

Uloga mitohondrija u patofiziologiji ishemijsko-reperfuzijske ozljede

Meštrović, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:405925>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dora Meštrović

**Uloga mitohondrija u patofiziologiji
ishemijsko-reperfuzijske ozljede**



DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Filipa Sedlića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Filip Sedlić, dr. med

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:

ADP- adenzin difosfat

AIF1- čimbenik poticanja apoptoze 1 (*engl.* apoptosis-inducing factor 1)

ALDH2- aldehid dehidrogenaza 2 (*engl.* aldehyde dehydrogenase 2)

ANT- adenin nukleotid translokaza (*engl.* adenine nucleotide translocator)

AMI- akutni infarkt miokarda (*engl.* acute myocardial infarction)

ATP- adenzin trifosfat

CDK1- kinaza ovisna o ciklinima 1 (*engl.* cyclin-dependent kinase 1)

CK-MB- kreatin kinaza MB (*engl.* creatine kinase MB)

CLK- ciklus limunske kiseline

CoA- koenzim A

CsA- ciklosporin A

DCF-DA- 2,7-dihidrodiklorofluorescein diacetat

Drp1- dinaminu srodni protein 1 (*engl.* dinamin-related protein 1)

ECMO- izvantjelesna membranska oksigenacija (*engl.* Extracorporeal Membrane Oxygenation)

ER- endoplazmatski retikulum (*engl.* endoplasmatic reticulum)

FAD- flavin adenin dinukleotid

Fis1- mitohondrijski fisioni protein 1 (*engl.* mitochondrial fission protein 1)

FMN- flavin adenin mononukleotid

Gpx- glutation peroksidaza (*engl.* glutathione peroxidase)

Gssg- oksidirani glutation

Gsh- reducirani glutation

GTP- gvanozin trifosfat

HIF1- čimbenik potaknut hipoksijom 1 (*engl.* hypoxia inducible factor 1)

IMAC- anionski kanal unutarnje membrane (*engl.* inner membrane anion channel)

IFM- intermiofibrilarni mitohondriji

IR- ishemija-reperfuzija

K_{ATP}- kalijev kanal ovisan o ATP-u (*engl.* ATP-sensitive potassium channel)

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

LCX- lijeva cirkumfleksna arterija (*engl.* left circumflex artery)

NADH- nikotinamid adenin dinukleotid

NNT- nikotinamid nukleotid transhidrogenaza

NO- dušični monoksid

NOX4- NADPH oksidaza 4 (*engl.* NADPH oxidase 4)

MAO- monoaminooksidaza (*engl.* monoaminoxidase)

MCU- mitohondrijski kalcijski uniporter (*engl.* mitochondrial calcium uniporter)

MIEF1- mitohondrijski elongacijski čimbenik 1 (*engl.* mitochondrial elongation factor 1)

Mff- mitohondrijski fisijski čimbenik (*engl.* mitochondrial fission factor)

Mfn 1/2- mitofuzin 1/2 (*engl.* mitofusin 1/2)

Mid49/51- proteini mitohondrijske dinamike 49 i 51 (*engl.* mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa)

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

MtCK- mitohondrijska kreatin kinaza (*engl.* mitochondrial creatine kinase)

OPA1- bjelančevina optičke atrofije 1 (*engl.* optic atrophy 1 protein)

OXPPOS- oksidativna fosforilacija (*engl.* oxidative phosphorylation)

PCI- perkutana koronarna intervencija (*engl.* percutaneous coronary intervention)

PKC- protein kinaza C (*engl.* protein kinase C)

PNM- perinuklearni mitohondriji

Prx- peroksiredoksin (*engl.* peroxiredoxine)

RAAS- renin-angiotenzin-aldosteronski sustav (*engl.* renin-angiotensin-aldosterone system)

RET- reverzni elektronski transport (*engl.* reverse electron transport)

RIRR- ROS-om potaknuto oslobađanje ROS-a (*engl.* ROS-induced ROS release)

ROS- reaktivni kisikovi spojevi (*engl.* reactive oxygen species)

rRNA- ribosomska ribonukleinska kiselina (*engl.* ribosomal ribonucleic acid)

S1P- sfingozin-1-fosfat

SDH- sukcinat dehidrogenaza

SfA- sangliferin A

SSM- subsarkolemalni mitohondriji

SOD- superoksid dismutaza (*engl.* superoxide dismutase)

TMRM- tetrametilrodamin metil ester

tRNA- prijenosna ribonukleinska kiselina (*engl.* transfer ribonucleic acid)

Trx- tioredoksin (*engl.* thioredoxine)

TTC- 2,3,5- trifeniltetrazolin klorid (*engl.* triphenyl tetrazolium chloride)

UCP 2/3- rasprežuće bjelančevine 2 i 3 (*engl.* uncoupling proteins 2 and 3)

VDAC - anionski kanal ovisan o naponu (*engl.* voltage-dependent anion channels)

Sadržaj:

1. Sažetak.....	1
2. Summary.....	2
3. Uvod.....	3
3.1. Mitohondriji.....	3
3.1.1 Osnovne funkcije.....	3
3.1.2 Građa mitohondrija.....	3
3.1.3 Genetički materijal mitohondrija.....	4
3.2. Procesi dobivanja energije.....	5
3.2.1 Aerobni uvjeti.....	5
3.2.2 Anaerobni uvjeti.....	5
3.2.3 Ostali izvori energije.....	5
3.3. Oksidativna fosforilacija.....	6
3.3.1. Prijenos elektrona.....	6
3.3.2. Respiratorni lanac.....	7
3.3.3. Kemiosmoza.....	8
4. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda.....	9
4.3. Ishemijska ozljeda.....	9
4.1.1. Razlika hipoksije i ishemije.....	9
4.1.2. Epidemiologija ishemijskih ozljeda.....	10
4.1.3. Patogeneza ishemijske ozljede.....	10
4.2. Reperfuzijska ozljeda.....	14
4.2.1. Definicija reperfuzijske ozljede.....	14
4.2.2. Patogeneza reperfuzijske ozljede.....	14
4.3. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda miokarda.....	15
5. Proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva.....	15
5.1. Reaktivni kisikovi spojevi.....	15
5.1.1. Definicija.....	15
5.1.2. Vrste reaktivnih kisikovih spojeva.....	16
5.2. Fiziološki uvjeti.....	18
5.2.1. Sinteza u fiziološkim uvjetima.....	18
5.2.2. Fiziološka uloga.....	19
5.3. Patološki uvjeti.....	19
5.3.1. Patofiziološka uloga.....	19

5.3.2.	Respiratorni lanac.....	20
5.3.3.	Ostali izvori.....	23
5.4.	Poremećaj zaštitnog sustava stanice.....	24
5.5.	Patogeneza stanične ozljede.....	25
6.	Funkcionalne i strukturne promjene mitohondrija za vrijeme ishemije i reperfuzije	
6.1.	Otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pore.....	26
6.1.1.	Uzroci otvaranja mitohondrijske permeabilizacijske pore.....	26
6.1.2.	Građa mitohondrijske permeabilizacijske pore.....	26
6.2.	Mitohondriji u fiziološkom stanju.....	27
6.2.1.	Položaj mitohondrija.....	27
6.2.2.	Mitohondrijska dinamika.....	28
6.2.3.	Heterogenost mitohondrija.....	28
6.2.4.	Stanično signaliziranje i mitohondriji.....	29
6.2.5.	Mitofagija.....	30
6.3.	Mitohondriji u patološkim stanjima.....	31
6.3.1.	Promjene mitohondrijske heterogenosti.....	31
6.3.2.	Prekomjerna aktivacija fisije.....	31
7.	Farmakološki agensi i lijekovi usmjereni na mitohondrije za ublažavanje ishemijsko-reperfuzijske ozljede.....	33
7.1.	Inhibitori otvaranja mPTP-a.....	33
7.2.	Smanjenje oksidativnog stresa.....	35
7.3.	Modulatori mitohondrijske dinamike.....	36
7.3.1.	Inhibicija mitohondrijske fisije.....	36
7.3.2.	Poticanje mitohondrijske fuzije.....	38
7.4.	Ishemijsko prekondicioniranje.....	38
7.5.	Transplantacija mitohondrija.....	38
7.5.1.	Korisnost mitohondrijske transplantacije.....	38
7.5.2.	Ulazak mitohondrija u stanice.....	40
7.5.3.	Imunološke reakcije na transplantirane mitohondrije.....	41
8.	Zahvale.....	42
9.	Literatura.....	43
10.	Životopis.....	51

1. Sažetak

Uloga mitohondrija u patofiziologiji ishemijsko-reperfuzijske ozljede

Meštrović D.

Ishemijsko-reperfuzijska (IR) ozljeda predstavlja jedan od najčešćih uzroka stanične ozljede. Ishemijske bolesti srca i mozga ostaju, unatoč značajnom razvoju farmakološkog i kirurškog liječenja te prevencije tih bolesti, i dalje među glavnim uzrocima morbiditeta i mortaliteta u razvijenim zemljama. Novija istraživanja ukazuju na to da mitohondriji, kao stanične organele zadužene za proizvodnju ATP-a, regulaciju unutarstanične koncentracije Ca^{2+} i važni izvori reaktivnih kisikovih spojeva (*engl.* reactive oxygen species, ROS), imaju važnu ulogu u nastanku IR ozljede.

U ovome diplomskom radu predstaviti ću brojne mehanizme putem kojih mitohondriji mogu sudjelovati u patogenezi IR ozljede, uključujući sintezu ROS-a, oslobađanje mitohondrijskog Ca^{2+} i promjene dinamike fisije i fuzije. Nakon predstavljanja pojedinih mehanizma koji dovode do IR ozljede predstaviti ću potencijalnu farmakološku terapiju vezanu uz iste. Također ću iznijeti neke od preventivnih farmakoloških metoda koje bi mogle značajno smanjiti opseg te ozljede. Uz to, spomenuti ću neke od studija na životinjama i značajnija klinička istraživanja.

U konačnici, raspraviti ću o prednostima i nedostacima farmakološke terapije usmjerene prema mitohondrijima te ću opisati predstojeće izazove koji moraju biti prevladani prije šire upotrebe ove terapije.

Ključne riječi: ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, mitohondriji, terapija

2. Summary

The role of mitochondria in the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury

Meštrović D.

Ischemia-reperfusion (IR) injury is one of the most common causes of cellular injury. Ischemic diseases of the heart and the brain have remained, despite significant progress achieved in the pharmacological and surgical treatment and, a major cause of morbidity and mortality in developed countries. Recent studies showed that mitochondria, as an organelles responsible for production of ATP, intracellular Ca^{2+} regulation and rective oxygen species (ROS) production, play a key role in the IR injury.

In this thesis, I will focus on the various mechanisms through which mitochondria participate in the pathogenesis of IR injury, including ROS synthesis, release of mitochondrial calcium and changes in the fusion-fission dynamics. After presenting mechanisms that lead to IR injury, I will present potential pharmacological treatments aimed at these mechanisms. I will also discuss certain pharmacological methods of prevention which may considerably reduce the extent of the injury. In addition, important animal and clinical studies will be discussed.

Finally, advantages and disadvantages of pharmacological therapy targeting the mitochondria will be discussed, as well as some of the future challenges that must be overcome to enable wider use of this therapy.

Keywords: ischemia-reperfusion injury, mitochondria, therapy

3. Uvod

3.1. Mitochondriji

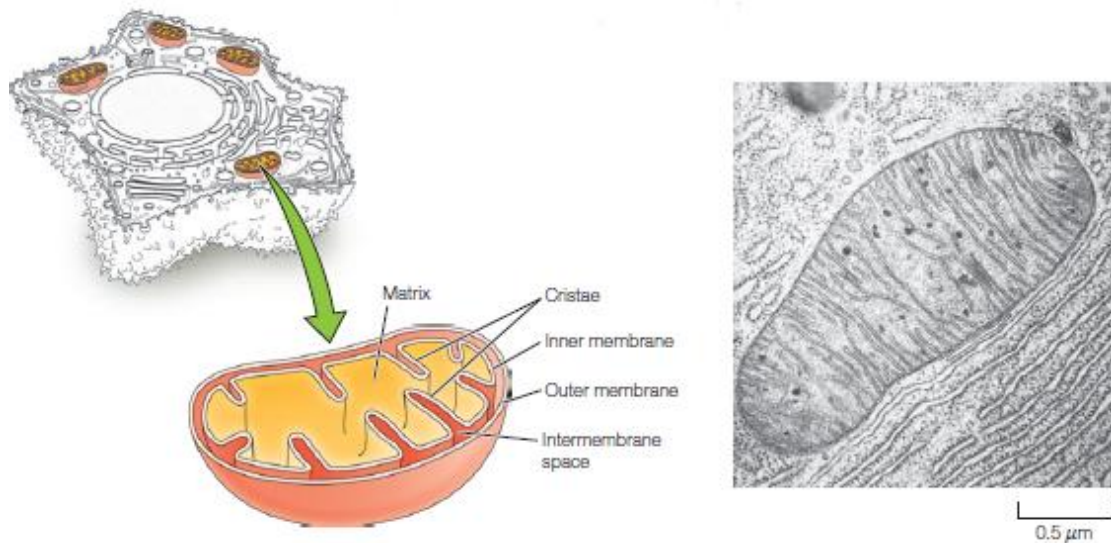
3.1.1. Osnovne funkcije

Mitochondriji (mito=mitochondros= granule) su stanične organele odgovorne za sintezu adenozin trifosfata (ATP-a) u eukariotskoj stanici. Proces dobivanja ATP-a iz proizvoda metabolizma ugljikohidrata, lipida i aminokiselina naziva se oksidativna fosforilacija (*engl.* oxidative phosphorylation, OXPHOS). Mitochondriji sadržavaju svoju DNA koja kodira neke mitohondrijske proteine, tRNA (*engl.* transfer ribonucleic acid) i rRNA (*engl.* ribosomal ribonucleic acid) te se nasljeđuje maternalno. Sinteza mitohondrija odvija se pomoću proteina koji su kodirani mitohondrijskom i jezgrinom DNA.

3.1.2. Građa mitohondrija

Mitochondriji su građeni od unutrašnje i vanjske membrane te se između njih nalazi intermembranski prostor. Za razliku od vanjske membrane, koja je glatka, unutrašnja membrana sadržava nabore (kriste) koji su izbočeni u unutrašnjost mitohondrija (matriks). Unutrašnja i vanjska mitohondrijska membrana građene su od dvosloja fosfolipida te većina lipida mitohondrijskih membrana potječe iz citosola. To su sfingolipidi, kolesterol, fosfatidilkolin, fosfatidilinozitol i fosfatidilserin. Uz to, membrane sadržavaju fosfatidiletanolamin, koji se sintetizira na membranama mitohondrija dekarboksilacijom fosfatidilserina i kardiolipin koji poboljšava efikasnost oksidativne fosforilacije ograničavanjem protoka protona preko membrana (stabilizira komplekse I, III i IV). Vanjska membrana mitohondrija je propusna za male molekule, dok je transport preko unutrašnje membrane reguliran transporterima i potaknut

elektrokemijskim gradijentom. Genetički materijal mitohondrija se nalazi u matriksu, kao i brojni enzimi potrebni za razgradnju glukoze i masnih kiselina (1).



Slika 1. Shematski prikaz strukture mitohondrija (lijevo) i slika elektronskim mikroskopom (desno) (Preuzeto iz: G.M.Cooper, R.E. Hausmann, 2006.)

3.1.3. Genetički materijal mitohondrija

Mitohondriji sadržavaju vlastiti genom za kojeg se smatra da je nastao evolucijom bakterija koje su razvile simbiotsku vezu s većim stanicama (endosimbioza). Mitohondrijski genetički materijal najsličniji je onom onaj od α -proteobakterija kao npr. *Rickettsia prowazekii*. Mitohondrijski genom, veličine 16 kb u ljudi i većine životinja, je obično kružna DNA molekula koja se nalazi u većem broju u pojedinoj organeli. Ljudski mitohondrijski genom kodira 13 proteina potrebnih za respiratorni lanac i oksidativnu fosforilaciju kao i 16S i 12S ribosomalnu RNA (ribosomi mitohondrija životinja i kvasaca) te 22 vrste transfer RNA koji su potrebne za prevođenje proteina kodiranih genomom organela. Unatoč tome, 99% (oko 1500) mitohondrijskih proteina kodirano je od strane gena u jezgri te se sintetiziraju u citosolu i prenose u mitohondrije kroz unutrašnju i vanjsku membranu. To je složen proces te se vjeruje da se proteini pomoću najmanje četiri razreda signalnih sljedova usmjeruju kroz translokon na vanjskoj membrani mitohondrija u različite odjeljke (1).

