

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Katica Cvitkušić Lukenda

UTJECAJ JEDNE DOZE SGLT2 INHIBITORA, EMPAGLIFLOZINA, NA
OKSIDACIJSKI STRES KOD BOLESNIKA PODVRGNUTIH ELEKTIVNOJ
KORONARNOJ ANGIOGRAFIJI

Doktorski rad

Osijek, 2025.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Katica Cvitkušić Lukenda

UTJECAJ JEDNE DOZE SGLT2 INHIBITORA, EMPAGLIFLOZINA, NA
OKSIDACIJSKI STRES KOD BOLESNIKA PODVRGNUTIH ELEKTIVNOJ
KORONARNOJ ANGIOGRAFIJI

Doktorski rad

Osijek, 2025.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

UTJECAJ JEDNE DOZE SGLT2 INHIBITORA, EMPAGLIFLOZINA, NA OKSIDACIJSKI STRES KOD BOLESNIKA PODVRGNUTIH ELEKTIVNOJ KORONARNOJ ANGIOGRAFIJI

Katica Cvitkušić Lukenda

Doktorski rad je izrađen u: Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ Slavonski Brod, Genos d.o.o. Zagreb, Institut Ruđer Bošković Zagreb, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Zagreb.

Mentor 1: doc. dr. sc. Ivan Gudelj

Mentor 2: naslovna doc. dr. sc. Ana Čipak Gašparović

Kratki sažetak doktorskog rada: Koronarna angiografija tijekom vizualizacije patologije koronarnih arterija uzrokuje porast oksidacijskog stresa povezanog s endotelnom disfunkcijom, zračenjem i primjenom kontrastnog sredstva. Inhibitori natrij-glukoza kotransportera 2 su lijekovi s korisnim učinkom na renalne i srčane ishode, među kojima je i empagliflozin. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj jedne doze empagliflozina primijenjenog prije koronarne angiografije na stresom izazvana oštećenja tijekom procedure. U ispitivanoj skupini opažen je trend porasta antioksidacijskog kapaciteta, značajno smanjeno oksidacijskog oštećenja DNA, te promjene u profilu N-glikozilacije imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme. Rezultati istraživanja sugeriraju da empagliflozin smanjuje oksidacijsko oštećenje i upalne odgovore kod bolesnika koji se podvrgavaju koronarnoj angiografiji.

Broj stranica: 102

Broj slika: 14

Broj tablica: 16

Broj literaturnih navoda: 195

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: koronarna angiografija, oksidacijski stres, antioksidacijski kapacitet, N-glikozilacija, SGLT2 inhibitori

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science

Scientific Fields: biology, basic medical sciences

EFFECT OF A SINGLE DOSE OF THE SGLT2 INHIBITOR, EMPAGLIFLOZIN, ON OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS UNDERGOING ELECTIVE CORONARY ANGIOGRAPHY

Katica Cvitkušić Lukenda

Thesis performed at: General Hospital „Dr. Josip Benčević“ Slavonski Brod, Genos Ltd Zagreb, Ruđer Bošković Institute Zagreb, Institute for Medical Research and Occupational Health Zagreb.

Supervisor 1: Assist. Prof. Ivan Gudelj

Supervisor 2: Assist. Prof. Ana Čipak Gašparović

Short abstract: Coronary angiography, during the visualization of coronary artery pathology, causes an increase in oxidative stress associated with endothelial dysfunction, radiation, and the use of contrast agents. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors, such as empagliflozin, are medications with beneficial effects on renal and cardiovascular outcomes. The aim of the study was to examine the impact of a single dose of empagliflozin administered before coronary angiography on stress-induced damage during the procedure. In the examined group, an increase in antioxidant capacity was observed, along with a significant reduction in oxidative DNA damage, changes in the N-glycosylation profile of immunoglobulin G and total plasma proteins. The results of the study suggest that empagliflozin reduces oxidative damage and inflammatory responses in patients undergoing coronary angiography.

Number of pages: 102

Number of figures: 14

Number of tables: 16

Number of references: 195

Original in: Croatian

Key words: coronary angiography, oxidative stress, antioxidant capacity, N-glycosylation, SGLT2 inhibitors

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

ZAHVALA

Na putu izrade ovog doktorskog rada susrela sam se s brojnim izazovima, ali i s nesebičnom podrškom, inspiracijom i pomoći mnogih ljudi, kojima dugujem duboku zahvalnost.

Prije svega, želim izraziti svoju iskrenu i duboku zahvalnost svojim mentorima, *doc. dr. sc. Ivanu Gudelju i doc. dr. sc. Ani Čipak Gašparović*, na iznimnom stručnom vodstvu, neiscrpnom strpljenju i nesebičnom dijeljenju znanja. Njihova podrška, smjernice i konstruktivne sugestije bili su neprocjenjivi u svakom koraku ovog istraživanja, a njihova predanost znanstvenom radu bila mi je stalna inspiracija.

