rate*)

GGF – glijalni faktor rasta (engl. *Glial Growth Factor*)

HRP – hren peroksidaza (engl. *horseradish peroxidase*)

KOPB – kronična opstruktivna bolest pluća

NEP – neutralna endopeptidaza (engl. *Neutral Endopeptidase*)

NPR – receptor natrijuretskog peptida (engl. *Natriretic Peptide Receptror*)

NRG – neuregulin

NSTEMI – infarkt miokarda bez ST-elevacije (engl. *non ST-elevated myocardial infarction*)

NT-proBNP – N-terminalni prohormon B-tipa natrijuretskog peptida

PCI – perkutana koronarna intervencija (engl. *Percutaneous Coronary Intervention*)

pCO_2 – parcijalni tlak ugljikovog dioksida

PPCI – primarna perkutana koronarna intervencija (engl. *Primary Percutaneous Coronary Intervention*)

pO_2 – parcijalni tlak kisika

PTCA – perkutana transluminalna koronarna angioplastika (engl. *Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty*)

STEMI – infarkt miokarda sa ST-elevacijom (engl. *ST-elevation myocardial infarction*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TMB – tetrametilbenzidin

UDMI – univerzalna definicija infarkta miokarda (engl. *Universal Definition of Myocardial Infarction*)

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KONCENTRACIJE N-TERMINALNOG PROHORMONA B-TIPA NATRIJURETSKOG PEPTIDA I NEUREGULINA-1B NAKON PERKUTANE KORONARNE INTERVENCIJE

Roberta Halusek

SAŽETAK

Akutni infarkt miokarda (AIM) jedan je od vodećih uzroka hospitalizacije i smrti u razvijenim zemljama. Akutni infarkt miokarda sa ST-elevacijom (STEMI) nastaje kao posljedica potupne okluzije koronarnih krvnih žila trombom. Od kako je perkutana koronarna intervencija uvedena kao terapijska metoda, značajno se poboljšao ishod bolesnika sa STEMI-jem. No, ona ne mora uvijek biti uspješna. Zbog toga je vrlo bitno što ranije prepoznati pacijente kod kojih je reperfuzija bila neuspješna kako bi se poduzele odgovarajuće mjere. Istraživači stoga nastoje otkriti specifične i osjetljive pokazatelje uspješnosti reperfuzije. NT-proBNP i neuregulin-1β našli su se na meti istraživača kao potencijalni biomarkeri prognoze i ishoda bolesnika sa STEMI-jem. NT- proBNP nastaje cjepanjem proBNP-a na BNP i NT-pro BNP. BNP ima zaštitnu funkciju kod AIM zbog čega njegove koncentracije u krvi rastu. Neuregulin-1β je faktor rasta ključan za funkcioniranje živčanog sustava. Neuregulin-1β također pokazuje potencijalnu zaštitnu funkciju, međutim dinamika vrijednosti neuregulina- 1β u krvi nakon AIM nije razjašnjena kao kod BNP-a. Cilj ovog rada bio je ispitati dinamiku NT-proBNP-a i neuregulina-1β u krvi pacijenata prije i nakon perkutane koronarne intervencije. U istraživanju je sudjelovalo 104 pacijenata oboljelih od akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom. Krv je uzrokovana tri puta: prije PCI-e, 6 i 12 sati nakon PCI-e. Koncentracija NT-proBNP-a/NRG-a-1β u serumu određivana je ELISA (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) metodom, čija se reakcija temelji na nekompetitivnom sendvič principu. Istraživanje je pokazalo pravilnu dinamiku rasta koncentracija NT-proBNP-a nakon PCI-e s time da je porast izraženiji kod žena. Vrijednosti neuregulina-1β razlikuju se samo između prvog i trećeg vremena uzrokovanja, a toj razlici uglavnom pridonose vrijednosti muškaraca koje rastu kroz 12 sati nakon intervencije. Kod žena vrijednosti neuregulina-1β rastu unutar 6 sati nakon intervencije, nakon čega se vraćaju na početne vrijednosti. Koncentracije NT-proBNP-a i neuregulina-1β uglavnom ne koreliraju s dobi. Također, nije nađena korelacija između NT-proBNP-a i neuregulina-1β. Na temelju ovog istraživanja ne možemo donjeti generalni zaključak o dinamici ovih biomarkera nakon PCI-e, međutim uzimajući u obzir druge studije, NT-proBNP bi mogao biti klinički koristan biomarker u praćenju pacijenata nakon PCI-e. Dinamika neuregulin-1β, naprotiv, nije dovoljno istražena pa se o njemu još ne može govoriti kao potencijalnom biomarkeru u praćenju ishoda bolesnika.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 12 grafičkih prikaza, 4 tablica i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: akutni infarkt miokarda, perkutana koronarrna intervencija, B-tip natrijuretskog peptida (BNP), neuregulin-1 (NRG-1), ELISA

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Olga Gornik, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: ožujak 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study:Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CONCENTRATIONS OF N-TERMINAL PROHORMONE OF B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE AND NEUREGULIN-1β AFTER PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION

Roberta Halusek

SUMMARY

Acute Myocardial Infarction (AIM) is one of the leading causes of hospitalization and death in developed countries. Acute myocardial infarction with ST elevation (STEMI) is the result of the occlusion of coronary vessel with thrombus. Since percutaneous coronary intervention (PCI) was introduced as a therapeutic method, the outcome of patients with STEMI was significantly improved. But it is not always successful. Therefore, it is very important to early identify patients in which the reperfusion was unsuccessful in order to take appropriate measures. Researchers are therefore trying to find specific and sensitive reperfusion performance indicators. NT-proBNP and neuregulin-1β are targets of reasearch as potential prognosis and outcome biomarkers of patients with STEMI. NT-proBNP is generated by cleaving proBNP to BNP and NT-pro BNP. BNP has a protective function in AIM due to which its blood concentration increases. Neuregulin-1β is a growth factor crucial for the functioning of the nervous system. Neuregulin-1β also exhibits a potential protective function, but the dynamics of neurelguline 1β in blood after AIM is not as clear as in BNP. The aim of this study was to examine the dynamics of NT-proBNP and neuregulin-1 in the blood of patients before and after percutaneous coronary intervention. The study included 104 patients with acute myocardial infarction with ST elevation. Blood was sampled three times: before PCI, 6 and 12 hours after PCI. NT-proBNP / NRG-α-1β concentration in serum was determined by an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method, in which reaction is based on a non-competitive sandwich principle. Research has shown a fair growth dynamics of NT-proBNP concentration after PCI, with increased growth in women. Neuragulin-1β values differ only between the first and third time of causation, and this difference mainly contributes to the values of men who grow 12 hours after the intervention. In women the value of neuregulin-1β increases within 6 hours after the intervention, after which they return to the initial values. NT-proBNP and neuregulin-1β concentrations generally do not correlate with age. Also, there was no correlation between NT-proBNP and neuragulin-1β. Based on this study we can not make a general conclusion about the dynamics of these biomarkers after PCI, but considering other studies, NT-proBNP could be a clinically useful biomarker in PCI tracking patients. Dynamics of neuregulin-1β, on the contrary, have not been sufficiently studied and can not yet be said to be a potential biomarker for monitoring patient outcomes.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 48 pages, 12 figures, 4 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: acute myocardial infarction, percutaneous coronary intervention, B-type natriuretic peptide (BNP), neuregulin-1 (NRG-1), ELISA

Mentor: **Nada Vrkić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Vrkić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2018.