3.2. Procesi dobivanja energije

3.2.1. Aerobni uvjeti

Glukoza je većinski izvor energije u mnogim tkivima. U procesu glikolize glukoza se metabolizira do piruvata te se u aerobnim uvjetima molekula piruvata oksidira do acetil-koenzima A (acetil-CoA) i ugljikovog dioksida (CO₂) uz nastajanje nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). Dobiveni acetil-CoA zatim ulazi u ciklus limunske kiseline (CLK), odnosno Krebsov ciklus (*engl.* tricarboxylic acid cycle, TCA), uz proticanje elektrona kroz respiratorni lanac da bi u konačnici došlo do sinteze ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije. Oksidacija piruvata u acetil-CoA, ciklus limunske kiseline i oksidativna fosforilacija odvijaju se unutar mitohondrija. U konačnici, potpunom aerobnom oksidacijom jedne molekule glukoze do CO₂ i H₂O dobiva se 30 tj. 32 molekule ATP-a, ovisno o tome predaje li NADH (dobiven u citosolu u reakciji glikolize) svoje elektrone u respiracijski lanac preko glicerol-fosfatnog ili malat-aspartatnog sustava.

3.2.2. Anaerobni uvjeti

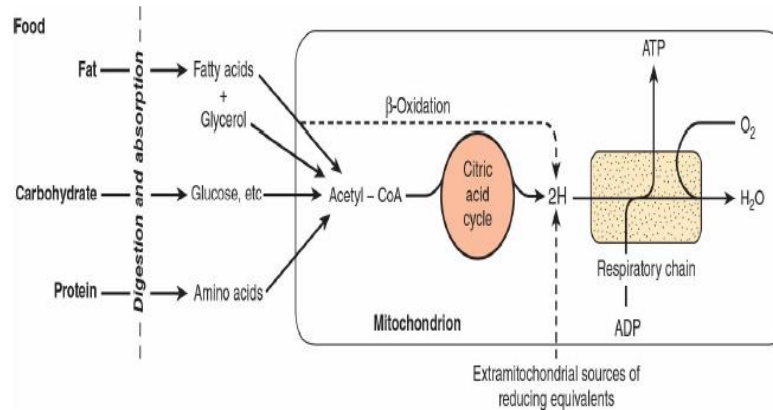
Piruvat se može, u anerobnim uvjetima, reducirati do laktata što služi za obnovu NAD⁺. Na ovaj način se mogu dobiti samo dvije molekule ATP-a tijekom same glikolize.

3.2.3. Ostali izvori energije

Osim toga, glukoza se iskorištava i u drugim procesima – glikogenezi, u skeletnim mišićima i jetri, te putu pentoza fosfata, gdje se dobivaju zalihe riboze potrebne za sintezu nukleinskih kiselina i trioza fosfati potrebni za sintezu triacilglicerola. Piruvat i međuproizvodi Krebsovog ciklusa mogu se koristiti za sintezu aminokiselina dok se acetil-CoA iskorištava za sintezu masnih kiselina, kolesterola i samim time, steroidnih hormona. Glukoneogeneza je proces sinteze glukoze iz neugljikohidratnih prekursora kao što su laktati, aminokiseline i glicerol. S druge strane, masne kiseline, dobivene prehranom ili procesom sinteze iz acetil-CoA, mogu se oksidirati do acetil-CoA u procesu β-oksidacije ili esterificirati s glicerolom u triacilglicerole te služiti kao energetska zaliha organizma.

Aminokiseline se dijele na esencijalne (one koje ne mogu biti sintetizirane u tijelu i moraju se unositi prehranom) i na neesencijalne aminokiseline (one koje se unose prehranom, ali se mogu i sintetizirati u tijelu procesom transaminacije). Deaminacija je proces u kojoj se uklanja amino-skupina te se amino-nitrat luči u obliku ureje dok se

ugljikohidratni dijelovi mogu ili oksidirati do CO_2 u procesu limunske kiseline, koristiti za glukoneogenezu ili formaciju ketonskih tijela ili acetil-CoA koji se zatim može oksidirati za formaciju masnih kiselina (2).



Slika 3. Uloga oksidativne fosforilacije mitohondrija u konverziji različitih proizvoda metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina u ATP (preuzeto iz: Robert K. Murray i sur., 2011.)

3.3. Oksidativna fosforilacija

3.3.1. Prijenos elektrona

Mitohondrijski matriks okružen je s unutrašnjom i vanjskom membranom. Unutrašnja membrana je visokoselektivna, dok je vanjska membrana propusna za male molekule. Vanjska membrana na sebi sadržava enzime: acil-koenzim A (acil-CoA) sintetazu, glicerol fosfat aciltransferazu i druge. Neki enzimi, kao adenilil kinaza i kreatin kinaza nalaze se u intermembranskom prostoru. Unutrašnja membrana sadržava enzime respiratornog lanca, ATP sintazu i brojne membranske transportere.

Tijekom oksidativne fosforilacije prenose se elektroni s NADH-a i flavin adenin dinukleotida (FADH_2) na O_2 , a energija oslobođena tim procesom pokreće sintezu ATP-a od ADP-a i fosfata. NADH se proizvodi i u citosolu iz 3-fosfogliceraldehid dehidrogenaze (glikoliza) te ne može samostalno proći do unutrašnje mitohondrijske membrane. Prijenos NADH do unutrašnje mitohondrijske membrane se vrši kroz dva transportna sustava: glicerofosfatni sustav gdje se elektroni prenose na FADH_2 i malat-aspartatni sustav koji kombinira glutamat/aspartat transporter i α -ketoglutarat/malat

transporter. Glicerofosfatni sustav ne postoji u nekim tkivima, npr. u srčanom mišiću (2).

3.3.2. Respiratorni lanac

Prijenos elektrona s NADH-a na O_2 se odvija putem tri velika proteinska kompleksa: 1) NADH-Q oksidoreduktaze (kompleks I), gdje se elektroni prebacuju s NADH na koenzim Q (ubikvinon); 2) Q-citokrom c oksidoreduktaze (kompleks III), gdje se elektroni prebacuju na citokrom c; i 3) citokrom c oksidaze, gdje se kisik reducira u vodu. S druge strane, prijenos elektrona može se odvijati sa sukcinata/fumarata putem sukcinat-Q reduktaze (kompleks II).

Prilikom prijenosa dva elektrona s NADH na koenzim Q (kompleks I), četiri se vodikova protona prenose u intermembranski prostor. Elektroni se prvo prenose na flavin mononukleotid (FMN) te na nekoliko željezo-sumpor nosača pa u konačnici na koenzim Q. Primajući dva elektrona, koenzim Q prima i dva vodikova protona i reducira se u ubikvinol (QH_2). U kompleksu II, elektroni iz $FADH_2$, koji je formiran prilikom konverzije sukcinata u fumarat u ciklusu limunske kiseline pomoću enzima sukcinat-dehidrogenaze, se prenose preko nekoliko željezo-sumpor (Fe-S) nosača na koenzim Q pri čemu se također formira ubikvinol. Glicerol-3-fosfat, koji nastaje prilikom razgradnje triacilglicerola ili u glikolizi, i acil-CoA prenose elektrone na koenzim Q koristeći flavoproteine.

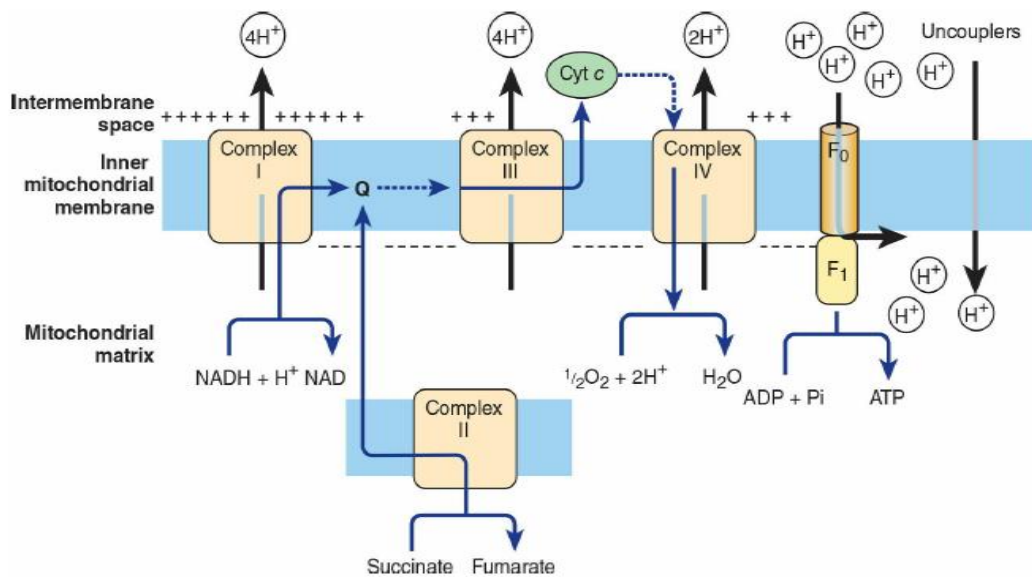
Prijenos elektrona sa QH_2 na citokrom c u kompleksu III posredovan je različitim molekulama (citokrom c, bL, bH i Rieske željezo-sumporov nosač) gdje se elektroni prenose s nosača parova na nosače pojedinačnih elektrona te se taj prijenos naziva kinonskim ciklusom. Prilikom ove reakcije četiri vodikova protona se transportiraju u intermembranski prostor. Reducirani citokrom c se oksidira u kompleksu IV te se, zauzvrat, kisik reducira na dvije molekule vode. Za redukciju kisika potrebna su četiri elektrona i četiri vodikova iona. Ta je reakcija također posredovana s nekoliko molekula te se prilikom ove reakcije četiri vodikova protona transportiraju u intermembranski prostor. Odnosno, za svaki NADH ili $FADH_2$ u kompleksu IV dva se vodikova protona prenose u intermembranski prostor.

U ovom kompleksu iznimno je važno da se kisik u potpunosti reducira jer bi u suprotnom slučaju došlo do stvaranja superoksidnog aniona ako kisik prihvati jedan elektron ili peroksida, ako kisik prihvati dva elektrona (2).

3.3.3. Kemiosmoza

Tok elektrona s NADH-a ili FADH₂ na kisik kroz proteinske komplekse dovodi do izbacivanja protona iz matriksa mitohondrija u intermembranski prostor te ta nejednaka raspodjela protona stvara gradijent koncentracije protona (unutrašnjost lužnata, intermembranski prostor kiseo) i transmembranskog električnog potencijala koji stvara proton-motornu silu.

Proton-motorna sila odgovorna je za sintezu ATP-a na ATP sintazi (FoF1 ATP-aza) iz ADP-a i Pi. Za sintezu jedne ATP molekule potrebno je četiri protona što znači da po molekuli NADH nastaju 2.5 molekula ATP-a (10 protona izbačeno u intermembranski prostor) i po molekuli FADH₂ 1.5 molekula ATP-a (6 protona izbačeno u intermembranski prostor) (2). Uz to, dokazano je da ATP-sintaza u posebnim uvjetima, kao što je potpuna depolarizacija mitohondrija može i hidrolizirati ATP.



Slika 4. Shematski prikaz oksidativne fosforilacije (Preuzeto iz: Robert K. Murray i sur., 2011.)

4. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

4.1. Ishemijska ozljeda

4.1.1. Razlika hipoksije i ishemije

Odgovor stanice na različite nokse ovisi o njihovoj prirodi, trajanju i jačini, a posljedice po stanicu ovise o njezinoj vrsti i mogućnosti prilagodbe. Hipoksija je najčešći uzrok stanične ozljede. Do hipoksije može doći zbog manjka kisika u zraku, poremećaja u transportu kisika (manjak ili poremećena funkcija hemoglobina; smanjena proizvodnja crvenih krvnih stanica), respiratornih i kardiovaskularnih bolesti, poremećaja u iskorištavanju kisika unutar same stanice te poremećene krvne opskrbe tj. ishemije. Ishemija je najčešći uzrok hipoksije te je posljedica obično arterijske okluzije, iako može nastati i kao poremećaj venskog odlijeva. Ishemijska ozljeda je najčešće uzrokovana aterosklerotskim promjenama na krvnim žilama i/ili okluzijom krvne žile (trombozom, embolijom). Ovisno o težini hipoksije, stanice se mogu prilagoditi, ozlijediti ili umrijeti. Stanice se puno bolje prilagođavaju kroničnoj nego akutnoj anoksiji (potpuni manjak kisika). Primjerice, ako je arterija sužena, tkivo kojeg ta arterija opskrbljuje se može smanjiti (atrofirati) za razliku od stanične ozljede i smrti koje nastaju anoksijom (3).

Za vrijeme hipoksije u stanicama se pojačava glikoliza. Razine laktata i sukcinata znatno rastu te je upravo nakupljanje sukcinata prvi metabolički znak ishemije te se smatra posljedicom inhibicije ciklusa limunske kiseline (4,5). Osim toga, najnovije studije pokazuju kako se sukcinat može pojačano sintetizirati zbog poremećaja djelovanja sukcinat dehidrogenaze (SDH) koji se javlja kao posljedica prelaska elektrona s ubikvina na fumarat (5,6). Sukcinat se također u ishemiji teže razgrađuje zbog manjka gvanozin trifosfata (GTP) i koenzima A (CoA) potrebnih za rad sukcinil-koenzim A sintetaze (4,5).

Za razliku od hipoksije gdje je krvožilni protok održan i proizvodnja energije anerobnom glikolizom se može nastaviti, u ishemičnim uvjetima aerobni i anaerobni metabolizam zakazuju jer ishemija kompromitira dobavljanje supstrata za glikolizu. Samim zatajenjem metabolizma dolazi do smanjenja unutarstanične koncentracije ATP-a i disfunkcije stanice. Primjerice, unutar 3-5 minuta nakon nastanka ishemije miokarda, on se prestaje kontrahirati (3).

4.1.2. Epidemiologija ishemijskih ozljeda

Jedan od najčešćih primjera akutne hipoksijske ozljede jest infarkt miokarda te moždani udar (3). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, 2019. godine kardiovaskularne bolesti su bile uzrok smrti 17.9 milijuna ljudi, tj. 32% sveukupne smrtnosti. 85% smrti od kardiovaskularnih bolesti je rezultat srčanog ili moždanog udara. U Republici Hrvatskoj ishemijska bolest srca vodeći je uzrok smrti 2019. godine (15% sveukupne smrtnosti) dok su cerebrovaskularne bolesti drugi uzrok smrti (10% sveukupne smrtnosti) (7).

4.1.3. Patogeneza ishemijske ozljede

Nedovoljna oksigenacija stanice dovodi do inhibicije protoka elektrona duž respiracijskog lanca jer manjak kisika, kao manjak spoja koji se reducira, direktno smanjuje sintezu ATP-a na ATP-sintazi. Posljedično, protonski gradijent na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani ne može se održati što dovodi do obrtanja ATP sintaze te enzim tada kreće hidrolizirati ATP kako bi održao membranski potencijal (8).

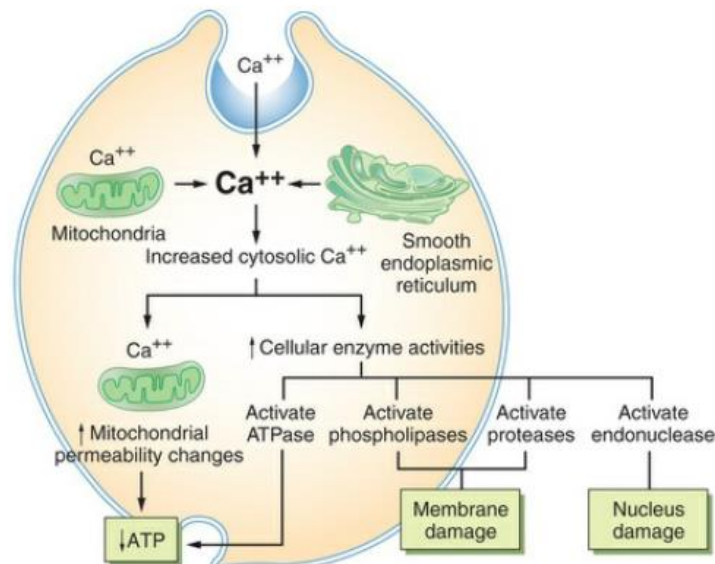
Smanjenje unutarstanične koncentracije ATP-a od 5-10% već može dovesti do kritičnog oštećenja stanice. Manjak kisika i ATP-a u stanici aktivira anaerobni metabolizam pri čemu će se ATP dobivati iz glikogena uz povećavanje koncentracije laktične kiseline i anorganskih fosfata nastalih hidrolizom fosfatnih estera. Dolazi do smanjenja unutarstaničnog pH-a što rezultira smanjenjem aktivnosti različitih enzima citosola (9).

Smanjenje unutarstaničnih razina ATP-a uzrokuje disfunkciju Na^+/K^+ i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumpi što vodi do unutarstaničnog nakupljanja Na^+ i Ca^{2+} (3). Koncentracija Ca^{2+} iona u citosolu se održava na niskim razinama (otprilike 0.1 mikromolarni) kad bi se usporedilo s izvanstaničnim razinama (1.3 mmol/l) te je većina unutarstaničnog kalcija smještena u mitohondrijima i ER-u. Unutarstanični Ca^{2+} , čija koncentracija u staničnoj ozljedi raste, aktivira mnoge enzimske sustave – fosfolipaze (membransko oštećenje), endonukleaze (oštećenje DNA), dušikov monooksid-sintaze, proteaze (razgradnja membranskih i citoskeletnih proteina), kaspaze koje potiču staničnu smrt itd. (9).

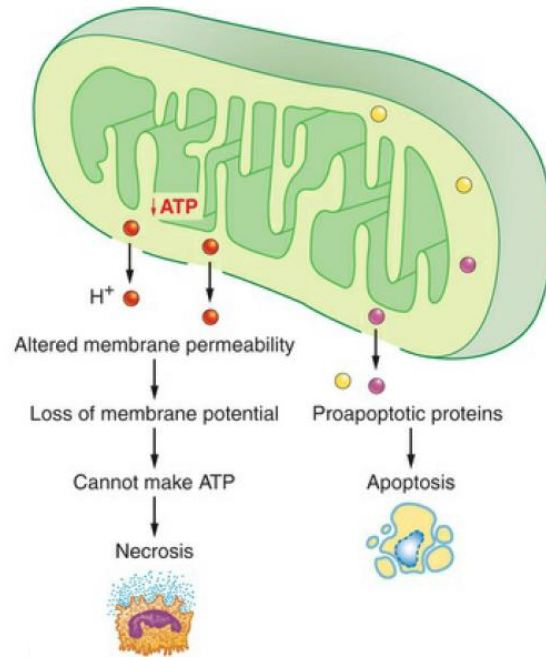
Osim toga, unutarstanično nakupljanje Ca^{2+} uzrokuje i nakupljanje Ca^{2+} u mitohondrijima zbog prijenosa kroz mitohondrijski kalcijski uniporter (*engl.* mitochondrial calcium uniporter, MCU) te rezultira u depolarizaciji mitohondrija i

otvaranju mitohondrijske permeabilizacijske pore (mPTP-a) te posljedično poremećaja u sintezi ATP-a narušavanjem integriteta mitohondrijske membrane tj. elektrokemijskog i pH gradijenta prijeko potrebnog za oksidativnu fosforilaciju. Prilikom ovakvog oštećenja mitohondrija dolazi i do pojačane sinteze ROS-a koji se stvara se za vrijeme reperfuzije, dok je njegova sinteza onemogućena za vrijeme anoksije (8). Pojačana sinteza ROS-a, aktivacija fosfolipaza i proteaza kao i manjak sinteze proteina dovodi do oštećenja staničnih membrana (mitohondrijskih, plazma membrana, lizosomalnih) i citoskeleta (9).

Iz mitohondrija se prilikom oštećenja oslobađaju i proapoptotski faktori (npr. citokrom c) (3).



Slika 5. Posljedice povećavanja unutarstanične koncentracije kalcija (Preuzeto iz: Kathryn L. McCance, Sue E. Huether, 2018.)



Slika 6. Posljedice pada ATP-a (Preuzeto iz: Kathryn L. McCance, Sue E. Huether, 2018.)

Isto tako, depolarizacija i posljedično bubrenje mitohondrija, povećana unutarstanična koncentracija kalcija i oksidacija membrana dovode do nekroze stanice (10). Mitohondriji stoga imaju ulogu i u apoptozi i nekrozi stanice. Za oštećenje mitohondrija je također važna činjenica da mitohondrijska DNA ima višu razinu mutacija i manju mogućnost popravka te zato, biva znatnije oštećena ROS-om (2).

Za vrijeme IR ozljede također dolazi do akumulacije acil-CoA u mitohondrijskom matriksu zbog defektne β -oksidacije. Akumulirani acil-CoA zatim uzrokuje agregaciju i disfunkciju proteina matriksa putem neenzimatske acilacije (11,12). Osim toga, oštećenje respiracijskog lanca uzrokuje manjak NAD^+ . NAD^+ je potreban za sintezu ATP-a kao i sirtuinsku deacilaciju te manjak NAD^+ -a rezultira dodatnim poremećajem bioenergetike i pogoršava stanje uzrokovano nakupljenim acil-CoA (13,14).

Manjak ATP-a u stanici dovodi i do aktivacije zaštitnog mehanizma- odgovora na razmotane proteine. Naime, šaperoni u ER-u kontroliraju pravilno preslagivanje novosintetiziranih polipeptidnih lanaca. U slučaju da se radi o deformiranim proteinima, prebacuju se u citoplazmu gdje bivaju ubikvitirani i, u konačnici, razgrađeni od strane proteasoma. U slučaju da se previše deformiranih proteina nakupi u stanici aktiviraju se kaspaze te proces apoptoze započinje- ovaj proces se naziva stres endoplazmatskog retikuluma. Kako šaperoni za svoju funkciju trebaju ATP, deplecijom ATP-a u stanici dolazi do povećanog nakupljanja deformiranih proteina u stanici.

Uz to, natrij i kalcij su osmotski aktivni i pozitivno nabijeni ioni pa dolazi do osmoze vode u stanicu te staničnog bubrenja kao i izlaska kalijevih iona van stanice zbog prestanka rada natrij/kalij ATP-aze. Ulazak iona i vode u stanicu uzrokuje ranu dilataciju endoplazmatskog retikuluma te ona dovodi do odvajanja ribosoma od endoplazmatskog retikuluma uzrokujući poremećaj u sintezi proteina. Vakuolizacija citoplazme, bubrenje lizosoma i mitohondrija nastaje daljnjom hipoksijom. U konačnici, kaspaze su odgovorne za apoptozu stanice. Kisele hidrolaze iz oštećenih lizosoma se aktiviraju u smanjenom pH ozlijeđene stanice i razgrađuju citoplazmatske i nuklearne komponente (3).

Stanice sisavaca posjeduju određene protektivne odgovore na hipoksijski stres- najbolje definiran je čimbenik potaknut hipoksijom 1 (HIF-1) koji potiče neoangiogenezu, glikolizu i različite putove staničnog preživljenja (9).

4.2. Reperfuzijska ozljeda

4.2.1. Definicija reperfuzijske ozljede

Reperfuzija ishemičnog tkiva može dovesti do oporavka stanica u slučaju reverzibilne ozljede, međutim, ako su stanice ireverzibilno ozlijeđene reperfuzija može dovesti do stanične smrti. Ova dinamika iznimno je bitna u reperfuziji ozlijeđenih područja u mozgu i srcu nakon terapijskih postupaka. Postoji više teorija o uzrocima ishemijsko-reperfuzijske ozljede od kojih je najvjerojatniji odgovor kombinacija više njih- oksidativni stres, dodatno povećavanje unutarstanične koncentracije kalcija i upala (9).

4.2.2. Patogeneza reperfuzijske ozljede

U ozlijeđenim stanicama se reoksigenacijom pojačano sintetizira ROS, a stanični antioksidativni protektivni mehanizmi su oslabljeni zbog ishemije (9). Za vrijeme reperfuzije SDH kreće rapidno reoksidirati akumulirani sukcinat na kompleksu II rezultirajući u značajnoj produkciji ROS-a na kompleksu I zbog reverznog elektronskog transporta (*engl.* reverse electron transport, RET). Ubikvinon i visok membranski potencijal potrebni su za RET. Ubikvinon se akumulira za vrijeme hipoksije ili ishemije, a visok membranski potencijal na mitohondriju uspostavlja se pumpanjem protona od strane kompleksa III i IV unutar prvih par sekundi reoksigenacije. Manjak ubikviona „tjera“ elektrone u proces RET-a te na FMN i u konačnici rezultira u značajnoj sintezi ROS-a (5,6,15).

Važnu ulogu pri sintezi ROS-a ima ksantinska dehidrogenaza, enzim koji u normalnim uvjetima koristi oksidirani NAD⁺ kao akceptor elektrona, međutim, u uvjetima reperfuzije konvertira se u ksantinsku oksidazu. Prilikom ishemije velike količine ATP-a koje se troše dovode do porasta koncentracije purinskih katabolita- hipoksantina i ksantina, koji se prilikom reperfuzije (i posljedično pojačane oksigenacije tkiva) metaboliziraju ksantinskom oksidazom do superoksida i peroksida (3). Osim ksantinske oksidaze, smatra se da oštećeni kompleksi I i III respiratornog lanca predstavljaju jedan od glavnih izvora ROS-a (16,17,18,19). Uz to, reperfuzijom ozlijeđenog područja dodatno se povećava unutarstanična koncentracija kalcija što ponovno dovodi do aktivacije različitih enzima i otvaranja mPTP-a.

Osim toga, ishemično područje je nekrotično, a reperfuzijom se omogućava dolazak upalnih stanica koje zatim dodatno oštećuju tkivo. Također je dokazano da se IgM protutijela pojačano talože u ishemična tkiva te se, posljedično, nakon reperfuzije

proteini komplementa mogu vezati na istaložena protutijela što bi dovelo do aktivacije komplementa i pogoršavanja upale i ozljede tkiva (9).

4.3. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda miokarda

Srce, kao organ s najvećim udjelom mitohondrija (35% volumena) i organ koji 90% ATP-a dobije oksidativnom fosforilacijom, najosjetljiviji je na IR ozljedu (3). Povrat krvnog protoka i reoksigenacija tkiva može uzrokovati i do 50% IR ozljede zbog mehanizama navedenih gore (20). Postoje i dodatni mehanizmi koji mogu pridonositi IR ozljedi u miokardu- disfunkcija endotelnih stanica, gubitak NO-om posredovane vazodilatacije, pojačana agregacija trombocita, itd.

U kliničkoj praksi, angioplastika pomoću balona putem perkutane koronarne intervencije (engl. percutaneous coronary intervention, PCI) je najbolja dostupna terapija te se temelji na ponovnom uspostavljanju krvnog protoka u prethodno opstruiranoj krvnoj žili ograničavajući ishemijsku ozljedu. Osim toga, miokardijalna reperfuzija može se postići anitagregacijskom ili antitrombocitnom terapijom te operativno, postavljanjem premosnice. Daljnja farmakološka terapija, kao što su β -blokatori ili inhibitori renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS), dodatno poboljšavaju srčanu funkciju nakon infarkta miokarda. Unatoč tome što reperfuzija pridonosi staničnoj ozljedi, reperfuzija obavljena na vrijeme je, zasad, jedina terapijska metoda koja učinkovito smanjuje veličinu infarkta. Danas ne postoji terapijska metoda koja bi spriječila ili umanjila reperfuzijsku ozljedu (21). Bolje razumijevanje molekularnih mehanizama IR ozljede je potrebno kako bi se razvile nove terapije.

5. Proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva

5.1. Reaktivni kisikovi spojevi

5.1.1. Definicija

Reaktivni kisikovi spojevi uključuju slobodnih radikala i visoko reaktivne molekule kisika, kao što su superoksidni radikal, hidroksilni radikal, vodikov peroksid (nije slobodni radikal), peroksinitritni radikal, itd. Slobodni radikali su spojevi koji imaju nespareni elektron u svojoj valentnoj orbiti što ih čini iznimno reaktivnima.

5.1.2. Vrste reaktivnih kisikovih spojeva

Prilikom oksidacijsko-redukcijskih reakcija za vrijeme normalnog staničnog metabolizma primanjem samo jednog elektrona na O₂ (nepotpuna redukcija) može nastati **superoksidni anion** (O₂⁻). Osim toga, superoksidni anion može se formirati kad se reducirani flavini reoksidiraju.



Slika 7. Reoksidacija reduciranih flavina (Preuzeto iz: Robert K. Murray i sur., 2011.)

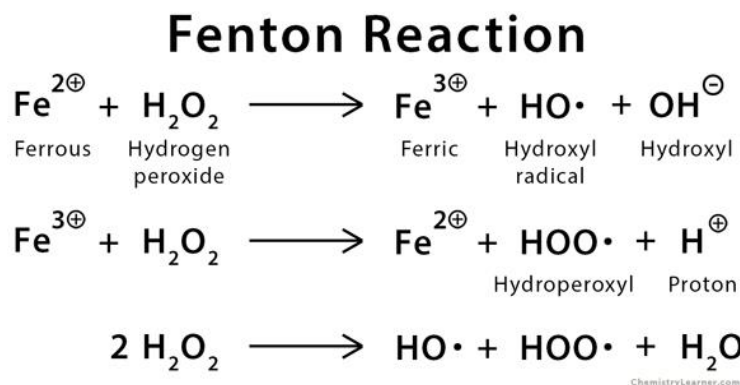
Anion se, u aerobnih organizama, razgrađuje na kisik i vodikov peroksid od strane enzima superoksid dismutaze (*engl.* superoxide dismutase, SOD) (2). Enzim se nalazi u citosolu (bakar-cink SOD) i u mitohondrijima (mangan SOD) (9).

Vodikov peroksid može se formirati ako kisik prilikom oksidacijsko-redukcijskih reakcija prihvati dva elektrona te se također formira djelovanjem superoksid dismutaze i oksidaza u peroksisomima (2). Patološki učinak vodikovog peroksida se može očitovati i se u njegovoj konverziji u hidroksid (OH⁻) i hipoklorit (ClO⁻) koji zatim dalje oštećuju stanice (9). Hidroperoksidaze su enzimi koje koriste vodikov peroksid ili organski peroksid kao supstrat te se među njima razlikuju dvije podskupine-peroksidaze i katalaze. Katalaza je enzim koji katalizira reakciju razgradnje vodikovog peroksida na vodu i kisik. Ovaj enzim nalazi se u peroksisomima mnogih tkiva kao što su koštana srž, krv, sluznice, jetra i bubrezi. Peroksidaze su enzimi koji se nalaze u mlijeku, leukocitima, trombocitima, itd. te kataliziraju reakciju u kojoj se vodikov peroksid reducira pomoću molekule elektron akceptora (askorbat, citokrom c, kinoni) u vodu. Enzim glutation peroksidaza, koji sadržava selen kao prostetičnu skupinu, katalizira razgradnju peroksida i lipidnih peroksida pomoću oksidiranja glutationa (reducirani glutation, GH; oksidirani glutation GSSG). Time štiti membranske lipide i hemoglobin u eritrocitima od oksidacije (2).

Hidroksil radikal ([•]OH) također može nastati u poremećaju oksidacijsko-redukcijskih procesa u stanici u trenutku kad kisik primi 3 elektrona. Osim toga, taj ROS nastaje hidrolizom vode (npr. uzrokovanom radijacijom), iz vodikovog peroksida Fentonovom reakcijom ili iz O₂⁻. Iznimno je reaktivan te je glavni ROS odgovoran za oštećenje lipida, proteina i DNA. U Fentonovoj reakciji dolazi do oksidacije organskih supstrata

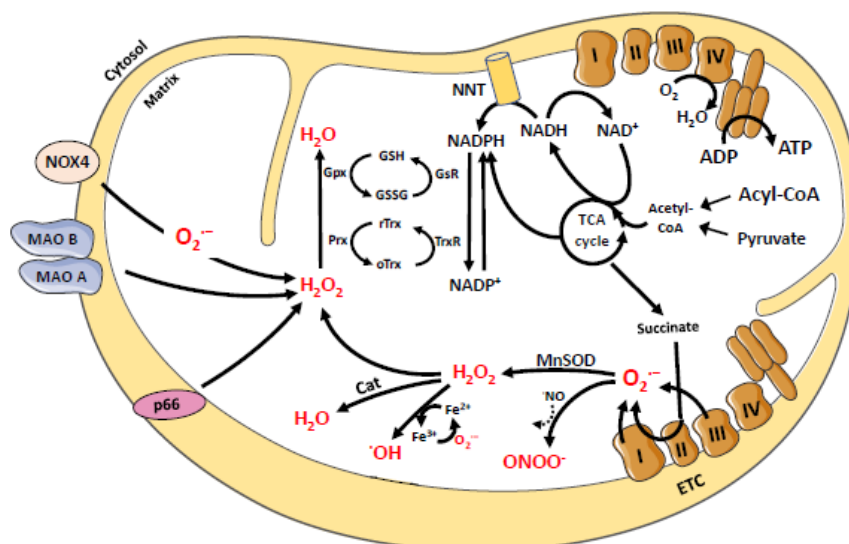
željezom (Fe^{2+}) i vodikovim peroksidom pri čemu će se stvarati slobodni radikali (primjerice hidroksil radikal)(9).

Slika 8. Fentonova reakcija (Preuzeto s: [Fenton Reaction: Definition and Reagent](#))



(chemistrylearner.com)

Peroksinitritni anion (ONOO^-) nastaje interakcijom superoksida i NO-a sintetiziranim od strane NO sintaze u različitim tkivima kao što su endotelne stanice, leukociti, neuroni itd. (9). NO se još može konvertirati i u NO_2^- i NO_3^- (3). Kako je NO koncentracija povećana za vrijeme ishemije i nenabijena je molekula, lagano difundira u stanicu te sudjeluje u različitim reakcijama (8). Kao ROS oštećuje lipide, proteine i DNA te se inaktivira konverzijom u dušikastu kiselinu (HNO_2) od strane peroksiredoksina koji se nalaze u citosolu i mitohondrijima (9). ONOO^- ima vrlo kratak poluživot te, ako je stvoren u mitohondrijima, oksidira molekule koje se nalaze u njegovoj blizini. ONOO^- u mitohondrijima može inaktivirati SOD putem nitracije i oksidacije tirozinskih ostataka (22). Postoje određene studije koje pokazuju kako inhibicija ONOO^- sinteze u stanicama izloženim IR ozljedi poboljšava njihovo preživljenje (23). Uz samo djelovanje na SOD, postoje i druge studije u kojima je dokazan širok spektar djelovanja ONOO^- na više mitohondrijskih proteina (npr. 24 i 30kDA podjedinice kompleksa I, Rieske protein kompleksa III itd.) (24).



Slika 9. Izvori ROS-a u srcu (Preuzeto iz: Heiko Bugger, Katharina Pfeil, 2020.)

Različiti enzimi koji razgrađuju slobodne radikale imaju protektivan učinak u stanici. Osim toga, antioksidansi (vitamin E, A, askorbinska kiselina, glutation) su tvari koje također imaju protektivni učinak blokirajući formaciju slobodnih radikala ili inaktivirajući slobodne radikale.

Uz to, slobodno željezo i bakar kataliziraju reakcije formacije ROS-a, a u fiziološkim uvjetima taj je učinak minimaliziran djelovanjem njihovih skladišnih i transportnih proteina (transferin, feritin, laktoferin, ceruleoplazmin) (9).

5.2. Fiziološki uvjeti

5.2.1. Sinteza u fiziološkim uvjetima

ROS se proizvodi u stanici i u fiziološkim uvjetima. Najviše se proizvodi u mitohondrijima na respiratornom lancu, zatim u ER-u (posebno za vrijeme stresa endoplazmatskog retikuluma) i peroksisomima (β -oksidacijom dugolančanih masnih kiselina) te putem NADPH oksidaze i drugih enzima (lipooksigenaza, ksantinskih oksidaza, ciklooksigenaza, NO sintaza, citokrom p450 monooksigenaza, itd.) (3).

Na respiratornom lancu, kompleksi I (na FMN prostetičnoj skupini) i III (na mjestu gdje je ubisemikinon vezan na Qo mjesto kompleksa) smatraju se najvećim proizvođačima mitohondrijskih superoksidnih radikala koji se mogu zatim konvertirati u vodikov peroksid djelovanjem mitohondrijske superoksid dismutaze (16,17,18,19).

Reverzni elektronski transport također predstavlja jedan od izvora ROS-a u stanici. Reverzni transport elektrona na kompleksu I može nastati u fiziološkim uvjetima kad se koenzim Q prekomjerno reducira što rezultira u sintezi superoksidnog aniona (15). Elektroni u RET mogu ući i putem kompleksa II te potencijalno glicerol-3-fosfat dehidrogenaze, elektron-prijenosnog flavoproteina ili dihidroorotat dehidrogenaze. Inhibicija oksidativne fosforilacije na kompleksima III i IV također može stvoriti uvjete za sintezu ROS-a putem RET-a kao i preran prijelaz elektrona na kisik s enzima respiratornog lanca. U mitohondriju je pronađeno ukupno 11 mjesta koja proizvode ROS (25).

5.2.2. Fiziološka uloga

ROS ima važnu ulogu u reverzibilnom modificiranju unutarstaničnih signalnih puteva, primjerice oksidirajući tiolne skupine na proteinskim cisteinskim ostatcima. Zbog permeabilnosti membrana za ROS, ovi spojevi utječu i na mitohondrijske signalne puteve (26). Utječu i na proteinsku ekspresiju, posttranslacijske modifikacije i promjene proteinske stabilnosti što rezultira u smanjenoj/povećanoj aktivnosti proteina, regulaciji stabilnosti proteina, promjeni lokacije proteina kao i promjene protein-protein interakcija. Također imaju važnu ulogu u staničnom starenju, ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi i uklanjanju mikroorganizama putem fagocita (3).

Niske razine ROS-a održavaju normalni odgovor imunskog sustava dok povećane razine ROS-a vode do autoimunosti. Blago povišene razine ROS-a mogu čak djelovati pozitivno na životni vijek stanice putem različitih signalizacijskih puteva, međutim, visoke razine vode do prekomjerne aktivacije signalnih puteva što posljedično može dovesti do upale, karcinoma, stanične smrti i ubrzanog starenja.

Uloga ROS-a u procesima signalizacije predstavlja jedno od značajnijih područja istraživanja modernog vremena, uključujući istraživanje antioksidacijske terapije za prevenciju patoloških učinaka ROS-a (3).

5.3. Patološki uvjeti

5.3.1. Patofiziološka uloga

Pojačana sinteza ROS-a se može javiti prilikom apsorpcije zračenja (hidroliza vode), poremećaja u oksidacijsko-redukcijskim procesima stanice (superoksidni anion,

peroksid, hidroksil radikal), metaboliziranja različitih egzogenih kemikalija ili lijekova (npr. slobodni radikal CCl_3 nastao iz CCl_4), reakcijama kataliziranim od strane tranzicijskih metala itd. (1). Pojačana proizvodnja ROS-a ili poremećaj u njihovom uklanjanju dovodi do njihove akumulacije što se naziva oksidativnim stresom (2). Mitohondriji imaju ključnu ulogu pri sintezi ROS-a u IR ozljedi.

Ishemija uzrokuje mitohondrijske promjene koje pogoduju sintezi ROS-a za vrijeme reperfuzije. Za vrijeme ishemije se također može sintetizirati ROS zbog dostupnosti kisika u ranoj ishemiji jer citokrom c oksidaza ne može rapidno iskoristiti sav kisik (27). Međutim, za vrijeme anoksije proizvodnja ROS-a staje.

5.3.2. Respiratorni lanac

Konformacija kompleksa I se u ishemiji mijenja te se time kompleks deaktivira pa je, posljedično, respiratorni lanac blokiran u oba smjera (28,29). Isto tako je onemogućena i sinteza ROS-a (15,29). Za vrijeme ishemije aktivnost kompleksa III i IV može također biti smanjena. Disfunkcija kompleksa IV je uzrokovana manjkom kardiolipina više nego konformacijskim promjenama (30,31). S druge strane, kompleks II pokazuje rezistentnost na ishemiju.

Za vrijeme ishemije mitohondriji paralelno gube i kardiolipin i citokrom c. Citokrom c se veže za kardiolipin što objašnjava njihov paralelan gubitak (33), međutim postoje kontradiktorni podaci o tome gubi li se citokrom c i putem pro-apoptotske signalizacije i otvaranja mPTP-a (34). Smatra se da je gubitak kardiolipina (u razini od 28-50% u IR ozljedi) uzrokovan lipidnom peroksidacijom.

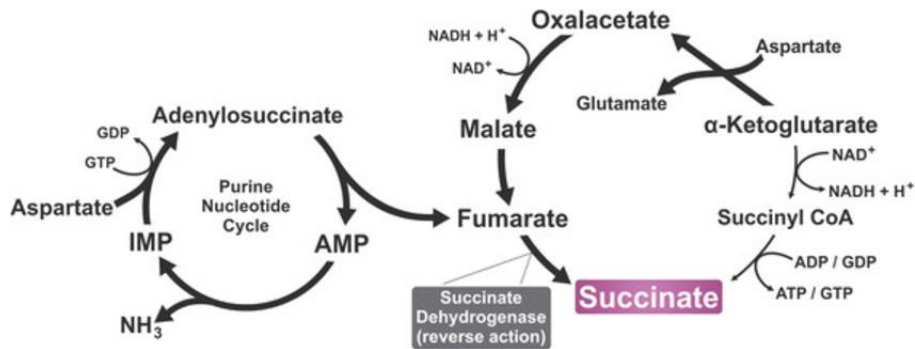
Za vrijeme reperfuzije kisik i drugi energetske supstrati postaju dostupni te se mitohondriji ponovno energiziraju. Promjene nastale za vrijeme ishemije, kao što su gubitak kardiolipina i citokroma c, ne samo da ostaju za vrijeme reperfuzije, već se mogu i pogoršati (30). Nakupljanje NADH-a u stanici, uzrokovano oštećenjem respiratornog lanca ili niskom potrebom za ATP-om, uzrokuje redukciju kompleksa respiratornog lanca što olakšava elektronima da „skliznu“ s respiratornog lanca formirajući superoksidne radikale (30).

Kroz nekoliko eksperimenata, gdje je kompleks I bio inhibiran, stanica se štitila od prekomjerne produkcije ROS-a, te je time dokazano da je kompleks I jedno od glavnih mjesta sinteze superoksidnog radikala pri reperfuziji, ali točno mjesto formiranja

superoksidnog aniona na kompleksu I u ovim uvjetima još uvijek nije otkriveno. Manje količine ROS-a se mogu sintetizirati na kompleksu III. Gubitak kardiolipina također uzrokuje disfunkciju kompleksa respiratornog lanca (kompleks I/III/IV) te pogoduje poremećaju funkcije respiratornog lanca i dodatne sinteze ROS-a (30).

Najefektivniji način dobivanja superoksidnog radikala u izoliranim mitohondrijima jest **sukcinatna oksidacija**. U nekoliko studija dokazano je pojačano nakupljanje sukcinata u ishemiji (3-19 puta) (5). Podaci iz jedne studije, govore o mitohondrijskoj sintezi ROS za vrijeme prvih par sekundi i minuta reperfuzije. Naime, dokazano je kako sukcinat dehidrogenaza može imati reverzno djelovanje za vrijeme ishemije, konvertirajući fumarat u sukcinat i time omogućavajući nakupljanje sukcinata. S druge strane, za vrijeme reperfuzije SDH poprima svoju izvornu funkciju te će brza oksidacija sukcinata u fumarat rezultirati u prekomjernoj redukciji koenzima Q na kompleksu II što može uzrokovati vraćanje elektrona na transportnom lancu (vraćanje s kompleksa II na FMN dio kompleksa I). Unutarnja mitohondrijska membrana za proces reverznog prijenosa elektrona mora imati određen potencijal što govori da stupanj oštećenja mitohondrijske membrane ROS-om i otvaranje mPTP-a utječu na količinu ROS-a sintetiziranih za vrijeme RET-a (15).

Smatra se kako je nakupljanje fumarata u citosolu za vrijeme ishemije uzrokovano nakupljanjem AMP-a koji se pak dobiva u purinskom nukleotidnom ciklusu i/ili konverzijom aspartata u oksaloacetat. U oba se slučaja dobiveni fumarat transportira u mitohondrij uz pomoć dikarboksilatnog nosača koji zauzvrat izbacuje molekulu sukcinata (5, 15). Novija istraživanja nadograđuju ovu teoriju otkrivajući druge izvore sukcinata za vrijeme ishemije- maleni dio koji dolazi od aspartata i konverzije piruvata i glutamata u α -ketoglutarat te najveći udio sukcinata stvoren u Krebsovom ciklusu (35). Smatra se da i sukcinat i inicijalna sinteza ROS-a u RET-u pri početku reperfuzije te njihovo oštećenje mitohondrija mogu pridonijeti daljnjoj mitohondrijskoj sintezi ROS-a.



Slika 10. Formiranje sukcinata za vrijeme ishemije/reperfuzije (Preuzeto iz: Matheus de Castro Fonseca, Joao Antonio da Rocha Franco, Rafael N. Gingold, M. Fatima Leite i sur., 2016.)

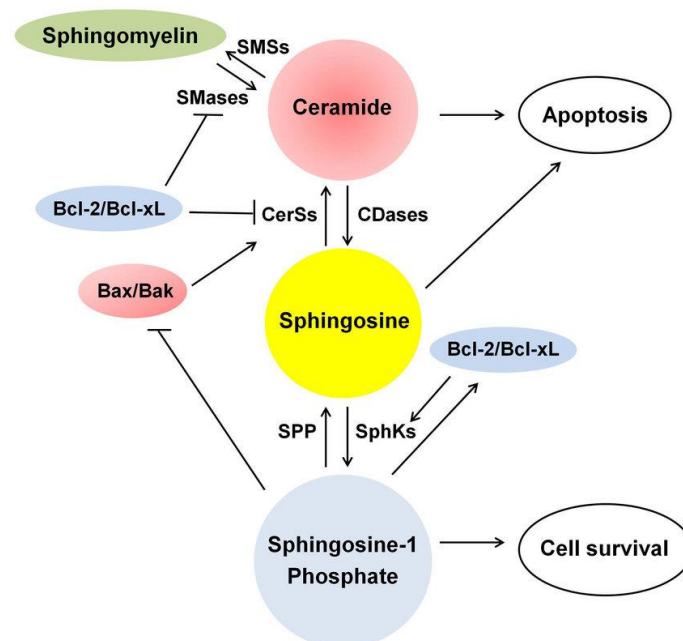
Otkriveno je da u kardiomiocitima i nekim drugim stanicama postoji bifazična reakcija pri sintezi ROS-a: postupno povećanje mitohondrijske koncentracije ROS-ova koje je popraćeno s naglim povećanjem mitohondrijske koncentracije ROS-ova. Nagli skok može biti induciran od strane citosolnog ROS-a te se ta reakcija naziva ROS-potaknuto oslobađanje ROS-a (*engl.* ROS-induced ROS release, RIRR) (36). Ovaj fenomen je uvijek bio paralelan s povisivanjem koncentracije mitohondrijskog Ca^{2+} i značajnom depolarizacijom (dramatični pad $\Delta\Psi\text{m}$) ovih organela (36).

Osim toga, zbog međusobne blizine mitohondrija u kardiomiocitima, depolarizacija membranskog potencijala jednog mitohondrija i povećavanje ROS-ova u jednom mitohondriju može aktivirati te iste procese i u drugim, susjednim, mitohondrijima. Smatra se da je ovaj proces posredovan otvaranjem anionskog kanala unutarnje membrane (*engl.* inner membrane anion channel, IMAC) pri blagom padu membranskog potencijala te otvaranjem mPTP-a pri znatnijem padu membranskog potencijala. Prema nekim hipotezama otvaranje IMAC-a prethodi otvaranju mPTP-a, dok neki znanstvenici smatraju kako je otvaranje mPTP-a jedini proces u RIRR-u (36). Važno je napomenuti da je RIRR uvijek povezan s padom membranskog potencijala, dok sinteza ROS-a putem RET-a zahtijeva određen membranski potencijal što ih čini potencijalno međusobno isključujućim procesima. Zbog toga se smatra kako bi RIRR mogao biti posljedica sinteze ROS-a u RET-u, iako je dokazano da se oba procesa mogu odvijati istovremeno u srcu izloženom ishemiji i reperfuziji ovisno o težini ishemije. Mitohondrijski oksidativni stres posebno se pojačava za vrijeme reperfuzije dok je za vrijeme ishemije u kardiomiocita blag.

5.3.3. Ostali izvori

Za sintezu ROS-a za vrijeme IR ozljede mogu biti zaslužni i drugi mehanizmi. **Monoaminooksidaze** (*engl.* monoaminoxidase, MAO-A i MAO-B) su flavoproteini koji se nalaze na vanjskoj mitohondrijskoj membrani i u fiziološkim uvjetima, oksidativnom deaminacijom neurotransmitera i drugih amina sintetiziraju vodikov peroksid. Obje molekule mogu se naći u ljudskom miokardu. Aktivnost MAO-A povećana je za vrijeme IR ozljede što rezultira u povećanoj koncentraciji vodikovog peroksida (37). U studijama provedenim na srcima miševa i štakora, farmakološka inhibicija MAO-A smanjila je veličinu srčanog infarkta, razinu peroksidacije lipida te stanične smrti nakon ligacije lijeve prednje silazne koronarne arterije (*engl.* left anterior descending, LAD) (38).

Osim toga, druga studija dokazala je da ROS-sintetiziran djelovanjem MAO-a potiče inhibiciju **s핑ozin kinaze**, razgradnju s핑ozin-1-fosfata (S1P) i akumulaciju ceramida u kardiomiocitima za vrijeme IR ozljede (39). S druge strane, prekomjerna izraženost s핑ozin kinaze smanjivala je razine ceramida, time što se poticala sinteza S1P iz ceramida, i znatno inhibirala ROS-posredovanu, serotonin-induciranu apoptozu u H9C2 kardiomioblastima (40). Autori studije predložili su da je sinteza ROS-a putem endogene MAO-A potrebna za regulaciju ravnoteže između ceramida i S1P, bilo pomičući omjer u korist ceramidom poticane apoptoze ili S1P sinteze i preživljenja stanice.



Slika 11. Apoptoza inducirana ceramidima (Preuzeto iz Norishi Ueda, 2015.)

Aktivacija sfingozin kinaze zato ostaje jedna od potencijalnih terapijskih metoda kako bi se smanjila IR ozljeda.

Dokazano je i da **protein p66shc** ima ulogu u sintezi ROS-a. Ovaj protein je izoforma adapterskog proteina ShcA, i regulira apoptozu, sintezu ROS-a i mitohondrijsku funkciju. U srcu se nalazi u citoplazmi, ER-u i intermembranskom prostoru mitohondrija te u mitohondriju oksidira citokrom c pri tome djelomično reducirajući kisik do vodikovog peroksida. Dokazana je i poveznica između otvaranja mPTP-a i p66shca. Naime, aktivan (aktiviran proapoptotskim signalima) p66shc može oksidirati reducirani citokrom c i katalizirati redukciju kisika u vodikov peroksid. Vodikov peroksid zatim dovodi do otvaranja mPTP-a. Osim sinteze ROS-a, ovaj spoj može inhibirati transkripciju antioksidansa (41).

NADPH oksidaza 4 (NOX4) također je važan spoj pri sintezi ROS-a. NADPH oksidaze su porodica enzima vezanih na membranu kojima se podjedinice mogu, uz dovoljno kisika, spojiti u funkcionalnu jedinicu te sintetizirati superoksidni radikal. U ljudi je identificirano sedam izoformi od kojih se NOX4 nalazi na vanjskoj membrani mitohondrija. U pokusima s miševima koji su imali deleciju NOX2 ili NOX4 gena, IR ozljeda bila je manja (42). U istoj su studiji znanstvenici dokazali da je u NOX4 nokaut miševa koncentracija ROS-a znatno manja, kao i veličina ozlijeđenog područja nakon ishemije i reperfuzije.

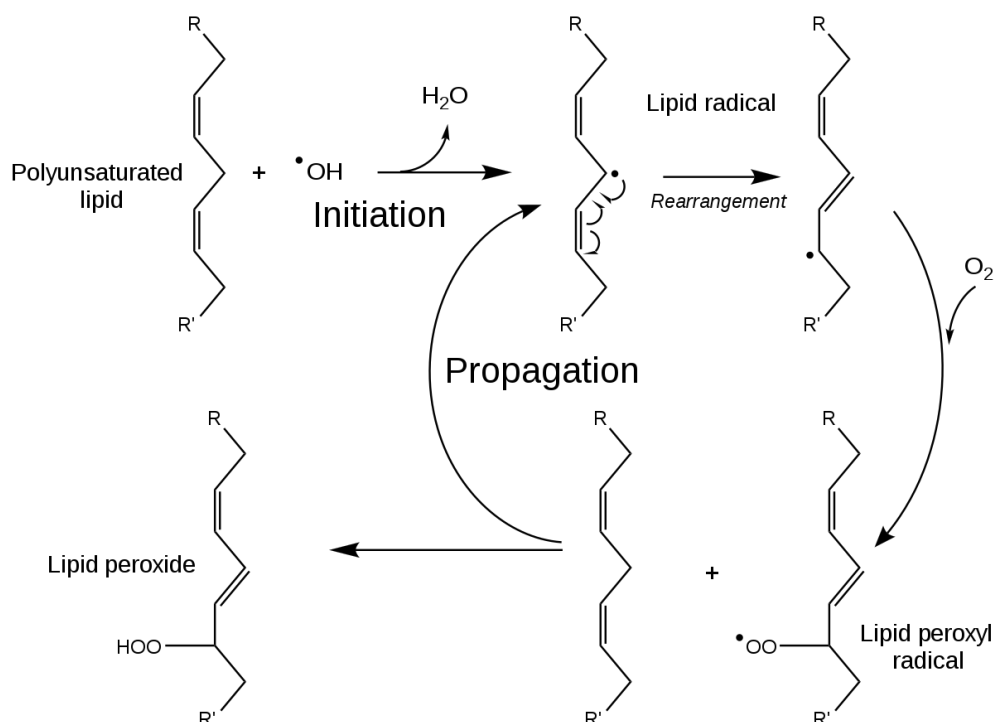
5.4. Poremećaj zaštitnog sustava stanice

Eliminacija ROS-a uz pomoć glutation peroksidaza (*engl.* glutathione peroxidase, Gpx) i peroksiredoksin/tioreredoksin (*engl.* peroxiredoxine/thioredoxine, Prx/Trx) sustava ovisi o visokom NADPH/NADP⁺ omjeru kako bi se osigurao njihov optimalni rad. NADH može prenositi elektrone u respiratorni lanac, time povećavajući mogućnost ROS sinteze ili se konvertirati u NADPH djelovanjem nikotinamid nukleotid transhidrogenaze (NNT). Za vrijeme ishemije mitohondrijska razina NADPH je smanjena te se reperfuzijom vraća u bazalno stanje, dok je količina NADH povećana što remeti ravnotežu onemogućavajući efektivnu eliminaciju ROS-a. Dokazano je da je u srcima miševa s delecijom TrxR2 veće stanično oštećenje. Međutim, očuvanje stanične funkcije bilo je omogućeno korištenjem eliminacijskog sustava ROS-a ili blokadom otvaranja mPTP-a. Uz to, miševi s delecijom Gpx1 su isto imali veće

stanično oštećenje (43). Poremećaj funkcije MnSOD-a također može imati značaj u mitohondrijskom oksidativnom stresu. Više istraživanja dokazalo je kako je aktivnost MnSOD-a smanjena za vrijeme IR ozljede te da njezin oporavak djeluje protektivno na stanice (44). Unatoč tome, postoje i određena istraživanja u kojima nije zapažena promjena MnSOD-a (45).

5.5. Patogeneza stanične ozljede

Oksidativni stres oštećuje stanicu na brojne načine – peroksidacija lipida u membranama organela i same stanice, oksidacija aminokiselina u proteinskim lancima, promjene strukture DNA. Oksidacijsko oštećenje kod lipida započinje s formiranjem duplih veza u nezasićenim masnim kiselinama pri čemu će se oslobađati peroksidi koji zatim potiču autokatalitičku lančanu reakciju (9).



Slika 12. Lipidna peroksidacija (Preuzeto iz: [Lipid peroxidation - Wikipedia](#))

Taj učinak je posebno važan za strukturu mitohondrijske membrane i spojeve kao što su kardiolipin. Oksidativno oštećenje mitohondrijske membrane dodatno pogoršava deficit ATP-a amplificirajući svoj učinak (8). ROS oštećuje proteinske strukture, aktivna mjesta enzima, potiču njihovo razlaganje putem proteasoma. U DNA s druge strane potiču pucanje (jedno- i dvolančano) DNA lanca, križno povezivanje DNA i formiranje aduktora. Osim toga, ROS može poticati

mitohondrijsku fisiju kao još jedan način autoamplificirajućeg učinka. ROS može potaknuti staničnu ozljedu i smrt, nekrozu, ali isto tako i apoptozu (9).

6. Funkcionalne i strukturne promjene mitohondrija za vrijeme ishemije i reperfuzije

6.1. Otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pore

6.1.1. Uzroci otvaranja mitohondrijske permeabilizacijske pore

Oštećenje mitohondrija uzrokuje staničnu ozljedu i/ili smrt na više načina: smanjivanjem sinteze ATP-a, povećanom proizvodnjom ROS-a te oslobađanjem proapoptotskih faktora. (92, 93, 94, 95) Povećavanje unutarstanične i mitohondrijske koncentracije (putem djelovanja mitohondrijskog kalcijskog uniportera) Ca^{2+} stimulira otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pora (mPTP). Uz kalcij, pora se još može otvoriti i zbog visoke koncentracije NADH, smanjivanja koncentracije adeninskih nukleotida, gubitka membranskog potencijala i povećane koncentracije ROS-a (34).

Sva ova stanja događaju se za vrijeme ishemije te su samo još više izražena pri reperfuzijskoj ozljedi. Dapače, nizak pH, uvjetovan anaerobnim metabolizmom, za vrijeme ishemije inhibira otvaranje mPTP-a, dok dodatno povećavanje koncentracije kalcija, sinteza ROS-a i stabilizacija pH za vrijeme reperfuzije potiču otvaranje iste (8).

6.1.2. Građa mitohondrijske permeabilizacijske pore

Patch clamp studije na mitoplastima dokazale su da je mPTP neselektivni ionski kanal lokalizirani na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani (96). Molekularni identitet mPTP-a još nije u potpunosti jasan. Neke studije pokazuju da su anionski kanali ovisni o naponu (*engl.* voltage-dependent anion channels, VDACs) i adenin nukleotid translokaza (*engl.* adenine nucleotide translocator, ANT) glavne komponente PTP kompleksa. Međutim, od 2004., nekoliko studija je dokazalo, koristeći genetsku manipulaciju u stanicama miševa, da se mPTP može otvoriti i u manjku VDAC-a i ANT-a te zastupaju mišljenje da ti proteini ipak nisu dio mPTP kompleksa već da imaju regulatornu ulogu u formiranju pore (46,47). Neke studije također zagovaraju da je ATP-sintaza ključan dio pore kao i ciklofilin D koji se na nju veže (8).

mPTP omogućuje slobodno kretanje molekula manjih od <1.5 kDa i iona preko unutarnje mitohondrijske membrane što rezultira u povećanju koloidno-osmotskog

tlaka u matriksu mitohondrija. Osmozom vode u matriks dolazi do bubrenja mitohondrija te aktivacije proteaza i lipaza koje vode do stanične smrti. Bubrenje mitohondrija uzrokuje pad membranskog potencijala (depolarizaciju), rasprezanje respiratornog lanca (*engl.* uncoupling), reverzno djelovanje ATP-sintaze s hidrolizom ATP-a, oslobađanje NAD^+ i Ca^{2+} u citosol, dodatnu sintezu ROS-a i, u konačnici, rupturu vanjske mitohondrijske membrane s oslobađanjem različitih proapoptotskih faktora kao što su citokrom c, apoptoza inducirajući čimbenik 1 (*engl.* apoptosis-inducing factor 1, AIF1), endonukleaza G, itd. Stoga se smatra da je ROS istovremeno i uzrok i posljedica otvaranja mPTP-a. Oslobađanje velikih količina Ca^{2+} u kardiomiocitima može izazvati hiperkontrakturu i staničnu smrt (3). Otvaranje mPTP-a promovira staničnu smrt nekrozom, iako vrsta stanične smrti (apoptoza ili nekroza) ovisi o dostupnosti ATP-a (broj mitohondrija u kojima se mPTP otvori).

Ipak, kompleksna veza između smanjenog ATP-a, povećanih ROS-a i Ca^{2+} i stanične ozljede i smrti nije u potpunosti jasna te se smatra kako postoji više mehanizama kojima bi mitohondriji mogli dovesti do stanične smrti, uključujući i različite signalne puteve, koji bi simultano dovodili do istog ishoda.

6.2. Mitohondriji u fiziološkom stanju

6.2.1. Položaj mitohondrija

Stanična funkcija, unutarstanična organizacija i raspored kao i morfolgija mitohondrija često su definirani specifičnom unutrašnjom strukturom stanice kao i mitohondrijskom komunikacijom sa sarkoplazmatskim retikulumom i drugim elementima citoskeleta npr. tubulinom β i specifičnim izoformama plektina (48).

Komunikacija između mitohondrija i elemenata citoskeleta (tubulin i plektin) može se temeljiti na njihovoj strukturalnoj povezanosti putem mitohondrijskih VDAC-a. Pomoću njih tubulin i plektin mogu reagirati s vanjskom mitohondrijskom membranom i njezinom permeabilnošću za ADP i druge metabolite. Moguće je da i drugi citoskeletni proteini (npr. dezmin i vimentin) mogu biti uključeni u ovaj proces (49). Najnovija istraživanja pokazuju da izoforma tubulina- tubulin β II i plektin 1b izoforma mogu regulirati energetske metabolizam stanice putem VDAC-a, mitohondrijske kreatin kinaze (mitCK) i ANT-a (8).

6.2.2. Mitochondrijska dinamika

Mitochondrijska fuzija i fisija zajedno s mitofagijom (uklanjanje defektnih mitohondrija) te mitohondrijskim obrtajem (*engl.* turnover) važne su komponente kontrole kvalitete mitohondrija. Mehanizam uklanjanja defektnih mitohondrija većinom se temelji na njihovom niskom $\Delta\Psi_m$.

Manji i raštrkaniji mitohondriji stvaraju se u procesu fisije, dok se u procesu fuzije stvaraju međusobno povezane mitohondrijske mreže kako bi se olakšala njihova komunikacija s ER-om, omogućila difuzija matriksa među mitohondrijima razrjeđujući time akumulirane mitohondrijske DNA mutacije, oksidirane proteine itd. U fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između fisije i fuzije ovisno o energetskej potrebi stanice, staničnom dijeljenju i stadiju mitohondrijskog ciklusa života (8).

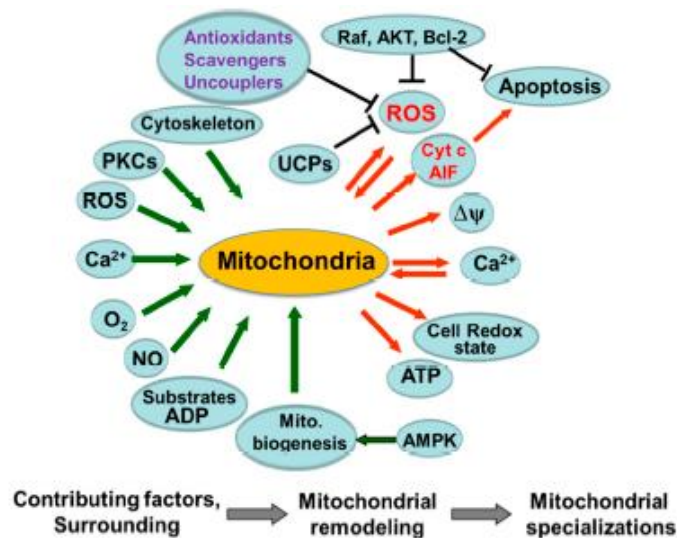
U slučajevima kad se u stanicama javlja manjak ATP-a, mitohondrijise međusobno povezuju kako bi formirali veće mitohondrije i mogli proizvoditi više ATP-a. U suprotnoj situaciji (stanje s viškom ATP-a), mitohondriji se razdvajaju na manje mitohondrije tj. prolaze fisiju. Za vrijeme dijeljenja mitohondrija na manje fragmente, moguć je nastanak patoloških fragmenata koji se zatim uklanjaju mitofagijom (50). Jedan od glavnih regulatornih proteina fisije je GTPaza dinaminu srodni protein 1 (*engl.* dinamin-related protein 1, Drp1).

6.2.3. Heterogenost mitohondrija

Važno je napomenuti da mitohondriji koji su smješteni u drugim dijelovima stanice mogu imati drugačiju morfologiju i biokemijska svojstva te u fiziološkim i patološkim uvjetima mogu imati razlike u strukturi i funkciji. Smatra se da heterogenost mitohondrija potječe iz brojnih komunikacija mitohondrija s ostatkom organela stanice.

Mitohondrijska heterogenost dobro je istražena u više vrsta stanica, i to u kardiomiocitima, hepatocitima, endotelnim stanicama umbilikalne vene, astrocitima te različitim stanicama raka (51). Npr. poznato je da kardiomiociti posjeduju nekoliko podskupina mitohondrija – perinuklearne (PNM), intermiofibrilarne (IFM) i subsarkolemalne (SSM) mitohondrije s drugačijim oblicima, funkcijom, apsolutnom veličinom i rasporedom kristi (52). Ti mitohondriji ne samo da mogu imati različita morfološka i biokemijska svojstva, već mogu imati i različitu ulogu u stanici ovisno o regiji u kojoj se nalaze.

Intrinzična heterogenost mitohondrija uključuje postojanje ovakvih subpopulacija koje se razlikuju u morfološkim i biokemijskim svojstvima, najvjerojatnije zbog razlika u metabolizmu i energetske potrebe pojedinih dijelova stanice.



Slika 13. Faktori koji utječu na heterogenost mitohondrija (Preuzeto iz: Kuznetsov AV, Javadov S, Margreiter R, Grimm M, Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ, 2019.)

6.2.4. Stanično signaliziranje i mitohondriji

Mitohondriji aktivno sudjeluju u staničnom signaliziranju te se smatraju integralnim dijelom višestrukih signalnih puteva. Komponenta mitohondrijskog respiratornog lanca, citokrom c, zajedno s drugim proapoptotskim faktorima igra centralnu ulogu pri formiranju apoptosoma i u samoj apoptozi stanice. Oslobođanje citokroma c iz mitohondrija smanjuje mitohondrijsku respiraciju i sintezu ATP-a. Međutim, ATP je prijeko potreban za proces apoptoze.

Mitohondrijska kreatin kinaza (*engl.* mitochondrial creatine kinase, MtCK) je jako osjetljiva na ishemijske promjene zbog povećanja unutarstanične koncentracije anorganskih fosfata (53). Nekoliko studija pokazalo je da mitohondriji formiraju s drugim organelama u stanici, kao što su miofibrile i sarkoplazmatski retikulum, funkcionalne komplekse koje predstavljaju unutarstanične energetske jedinice (54,55). MtCK ima ključnu ulogu u tom sustavu. Analiza mitohondrijske respiratorne funkcije i mtCK sustava, u permeabiliziranim vlaknima različitih mišića (srce, kvadriceps, trbušasti mišić lista), u kreatin kinaza nokaut miševima, pokazala je kako je

mitohondrijsko remodeliranje, kao i sve daljnje posljedice na staničnu signalizaciju, adaptacija na manjak kreatin kinaze (56). Promjene u MtCK sustavu dokazane su u različitim patološkim stanjima kao što su srčano zatajenje, kardiomiopatije i IR ozljeda (53). Osim toga, MtCK može štiti mitohondrije od otvaranja mPTP-a i posljedične depolarizacije. MtCK sustav zbog toga predstavlja jednu od terapijskih meta u IR ozljedi.

6.2.5. Mitofagija

Selektivna autofagija mitohondrija (mitofagija) predstavlja jedan od mehanizama kontrole kvalitete mitohondrija. Smatra se kako mitofagija ima protektivni učinak na stanicu jer je dokazano da poremećaj u mitofagiji vodi do poremećaja u uklanjanju mitohondrija koji su oštećeni IR ozljedom rezultirajući u inhibiciji respiratornog lanca, oksidativnom stresu, otvaranju mPTP-a i mitohondrijskoj apoptozi (57).

Mitohondrijska dinamika regulira mitofagiju (58). Provedene su studije u kojima je ablacija mitofuzina uzrokovala mitohondrijsku fragmentaciju u kardiomiocitima te akumulaciju defektnih mitohondrija u mišjim embrionalnim fibroblastima bez povećanja mitofagije. S druge strane, delecija Drp1 i time poremećena fisija povećala je razinu mitofagije u stanici i uzrokovala gubitak mitohondrija. Uz to je dokazano kako otvaranje mPTP-a može inducirati mitofagiju. Inhibicijom otvaranja mPTP-a u mišjim embrionalnim fibroblastima s manjkom Drp1 smanjena je razina mitofagije (58). Međutim, točna poveznica između mitohondrijske dinamike, mitofagije i mPTP otvaranja još nije otkrivena. Autori studije provedene na mišjim embrionalnim fibroblastima predložili su koncept u kojem bi asimetrična mitohondrijska fisija odvajala zdrave i oštećene komponente mitohondrija, a mitohondrijska fuzija bila način popravka spajajući zdrave komponente (58). U IR ozljedi svaka komponenta kontrole kvalitete mitohondrija može biti promijenjena (mitofagija, fisija, fuzija, mPTP otvaranje) što rezultira u poremećaju funkcije cijelog kompleksa regulacije.

6.3. Mitochondriji u patološkim stanjima

6.3.1. Promjene mitohondrijske heterogenosti

Svi procesi (unutarstanični položaj, morfologija, heterogenost i dinamika mitohondrija) predstavljaju važan dio fiziologije mitohondrija i mogu značajno varirati prilikom različitih patoloških stanja– IR ozljeda, utjecaj ROS-a i apoptoza. Mitohondrijska fragmentacija može biti jedan od prvih znakova indukcije apoptoze (59).

Heterogenost mitohondrijskog redoks stanja, $\Delta\Psi_m$, i Ca^{2+} proučena je u kardiomiocitima pri različitim patološkim stanjima te je dokazano da mitohondrijske subpopulacije mogu različito sudjelovati u IR ozljedi i različitim kardiomiopatijama (51).

Izlaganje stanica, ispunjene indikatorima za $\Delta\Psi_m$ (TMRM) i 2,7-dihidrodiklorofluorescein diacetatom (DCF-DA), laserskoj radijaciji aktivira proizvodnju mitohondrijskog ROS-a. Ona se može detektirati kao značajno povećanje DCF fluorescencije, a značajna depolarizacija mitohondrija može se vidjeti kao pad TMRM fluorescencije (izgled zelenog mitohondrija). Ovaj efekt koristio se u različitim radovima koji demonstriraju heterogenost ROS sinteze u mitohondrijima i $\Delta\Psi_m$ u mitohondrijima višestrukih stanica za vrijeme IR ozljede, oksidativnog stresa i fotooksidativnog stresa (60).

Osim razlika u funkciji mitohondrija, njihovi defekti također nisu međusobno jednaki već ovise o tome i u kojoj su subpopulaciji ti isti mitohondriji (51). Smatra se da razlike u oštećenju mitohondrija mogu biti posljedica heterogene raspodjele kisika, Ca^{2+} i ROS-a u ishemičnoj stanici ili posljedica heterogenosti samog mitohondrija- zbog razlika u redoks stanjima, Ca^{2+} i $\Delta\Psi_m$ među mitohondrijima.

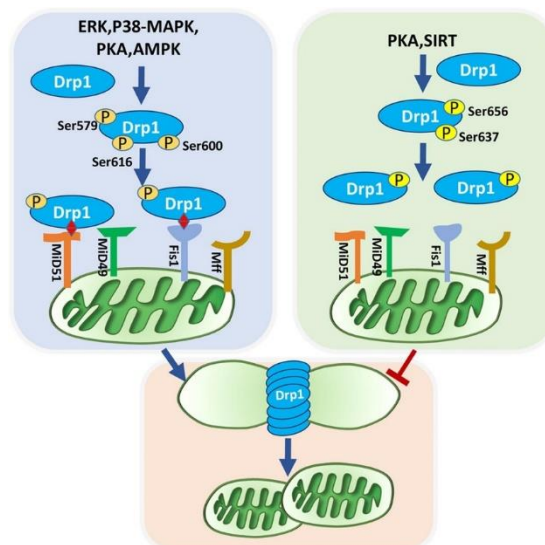
6.3.2. Prekomjerna aktivacija fisije

Brojne studije pokazuju da je poremećaj mitohondrijske dinamike, posebno **hiperaktivacija fisije**, jedan od dominantnih uzroka disfunkcije stanice, npr. kardiomiocita (61).

Dokazano je da ishemija inducira fisiju te mitohondrijsku fragmentaciju (61). Oslobođanje ROS-a i povećavanje koncentracije Ca^{2+} direktno utječe na fisiju djelujući na regulatorni protein fisije, Drp1. Mitohondrijska fragmentacija posredovana Drp-1 povećava razinu ROS-a kao što i ROS uvjetuje mitohondrijsku fragmentaciju posredovanu Drp1 (62).

Drp1 je citosolni protein koji se aktivacijom translocira na vanjsku mitohondrijsku membranu i aktivira proces fisije vežući se za proteine kao što su mitohondrijski fisioni protein 1 (*engl.* mitochondrial fission protein, Fis1), mitohondrijski fisioni čimbenik (*engl.* mitochondrial fission factor, Mff), mitohondrijski elongacijski čimbenik (*engl.* mitochondrial elongation factor, MIEF1) i proteine mitohondrijske dinamike 49 i 51 (*engl.* mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa; MiD49 i MiD51) (63).

Posttranslacijske promjene na Drp1 mogu poticati fisiju ili ju inhibirati. Fosforilacija Drp1 na serinskom 616 ostatku može biti uzrokovana oksidativnim stresom, djelovanjem kinaze ovisne o ciklinima 1 (*engl.* cyclin-dependent kinase, CDK1) i protein kinaze C- δ (*engl.* protein kinase C- δ , PKC δ) te aktivira fisiju, dok ju fosforilacija na serinskom 637 ostatku inhibira. Za vrijeme IR ozljede hipoksija inhibira oksidativnu fosforilaciju te uzrokuje pad mitohondrijskog membranskog potencijala i inducira translokaciju Drp1 na vanjsku mitohondrijsku membranu. Osim toga, za vrijeme IR ozljede, serinski 637 ostatak na Drp1 se defosforilira putem kalcij-ovisne fosfataze kalcineurina (64).



Slika 14. Posttranslacijske promjene Drp1 (Preuzeto iz: Ren L, Chen X, Chen X, Li J, Cheng B, Xia J., 2020.)

SUMOilacije Drp1 smanjivale su IR ozljedom uvjetovanu fisiju, oksidativni stres i staničnu smrt (65). Visoke razine fisije uvjetuju pogoršavanje mitohondrijske funkcije.

Smanjena fuzija za vrijeme IR ozljede također može potpomagati fragmentaciji mitohondrija. Tri proteina na mitohondrijskoj membrani sudjeluju u regulaciji fuzije,. To

su mitofuzin 1 (*engl.* mitofusin-1, Mfn1), mitofuzin 2 (*engl.* mitofusin-2, Mfn2) na vanjskoj membrani i bjelančevina optičke atrofije 1 (*engl.* optic atrophy 1, OPA1) na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani. Studije su pokazale da ROS može djelovati na OPA1 i mitofuzine što dovodi do smanjene fuzije i samim time fisije (66).

Više *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* studija pokazalo je da korištenje Drp1 inhibitora i tvari koje aktiviraju mitohondrijsku fuziju, a inhibiraju fisiju može dovesti do smanjenja ozljede mitohondrija (61).

7. Farmakološki agensi i lijekovi usmjereni na mitohondrije za ublažavanje ishemijsko-reperfuzijske ozljede

IR ozljeda uzrokuje mitohondrijsku disfunkciju kroz povećanje unutarstaničnih i mitohondrijskih koncentracija Ca^{2+} , ROS-a, depolarizacije i otvaranja mPTP-a. Prepoznavanjem i definiranjem različitih mehanizama kojima mitohondriji sudjeluju u patogenezi IR ozljede otvara se novo područje za potencijalnu terapiju ovog patološkog stanja. Danas se proučavaju brojne metode za smanjenje IR ozljede- smanjenje akumulacije sukcinata za vrijeme ishemije, smanjenje oksidacije sukcinata za vrijeme reperfuzije, inhibicija RET-a na kompleksu I, zaustavljanje proizvodnje ROS-a, povećavanje koncentracije NAD^+ , inhibicija otvaranja mPTP-a, održavanje kalcijske homeostaze te regulacija mitohondrijske dinamike i kontrole kvalitete.

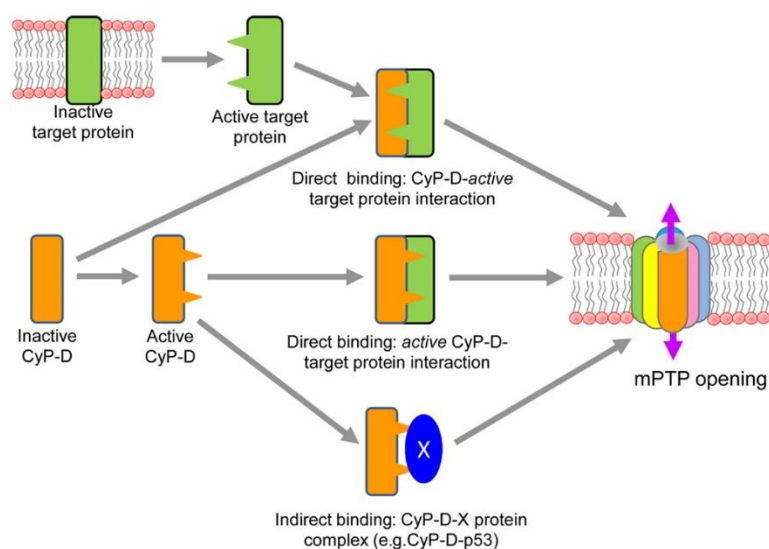
Trenutno su glavne terapijske metode za smanjenje IR ozljede fokusirane na sprječavanje sinteze ROS-a unutar mitohondrija i regulacija homeostaze kalcija.

7.1. Inhibitori otvaranja mPTP-a

Zbog toga su inhibitori otvaranja mPTP-a, kao **ciklosporin A** (*engl.* cyclosporine A, CsA), jedan od obećavajućih terapijskih metoda. Ciklosporin A je imunosupresiv koji se koristi za liječenje autoimunskih bolesti te je dio posttransplantacijske terapije. Osim toga, može i inhibirati otvaranje mPTP-a (67).

Jedan od glavnih regulatora otvaranja mPTP-a je ciklofilin D, cis-trans izomeraza sa šaperonom smještenim u matriksu. Ciklosporin A se veže na ciklofilin D inhibirajući ga. Dokazano je da ciklosporin A u niskim koncentracijama može smanjiti IR ozljedu u izoliranim srcima štakora (68).

Klinička istraživanja započela 2008. godine na malenoj grupi pacijenata, kojima je intravenski bolus ciklosporina A dan prije perkutane koronarne intervencije, pokazala su da je veličina infarkta bila znatno smanjena te je postoperativni oporavak prošao bolje (69). U 2014. u multicentričnoj, dvostruko slijepoj, randomiziranoj trećoj fazi kliničkog istraživanja Cyclosporine and Prognosis in Acute Myocardial Infarction Patients trial, CIRCUS), dokazano je da CsA nije poboljšao veličinu infarkta, razine kreatin kinaze te da nije spriječio dugoročne posljedice kao što su remodeliranje lijevog ventrikula u usporedbi s placebo skupinom nakon godine dana (70).



Slika 15. Ciklofilin D i otvaranje mPTP-a (Preuzeto iz: Javadov S, Kuznetsov A, 2013.)

NIM811 je derivat CsA bez imunosupresivnog djelovanja koji može specifično inhibirati otvaranje mPTP-a. Odrasli muški New Zeland zečevi koji su primili NIM811 za vrijeme reperfuzije imali su očuvanu oksidativnu fosforilaciju u kardiomiocitima, smanjenu veličinu infarkta i cjelokupno oštećenje miokarda (71).

Sangliferin A (SfA) je specifičan inhibitor ciklofilina D, sličan CsA, samo bez imunosupresivnog djelovanja. Učinci SfA proučavali su se na srcima ženskih štakora gdje je dokazano da je poboljšanje srčane funkcije bilo samo kod ženskih štakora koji su primili intravenski bolus SfA unutar dva dana nakon infarkta miokarda (72).

7.2. Smanjenje oksidativnog stresa

Drugi protektivni pristup uključuje prevenciju oksidativnog stresa putem rasprezanjem respiratornog lanca kemijski (npr. dinitrofenolom ili propofolom) ili putem pojačavanja ekspresije termogenina (*engl.* uncoupling proteins 2 and 3, UCP2 ili UCP3) što bi dovelo do depolarizacije mitohondrija i smanjivanja proizvodnje ROS-ova.

Smatra se da suprimiranje aktivnosti respiratornog lanca (npr. aktivnosti kompleksa I) tijekom ishemije može do nekog stupnja smanjiti sintezu ROS-a prilikom reperfuzije, ali taj učinak bi morao biti reverzibilan (51).

Dokazano je da različiti **antioksidansi** (α -tokoferol, koenzim Q10, α lipoična kiselina) imaju kardioprotektivan učinak u nekoliko modela. Primjerice, dokazano je da primjena **koenzima Q10**, fiziološke komponente respiratornog lanca, poboljšava oporavak kontraktilne funkcije i smanjuje gubitak ATP-a za vrijeme IR ozljede. Unatoč tome, uloga koenzima Q10 prilikom smanjivanja veličine infarkta i razine kreatin kinaze u ljudi nije pokazala značajne rezultate (8).

S druge strane, u Q-SYMBIO studiji, randomiziranom dvostruko slijepom kliničkom istraživanju provedenom na 420 pacijenata koji su imali kronično srčano zatajenje, srčana funkcija bila je znatno poboljšana primjenom koenzima Q10 (73).

Kako bi se povećala bioraspodjelivost koenzima Q10, razvio se **mitoQ** koji je antioksidans specifičan za mitohondrije. Ubikinon, koji je identičan aktivnom antioksidansu u koenzimu Q10, sparen je s trifenil fosfatom (*engl.* triphenyl phosphate, TPP), lipofilnom i pozitivno nabijenom molekulom. Zbog negativnog naboja mitohondrijske membrane MitoQ se može 100 do 1000 puta bolje nakupljati unutar mitohondrija time povećavajući efikasnost. Štakori koji su bili hranjeni s MitoQ su imali značajno manju srčanu disfunkciju, mitohondrijsko oštećenje i staničnu smrt nakon IR ozljede (74). U kliničkim istraživanjima na ljudima, u fazi I i II, također je dokazan potencijalni benefit (NCT00329056 i NCT00433108 studija) (75,76). Još jedan TPP-om konjugiran antioksidans zove se **Mito-TEMPO**, stabilan nitroksid koji inaktivira slobodne radikale i veže NO (77).

SS-31, MTP-131 ili **Bendavia** je tetrapeptid koji može ući u mitohondrije neovisno o njihovom membranskom potencijalu. SS-31 se veže za kardiolipin i blokira njegovu peroksidaciju. *In vivo*, u ovčjem modelu, veličina infarkta smanjila se za 15% kontinuiranom intravenskom primjenom SS-31 za vrijeme IR ozljede. U srcima morskih

prasaca infarkt se smanjio za 30% u usporedbi s kontrolama. U drugoj fazi kliničkog istraživanja EMBRACE STEMI studije, primjena SS-31 bila je sigurna i dobro tolerirana, međutim nije rezultirala u smanjenju veličine infarkta miokarda koja se procjenjivala putem razina serumske kreatin kinaze MB (*engl.* creatine kinase MB, CK-MB) (78).

7.3. Modulatori mitohondrijske dinamike

7.3.1. Inhibicija mitohondrijske fisije

Višestruke *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* studije dokazale su da korištenje Drp1 inhibitora i tvari koje aktiviraju mitohondrijsku fuziju, a inhibiraju fisiju mogu dovesti do smanjenja ozljede mitohondrija.

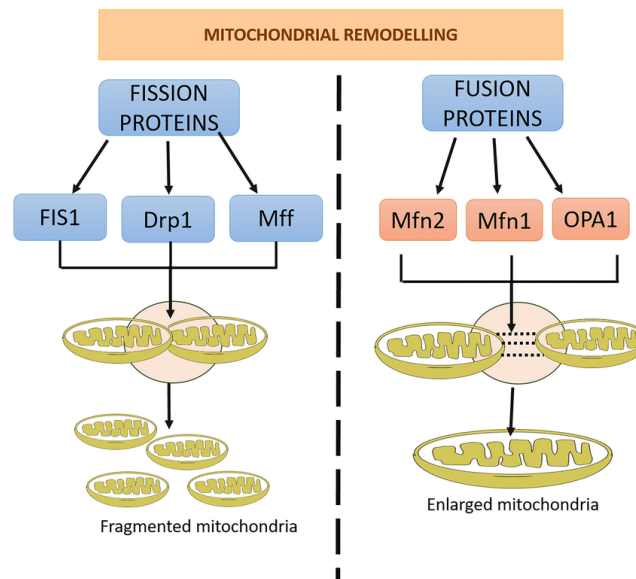
Primjerice, *in vitro*, **inhibitor mitohondrijskog dijeljenja 1** (*engl.* mitochondrial division inhibitor 1, **Mdivi-1**), inhibitor Drp1, smanjuje fosforilaciju na serinskom 616 ostatku, a **FK506, Tacrolimus**, (specifični inhibitor kalcineurina) povećava fosforilaciju Drp1 na serinskom 637 ostatku, time smanjuju razinu mitohondrijske fisije. Stanice koje su bile izložene Mdivi-1 prije IR ozljede ne samo da su imale smanjenu fisiju, već i smanjeno nakupljane kalcija u citosolu, smanjenu proizvodnju ROS-a i bolje iskorištavanje kisika (79). Selektivni inhibitor interakcije Fis1 i Drp1, protein **P110**, također je djelovao pozitivno na mitohondrije smanjujući mitohondrijske i unutarstanične razine ROS-a u kardiomiocitima štakora (79). Dokazano je da inhibicija funkcije Drp1 *in vitro* smanjuje mitohondrijski metabolizam i stabilizira membranski potencijal (79).

Osim *in vitro* studija, postoje brojne *ex vivo* i *in vivo* studije koje također govore u prilog pozitivnog učinka regulacije mitohondrijske dinamike, prvenstveno inhibicijom fisije (61).

U jednom istraživanju u kojem su korišteni C57BL/6 muški miševi, ligacija silazne grane lijeve koronarne arterije u trajanju od 30-50 minuta, popraćena s 1-24h reperfuzije, dovela je do povećanja otvaranja mPTP-a, pojačane fragmentacije mitohondrija i strukturalnih abnormalnosti. Međutim, primjena Mdivi-1 smanjivala je otvaranje mPTP-a kao i veličinu infarkta (80).

U istraživanju provedenom na C57BL/GJ i DJ-1 (DJ-1K0) miševima, IR ozljeda dovela je disfunkcije miokarda te pojačane ekspresije Fis1 i smanjene ekspresije OPA1 i Mfn2

što je rezultiralo pojačanom mitohondrijskom fisijom. Primjena Mdivi-1 poslije ishemijskog perioda djelovala je povoljno smanjujući mitohondrijsku fisiju, oksidativni stres i staničnu smrt (81).



Slika 17. Regulatori fisije i fuzije (Preuzeto iz: Sherkhane B, Chayanika G, Sood A, Khatri DK, Singh SB, 2021.)

Do 2017. godine postojala je samo jedna studija u kojoj se demonstrirao pozitivan efekt nefarmakološke inhibicije mitohondrijske fisije. Naime, **transfekcija štakora**, čija su srca bila ozlijeđena ishemijom i reperfuzijom, adenovirusom koji je ekspimirao disfunkcionalni Drp1 (DRP1K38A) rezultirala je u poboljšanju srčane funkcije i smanjenju veličine infarkta nakon reperfuzije (82).

Potrebno je uzeti u obzir da je najbolje djelovanje terapije bilo ostvareno ako je ona primjenjena prije ishemije. Međutim, pacijenti s akutnim ishemijskim događajem obično dođu u bolnicu u trenutku nakon što se on dogodi te, zasad, uloga inhibitora mitohondrijske fisije, primijenjenih za vrijeme ishemije ili reperfuzije, nije dovoljno istražena.

Do 2017. godine samo je jedno istraživanje dokazivalo pozitivan učinak inhibicije mitohondrijske fisije za vrijeme ishemije (83). U štakora u kojih je prije ozljede provedeno ishemijsko prekondicioniranje ishod je bio znatno poboljšan te je veličina infarkta bila manja. S druge strane, postoje istraživanja koja se bave primjenom terapije na početku reperfuzije kojima je također dokazan pozitivan učinak inhibicije mitohondrijske fisije. Već prije spomenuta terapija lijekovima P110 i Mdivi-1 na početku reperfuzije imala je pozitivan efekt na srčanu funkciju poslije IR ozljede (79).

7.3.2. Poticanje mitohondrijske fuzije

Pozitivan učinak poticanja mitohondrijske fuzije proučen je u nekoliko istraživanja. **Transfekcija** HL-1 stanica s **Mfn1**, **Mfn2** ili s **Drp1K38A** je uzrokovala hiperekspresiju proteina koji promoviraju fuziju i povećala je otpornost stanica na IR ozljedu, smanjujući staničnu smrt i produžujući period potreban za otvaranje mPTP-a (80). S druge strane, druga studija pokazala je kako su srca s nedostatkom Mfn1 i Mfn2 imala bolji ishod nakon IR ozljede. Međutim, s obzirom na to da su posljedice ablacije proteina potrebnih za mitohondrijsku fuziju kardiomiopatije i nagla srčana smrt, poticanje mitohondrijske fuzije zahtijeva daljnja istraživanja kako bi se dokazala njezina korisnost.

7.4. Ishemijsko prekondicioniranje

U procesu ishemijskog prekondicioniranja (*engl.* ischemic preconditioning, IPC) tkivo se izlaže nekoliko kratkih epizoda ishemije (3-5 min) nakon čega slijedi reperfuzija te zatim dugoročna ishemija te predstavlja obećavajuću terapiju za liječenje srčane IR ozljede. Smatra se da važnu ulogu u kardioprotektivnim učincima IPC-a imaju mitohondriji i nekoliko specifičnih signalnih puteva, iako točan mehanizam zasad nije poznat. Moguće je da je kardioprotektivan učinak ostvaren kroz inhibiciju otvaranja mPTP-a tijekom IR ozljede te je, uz to, dokazano da važnu ulogu u tom procesu imaju protein kinaza C (*engl.* protein kinase C, PKC), mitohondrijski kalijevi kanali ovisni o ATP-u (*engl.* ATP-sensitive potassium channel, KATP) kao i druge signalne kinaze (84).

7.5. Transplantacija mitohondrija

7.5.1. Korisnost mitohondrijske transplantacije

Mitohondrijska transplantacija je terapijska metoda u kojoj se zdravi mitohondriji injiciraju u oštećene organe. Postoje određene studije u kojima se ukazuje da zamjena ozlijeđenih mitohondrija zdravima može djelovati protektivno na stanice. Osim toga, smatra se da se mitohondriji mogu aktivno oslobađati u izvanstanični prostor i potencijalno prenositi od stanice do stanice (85).

U sustavnom pregledu literature u kojem se analiziralo 22 članka, dokazana je korisnost mitohondrijske transplantacije. Niti jedno istraživanje nije bilo neuspješno prilikom dokazivanja benefita mitohondrijske transplantacije (86).

Injekcijom autolognih mitohondrija, izoliranih iz velikog pektoralnog mišića, u rizično srčano područje 24 minute nakon privremene regionalne ishemije koju su uzrokovali ligacijom cirkumfleksne arterije (*engl.* left circumflex artery, LCX). Primjena (1.3×10^7 mitohondrija po mjestu injekcije na 8 mjesta injekcije) znatno je smanjila veličinu infarkta i povećala stanično preživljenje. Magnetna rezonancija pokazala je da su injicirani mitohondriji bili prisutni još barem četiri tjedna nakon injekcije (87).

U jednom istraživanju prikazana je i korisnost farmakološke terapije prije same transplantacije mitohondrija. Naime, aldehid dehidrogenaza 2 (*engl.* aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) ima važnu ulogu u regulaciji mitohondrijske homeostaze. Sun i suradnici istraživali su učinke Alda-1 (agonist i kemijski šaperon za ALDH2) i ALDH2 aktivatora na mitohondrijsku transplantaciju. *In vitro*, mitohondrijska transplantacija inhibirala bi apoptozu kardiomiocita neovisno o terapiji Alda-1.

Međutim, *in vivo* se putem ehokardiografije i 2,3,5- trifeniltetrazolin klor bojanja (*engl.* triphenyl tetrazolium chloride, TTC) pokazalo da primjena Alda-1 smanjuje IR ozljedu (88,89).

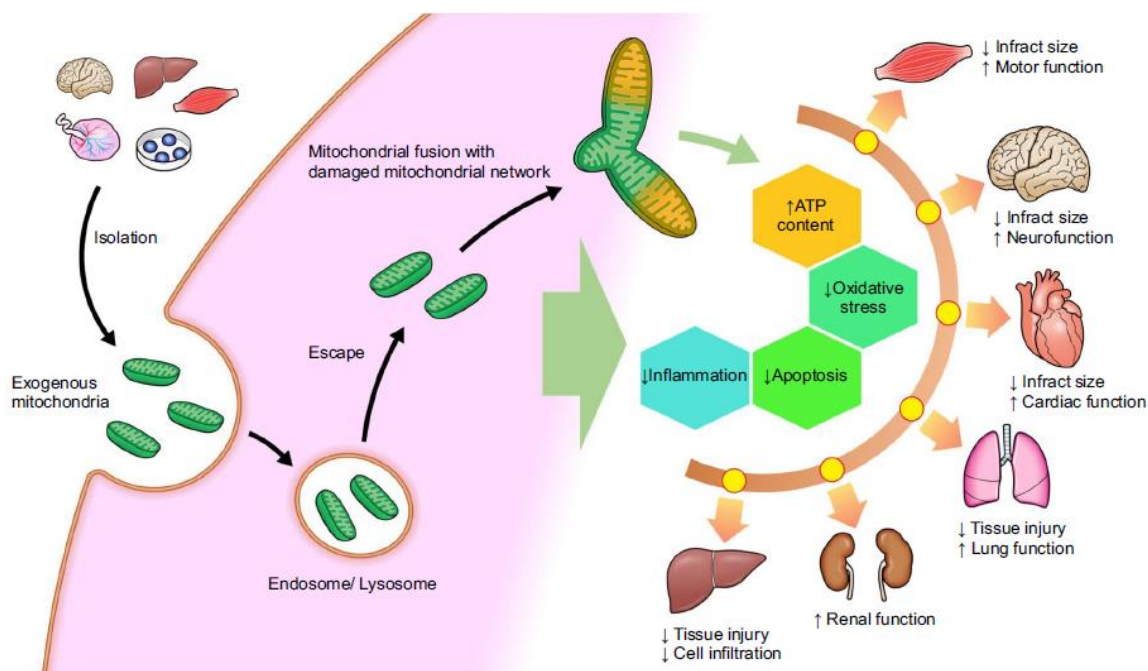
Autologna mitohondrijska transplantacija provela se u pet pedijatrijskih pacijenata koji su trebali koristiti izvantjelesnu membransku oksigenaciju (*engl.* Extracorporeal Membrane Oxygenation, ECMO). U drugom istraživanju, u periodu od petog mjeseca 2002. do dvanaestog mjeseca 2018. u Bostonskoj dječjoj bolnici 10 pedijatrijskih pacijenata s teškom srčanom bolesti koja je zahtijevala ECMO bilo je odabrano za autolognu transplantaciju mitohondrija.

Mitohondriji su se izolirali iz ravnog abdominalnog mišića (6mm x 6mm) unutar 20-30 minuta u operacijskoj sali ili u jedinici intenzivne njege. 2×10^8 mitohondrija bilo je izolirano iz uzorka tkiva težine 0.18 ± 0.04 g. Izolirani mitohondriji bili su suspendirani u 1 mL respiracijskog pufera u koncentraciji od 1×10^8 do 1×10^9 čestica/mL. Primjena u ozlijeđeno područje miokarda vršila se pomoću tuberkulinske igle (28G). Nakon procedure, srčana funkcija procjenjivala se ehokardiografijom provedenom od strane zaslijepljenih doktora. Niti jedan pacijent nije imao akutne komplikacije (aritmije, stvaranje ožiljnog tkiva, intramiokardijalni hematoma) te su svi krvni nalazi bili uredni. Pacijenti koji su primili transplantaciju mitohondrija imali su veću vjerojatnost skidanja s ECMO-a, manje srčano naprezanje (23.0% i 16.8%, $P=0.03$) kao i manju količinu kasnijih kardiovaskularnih komplikacija (20% i 79%, $P<0.01$). Kaplan-Meierova krivulja i Coxov regresijski model pokazali su da je veći rizik za kasnije kardiovaskularne događaje bio u kontrolnoj skupini (omjer rizika 4.6; CI95%, 1.0-20.9; $P<0.04$) (90).

7.5.2. Ulazak mitohondrija u stanice

Istraživanja su pomoću fluorescentnih slikovnih metoda također pokazala kako se transplantirani mitohondriji mogu naći, ne samo u ciljanom tkivu, nego i u plućima, jetri, bubregu i srcu (91). Zbog toga je potrebno više studija koje istražuju učinak intravenske injekcije mitohondrija na ostala tkiva. U studijama koje su proučavale učinak transplantacije mitohondrija na srce pokazalo se da transplantirani mitohondriji djeluju unutar- i izvanstanično (92).

Smatra se kako mitohondriji ulaze u stanice putem endolizosomskog sustava. Većina egzogenih mitohondrija zatim izlazi iz endosoma i lizosoma te prolazi fuziju s endogenim mitohondrijima što dovodi do povećavanja ATP-a, poboljšane oksidativne fosforilacije i zamjene mitohondrijske DNA (92,93). Međutim, kako se točan molekularni mehanizam ulaska mitohondrija ne zna, potrebno je još studija koje bi proučile ovaj fenomen.



Slika 18. Ulazak transplantiranih mitohondrija u stanicu te njihov učinak (Preuzeto iz: Hayashida K, Takegawa R, Shoaib M, Aoki T, Choudhary RC, Kushner CE, Nishikimi M, Miyara SJ, Rolston DM, Guevara S, Kim J, Shinozaki K, Molmenti EP, Becker LB., 2021.)

7.5.3. Imunološka reakcija na transplantirane mitohondrije

Sami izvori mitohondrija za transplantaciju mogu dolaziti iz iste vrste (alogeniski) ili druge vrste (ksenogeniski).

Imunološki odgovor na alogenske transplantirane mitohondrije u kožnom alograftu s potpunom podudarnošću glavnog kompleksa histokompatibilnosti (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) također je bio istraživani te pri tom nije zapažena direktna ili indirektna, akutna ili kronična aloreaktivnost, aloprepoznavanje te molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (94). Također su, u drugoj studiji, pokazali da na srčanom modelu zeca nakon ksenogenske transplantacije mitohondrija nije došlo do povećavanja citokina ili kemokina izvan uobičajenih postinfarktnih razina unutar četiri tjedna (95).

8. Zahvale

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Filipu Sedliču na motivaciji, pristupačnosti i nesebičnoj pomoći, kao i na svim savjetima i strpljenju koje mi je pružio prilikom izrade ovog rada. Njegova predavanja su me inspirirala i zainteresirala za područje patofiziologije i kardiologije.

Isto tako se zahvaljujem članovima komisije na vremenu uloženom u čitanje i ocjenjivanje rada.

Na kraju bih se posebno zahvalila i svojim roditeljima, kao i baki Ruži, na potpori, poticajima, motivaciji i ljubavi koje su mi pružili u životu i dosadašnjem školovanju.

9. Literatura

1. Cooper G, Adams K. The cell the cell: A molecular approach. 9th ed. New York, NY: Oxford University Press; 2023.
2. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, P Anthony Weil. Harper's illustrated biochemistry. New York: Mcgraw-Hill Medical; 2018.
3. Mccance K, Huether S. Pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children. 8th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2019.
4. Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT. Loss of the SdhB, but N1ot the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 2007 Oct 29;28(2):718–31.
5. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014 Nov 1;515(7527):431–5.
6. Pell VR, Chouchani ET, Frezza C, Murphy MP, Krieg T. Succinate metabolism: a new therapeutic target for myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 2016 May 18;111(2):134–41.
7. KARDIOVASKULARNE BOLESTI U REPUBLICI HRVATSKOJ U 2019. GODINI hzjz, dostupno na: Microsoft Word - KVBbilten_2011-10 5 2013.docx (hzjz.hr), ISBN 978-953-8362-25-5
8. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*. 2020 Mar 12;1866(7):165768.
9. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania Elsevier; 2018.
10. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997 Apr 21;185(8):1481–6.
11. James AM, Hoogewijs K, Logan A, Hall AR, Ding S, Fearnley IM, et al. Non-enzymatic N-acetylation of Lysine Residues by AcetylCoA Often Occurs via a Proximal S-acetylated Thiol Intermediate Sensitive to Glyoxalase II. *Cell Reports*. 2017 Feb 28;18(9):2105–12.
12. Wagner GR, Hirschey MD. Nonenzymatic protein acylation as a carbon stress regulated by sirtuin deacylases. *Molecular Cell*. 2014 Apr 10;54(1):5–16.
13. Yang SJ, Choi JM, Kim L, Park SE, Rhee EJ, Lee WY, et al. Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAD-sirtuin pathway in a

- rodent model of obesity and type 2 diabetes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014 Jan 1;25(1):66–72.
14. Chouchani Edward T, Pell Victoria R, James Andrew M, Work Lorraine M, Saeb-Parsy K, Frezza C, et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metabolism*. 2016 Feb;23(2):254–63.
 15. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*. 2002 Mar;80(5):780–7
 16. Murphy Michael P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 2008 Dec 12;417(1):1–13.
 17. Kumar R, Jafri MS. Mechanism of Reactive Oxygen Species Generation in Cardiac Mitochondria a Computational Approach. *Biophysical Journal*. 2011 Feb;100(3):460a.
 18. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circulation Research*. 1999 Aug 20;85(4):357–63.
 19. Kudin AP, Bimpong-Buta NYaw-B, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004 Feb 6;279(6):4127–35.
 20. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiological Reviews*. 2008 Apr;88(2):581–609.
 21. Britton R, Hobson R, Penman ID, Ralston S, Strachan MWJ. *Davidson's Principles and Practice of Medicine*. Edinburgh: Elsevier; 2018.
 22. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite-Mediated Inactivation of Manganese Superoxide Dismutase Involves Nitration and Oxidation of Critical Tyrosine Residues†. *Biochemistry*. 1998 Feb;37(6):1613–22.
 23. Ma X. Peroxynitrite aggravates myocardial reperfusion injury in the isolated perfused rat heart. *Cardiovascular Research*. 1997 Nov;36(2):195–204.
 24. Liu B, Tewari AK, Zhang L, Green-Church KB, Zweier JL, Chen YR, et al. Proteomic analysis of protein tyrosine nitration after ischemia reperfusion injury: Mitochondria as the major target. 2009 Mar 1;1794(3):476–85.
 25. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016 Nov;100:14–31.

26. Bartosz G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*. 2009 Apr;77(8):1303–15.
27. Ilangovan G, Liebgott T, Kutala VK, Petryakov S, Zweier JL, Kuppusamy P. EPR oximetry in the beating heart: Myocardial oxygen consumption rate as an index of postischemic recovery. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2004;51(4):835–42.
28. Chen Q, Shadi Moghaddas, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. 2008 Feb 1;294(2):C460–6.
29. Galkin A, Abramov AY, Frakich N, Duchen MR, Moncada S. Lack of Oxygen Deactivates Mitochondrial Complex I. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Dec;284(52):36055–61.
30. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart. *Circulation Research*. 2004 Jan 9;94(1):53–9.
31. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, N. Di Venosa, Serena D, Francesca Maria Ruggiero. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. 1999 Jul 1;27(1-2):42–50.
32. Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MSK, Minkler PE, Hoppel CL. Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001 Jun;280(6):H2770–8.
33. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Feb 5;99(3):1259–63.
34. Pasdois P, Parker Joanne E, Griffiths Elinor J, Halestrap Andrew P. The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. *Biochemical Journal*. 2011 Jun 1;436(Pt 2):493–505.
35. Zhang J, Wang YT, Miller JH, Day MM, Munger JC, Brookes PS. Accumulation of Succinate in Cardiac Ischemia Primarily Occurs via Canonical Krebs Cycle Activity. *Cell Reports*. 2018 May 29;23(9):2617–28.
36. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*. 2014 Jul;94(3):909–50.
37. Villeneuve C, Céline Guilbeau-Frugier, Sicard P, Olivier Lairez, Ordener C, Thibaut Duparc, et al. p53-PGC-1 α Pathway Mediates Oxidative Mitochondrial Damage and Cardiomyocyte Necrosis Induced by Monoamine Oxidase-A

- Upregulation: Role in Chronic Left Ventricular Dysfunction in Mice. 2013 Jan 1;18(1):5–18.
38. Bianchi P, Oxana Kunduzova, Masini E, Cambon C, Bani D, Raimondi L, et al. Oxidative Stress by Monoamine Oxidase Mediates Receptor-Independent Cardiomyocyte Apoptosis by Serotonin and Postischemic Myocardial Injury. 2005 Nov 22;112(21):3297–305.
 39. Dimitri Pchejetski, Oxana Kunduzova, Dayon A, Calise D, Marie-Hélène Seguelas, Leducq N, et al. Oxidative Stress–Dependent Sphingosine Kinase-1 Inhibition Mediates Monoamine Oxidase A–Associated Cardiac Cell Apoptosis. 2007 Jan 5;100(1):41–9.
 40. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind JS, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 1996 Jun;381(6585):800–3.
 41. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron Transfer between Cytochrome c and p66Shc Generates Reactive Oxygen Species that Trigger Mitochondrial Apoptosis. *Cell*. 2005 Jul;122(2):221–33.
 42. Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, et al. Broad Suppression of NADPH Oxidase Activity Exacerbates Ischemia/Reperfusion Injury Through Inadvertent Downregulation of Hypoxia-inducible Factor-1 α and Upregulation of Peroxisome Proliferator–activated Receptor- α . 2013 Apr 12;112(8):1135–49
 43. Kumar V, Nailya Kitaeff, Hampton MB, Cannell MB, Winterbourn CC. Reversible oxidation of mitochondrial peroxiredoxin 3 in mouse heart subjected to ischemia and reperfusion. 2009 Mar 18;583(6):997–1000.
 44. Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, et al. Overexpression of MnSOD Protects Against Myocardial Ischemia/reperfusion Injury in Transgenic Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1998 Nov;30(11):2281–9.
 45. Subramanian R, Volovsek A, Ho YS. Lack of Change in MnSOD During Ischemia/Reperfusion of Isolated Rat Heart. 1993 Oct 1;25(10):1179–86
 46. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015 Jan;78:129–41.
 47. Marraro M, Carrer A, Urbani A, Bernardi P. Molecular nature and regulation of the mitochondrial permeability transition pore(s), drug target(s) in cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2020 Jul;144:76–86
 48. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. Energetic Crosstalk Between Organelles. *Circulation Research*. 2001 Jul 20;89(2):153–9.

49. Guzun R, Karu-Varikmaa M, Gonzalez-Granillo M, Kuznetsov AV, Michel, Cécile Cottet-Rousselle, et al. Mitochondria–cytoskeleton interaction: Distribution of β -tubulins in cardiomyocytes and HL-1 cells. 2011 Apr 1;1807(4):458–69.
50. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012 Oct;1817(10):1833–8.
51. Kuznetsov, Javadov, Margreiter, Grimm, Hagenbuchner, Ausserlechner. The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants*. 2019 Oct 6;8(10):454.
52. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: Effects of procedural manipulations. 1985 Feb 1;236(2):691–702. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011 Jul;1813(7):1360–72.
53. Saks V, Kuznetsov AV, Gonzalez-Granillo M, Tepp K, Natalja Timohhina, Karu-Varikmaa M, et al. Intracellular Energetic Units regulate metabolism in cardiac cells. 2012 Feb 1;52(2):419–36.
54. Gonzalez-Granillo M, Alexei Grichine, Guzun R, Yves Usson, Tepp K, Vladimir Chekulayev, et al. Studies of the role of tubulin beta II isotype in regulation of mitochondrial respiration in intracellular energetic units in cardiac cells. 2012 Feb 1;52(2):437–47.
55. Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, et al. Muscle Creatine Kinase-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 Aug;270(34):19921–9.
56. Zhou H, Zhu P, Wang J, Zhu H, Ren J, Chen Y. Pathogenesis of cardiac ischemia reperfusion injury is associated with CK2 α -disturbed mitochondrial homeostasis via suppression of FUNDC1-related mitophagy. *Cell Death & Differentiation*. 2018 Mar 14;25(6):1080–93.
57. Song M, Mihara K, Chen Y, Scorrano L, Dorn Gerald W. Mitochondrial Fission and Fusion Factors Reciprocally Orchestrate Mitophagic Culling in Mouse Hearts and Cultured Fibroblasts. *Cell Metabolism*. 2015 Feb;21(2):273–86.
58. Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 2005 Apr;15(4):179–83.
59. Kuznetsov AV, Kehrer I, Kozlov AV, Haller M, Redl H, Hermann M, et al. Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011 Feb 20;400(8):2383–90.
60. Chayodom Maneechote, Siripong Palee, Nipon Chattipakorn. Roles of mitochondrial dynamics modulators in cardiac ischaemia/reperfusion injury. 2017 Sep 22;21(11):2643–53.

61. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting Mitochondrial Fission Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*. 2010 May 11;121(18):2012–22.
62. Lee Y, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*. 2004 Nov;15(11):5001–11.
63. Qi X, Disatnik MH, Shen N, Sobel RA, Mochly-Rosen D. Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C δ under oxidative stress conditions in vivo. *Forscher P*, editor. *Molecular Biology of the Cell*. 2011 Jan 15;22(2):256–65.
64. Shimizu Y, Lambert JP, Nicholson CK, Kim J, Wolfson DB, Hee Cheol Cho, et al. DJ-1 protects the heart against ischemia–reperfusion injury by regulating mitochondrial fission. 2016 Aug 1;97:56–66.
65. Yue W, Chen Z, Liu H, Yan C, Chen M, Feng D, et al. A small natural molecule promotes mitochondrial fusion through inhibition of the deubiquitinase USP30. *Cell Research*. 2014 Feb 11;24(4):482–96.
66. Schneider A, Ad N, Izhar U, Khaliulin I, Borman JB, Schwalb H. Protection of myocardium by cyclosporin a and insulin: in vitro simulated ischemia study in human myocardium. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2003 Oct;76(4):1240–5.
67. Javadov S, Kuznetsov A. Mitochondrial Permeability Transition and Cell Death: The Role of Cyclophilin D. *Frontiers in Physiology*. 2013;4.
68. Shanmuganathan S, Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM. Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005 Jul;289(1):H237–42.
69. Mewton N, Thien Tri Cung, Morel O, Guillaume Cayla, Bonnefoy-Cudraz E, Gilles Rioufol, et al. Rationale and design of the Cyclosporine to Improve Clinical Outcome in ST-elevation myocardial infarction patients (the CIRCUS trial). 2015 Jun 1;169(6):758-766.e6.
70. Marin W, Marin D, Ao X, Liu Y. Mitochondria as a therapeutic target for cardiac ischemia-reperfusion injury (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2020 Dec 16;47(2):485–99.
71. Jahandiez V, Cour M, Bochaton T, Maryline Abrial, Loufouat J, Gharib A, et al. Fast therapeutic hypothermia prevents post-cardiac arrest syndrome through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition inhibition. 2017 May 10;112(4).
72. Parodi-Rullán Rebecca M, Soto-Prado J, Vega-Lugo J, Chapa-Dubocq X, Díaz-Cordero Sara I, Javadov S. Divergent Effects of Cyclophilin-D Inhibition on the Female Rat Heart: Acute Versus Chronic Post-Myocardial Infarction. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;50(1):288–303.

73. Mortensen AL, Rosenfeldt F, Filipiak KJ. Effect of coenzyme Q10 in Europeans with chronic heart failure: A sub-group analysis of the Q-SYMBIO randomized double-blind trial. *Cardiology Journal*. 2013 Jan 2;
74. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RAJ, Murphy MP, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*. 2005 Jul;19(9):1088–95.
75. Smith RAJ, Murphy MP. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010 Jul;1201(1):96–103.
76. Reily C, Mitchell T, Chacko BK, Benavides GA, Murphy MP, Darley-Usmar VM. Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics. *Redox Biology*. 2013;1(1):86–93.
77. Miura S, Saitoh S, Kokubun T, Owada T, Yamauchi H, Machii H, et al. Mitochondrial-Targeted Antioxidant Maintains Blood Flow, Mitochondrial Function, and Redox Balance in Old Mice Following Prolonged Limb Ischemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Sep 4;18(9):1897.
78. Gibson CM, Giugliano RP, Kloner RA, Bode C, Tendera M, Jánosi A, et al. EMBRACE STEMI study: a Phase 2a trial to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of intravenous MTP-131 on reperfusion injury in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *European Heart Journal*. 2015 Nov 19;37(16):1296.1-1303.
79. Sharp WW, Fang YH, Han M, Zhang HJ, Hong Z, Banathy A, et al. Dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated diastolic dysfunction in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic benefits of Drp1 inhibition to reduce mitochondrial fission. *The FASEB Journal*. 2013 Sep 27;28(1):316–26.
80. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting Mitochondrial Fission Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*. 2010 May 11;121(18):2012–22.
81. Shimizu Y, Lambert JP, Nicholson CK, Kim J, Wolfson DB, Hee Cheol Cho, et al. DJ-1 protects the heart against ischemia–reperfusion injury by regulating mitochondrial fission. 2016 Aug 1;97:56–66.
82. Zepeda RJ, Kuzmicic J, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Riquelme JA, et al. Drp1 Loss-of-function Reduces Cardiomyocyte Oxygen Dependence Protecting the Heart From Ischemia-reperfusion Injury. 2014 Jun 1;63(6):477–87.
83. Cellier L, Tamareille S, Kalakech H, Guillou S, Lenaers G, Prunier F, et al. Remote Ischemic Conditioning Influences Mitochondrial Dynamics. *SHOCK*. 2016 Feb;45(2):192–7.
84. Cohen, M.D MV, Downey, Ph.D JM. MYOCARDIAL PRECONDITIONING PROMISES TO BE A NOVEL APPROACH TO THE TREATMENT OF ISCHEMIC HEART DISEASE. *Annual Review of Medicine*. 1996 Feb;47(1):21–9.

85. Hayashida K, Takegawa R, Shoaib M, Aoki T, Choudhary RC, Kuschner CE, et al. Mitochondrial transplantation therapy for ischemia reperfusion injury: a systematic review of animal and human studies. *Journal of Translational Medicine*. 2021 May 17;19(1).
86. Liu CS, Chang JC, Kuo SJ, Liu KH, Lin TT, Cheng WL, et al. Delivering healthy mitochondria for the therapy of mitochondrial diseases and beyond. 2014 Aug 1;53:141–6.
87. Kaza AK, Wamala I, Friehs I, Kuebler JD, Rathod RH, Berra I, et al. Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2017 Apr 1;153(4):934–43.
88. Sun X, Gao R, Li W, Zhao Y, Yang H, Chen H, et al. Alda-1 treatment promotes the therapeutic effect of mitochondrial transplantation for myocardial ischemia-reperfusion injury. *Bioactive Materials*. 2021 Jul;6(7):2058–69.
89. Guariento A, Piekarski BL, Doulamis IP, Blitzer D, Ferraro AM, Harrild DM, et al. Autologous mitochondrial transplantation for cardiogenic shock in pediatric patients following ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2021 Sep 1;162(3):992–1001.
90. Nakamura Y, Lo EH, Hayakawa K. Placental Mitochondria Therapy for Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *Stroke*. 2020 Oct;51(10):3142–6.
91. Cowan DB, Yao R, Thedsanamoorthy JK, Zurakowski D, del Nido PJ, McCully JD. Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells. *Scientific Reports*. 2017 Dec;7(1).
92. Pacak CA, Preble JM, Kondo H, Seibel P, Levitsky S, Pedro, et al. Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. 2015 May 15;4(5):622–6.
93. Ramirez-Barbieri G, Kamila Moskowitsova, Shin B, Blitzer D, Arzoo Orfany, Alvise Guariento, et al. Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria. *Mitochondrion*. 2019 May 1;46:103–15.
94. Akihiro Masuzawa, Black K, Pacak CA, Ericsson M, Barnett RJ, Drumm C, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. 2013 Apr 1;304(7):H966–82

10. Životopis

Imam 25 godina i rođena sam u Vinkovcima. Pohađala sam Osnovnu školu Josipa Kozarca kao i prirodoslovno-matematičku Gimnaziju u Vinkovcima. Oba školovanja sam završila s odličnim uspjehom te sam više puta sudjelovala na županijskim i državnim natjecanjima iz geografije, hrvatskog i latinskog jezika. 2017. godine upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu. Na prvoj sam godini osvojila Dekanovu nagradu te sam za vrijeme svojeg studija bila demonstratorica iz više predmeta uključujući anatomiju, fiziku i fiziologiju. Sudjelovala sam u pisanju nekoliko radova koji su bili predstavljeni na CROSS-u te sam sudjelovala u pisanju dva rada koji su objavljeni u Acti Croatici. Imam poseban interes za kardiologiju te sam nakon 5. godine provela 2 mjeseca na praksi u sveučilišnoj bolnici u Hamburgu. Tečno govorim njemački i engleski, a služim se i španjolskim jezikom. Profesionalno sam se bavila s tenisom 8 godina te volim putovati, čitati knjige i baviti se ronjenjem.