Također, želim se zahvaliti *dr. sc. Mirti Milić* na njezinoj podršci i uloženom trudu pri izradi komet testa, čime je značajno pridonijela kvaliteti ovog istraživanja.

Zahvaljujem studijskom savjetniku *prof.dr.sc. prim. Aleksandru Včevu, dr.med.* na stručnim savjetima, podršci i povjerenju tijekom izrade ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem *članovima povjerenstva*, koji su svojim korisnim komentarima, kritikama i podrškom značajno unaprijedili ovaj rad te mu dali dodatnu vrijednost.

Veliku zahvalnost upućujem svojim kolegama i suradnicima s *Odjela za kardiologiju Opće bolnice Dr. Josip Benčević u Slavonskom Brodu*, čija je nesebična pomoć, timski rad i srdačna atmosfera učinila ovaj proces ne samo uspješnim, već i iznimno ugodnim. Posebno zahvaljujem *glavnoj sestri odjela Barici Stanić, mag. med. tech.*, i *Ivani Simić, mag. med. tech.*, koje su svojim predanim radom pomogle u pripremi ispitanika, uzorkovanju, raznošenju i skladištenju bioloških materijala, čime su dale značajan doprinos ovom istraživanju.

Posebnu zahvalnost dugujem *prof. dr. sc. prim. Blaženki Miškić, dr. med.*, koja mi je pružila priliku za rad i razvoj te me neprestano poticala na stručno i znanstveno napredovanje.

Neizmjereno sam zahvalna i svojoj obitelji – suprugu *Anti* i djeci *Filipu, Ani, Josipu i Niki* – na njihovoj beskrajnoj ljubavi, razumijevanju i strpljenju. Njihova neprestana podrška, ohrabrenje i vjera u mene bili su moj najveći oslonac i snaga u svim izazovima na ovom putu.

Posebno želim zahvaliti svojim *roditeljima*, koji su mi od najranijih dana usađivali vrijednosti rada, poštenja i upornosti te me svojim primjerom naučili važnosti znanja, integriteta i ispravnog životnog puta. Njihova nesebična ljubav, podrška i neiscrpna snaga omogućili su mi da slijedim svoje snove.

Na kraju, zahvaljujem svim sudionicima istraživanja, kolegama i prijateljima koji su na bilo koji način pridonijeli realizaciji ovog rada. Vaša podrška, znanje i nesebičan trud učinili su ovo istraživanje mogućim.

Hvala vam svima od srca!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Koronarna angiografija.....	1
1.1.1. Komplikacije	2
1.1.1.1. Anksioznost	3
1.1.1.2. Ozljeda krvne žile.....	4
1.1.1.3. Kontrastna sredstva	4
1.1.1.3.1. Kontrastom inducirana akutna bubrežna ozljeda.....	6
1.1.1.3.2. Rana bubrežna ozljeda.....	7
1.1.1.4. Rendgensko zračenje	7
1.2. Oksidacijski stres i endotelna funkcija	8
1.3. Uloga glikokaliksa i glikana.....	11
1.4. Inhibitori natrij–glukoza kontransportera 2 (SGLT2 inhibitori)	14
2. CILJ RADA.....	17
3. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	18
4. MATERIJALI I METODE.....	19
4.1. Ispitanici	19
4.1.1. Uzorkovanje kliničkih parametara.....	20
4.2. Laboratorijske metode	24
4.2.1. Ukupni oksidacijski kapacitet (TOC).....	24
4.2.1.1. Priprema standarda peroksida.....	24
4.2.1.2. Priprema reakcijske mješavine.....	25
4.2.1.3. Postupak analize	25
4.2.2. Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC).....	25
4.2.2.1. Priprema standarda mokraćne kiseline	26
4.2.2.2. Priprema reakcijskih mješavina A i B	27
4.2.2.3. Postupak analize	27
4.3. Analiza N-glikana.....	28
4.3.1. Izolacija imunoglobulina G	28
4.3.2. Deglikozilacija i obilježavanje N-glikana	28
4.3.2.1. Denaturacija.....	28
4.3.2.2. Deglikozilacija.....	29
4.3.3. Hidrofilna interakcijska tekućinska kromatografija ultravisoke učinkovitosti.....	29
4.3.4. Izračun deriviranih svojstava.....	30

4.4.	Komet test.....	33
4.4.1.	Priprema stakalaca za mikroskopiranje	34
4.4.2.	Uzorkovanje krvi, čuvanje i transport	34
4.4.3.	Otapanje i priprema jednostanične suspenzije.....	34
4.4.4.	Liza stanica	35
4.4.5.	Denaturacija i jednostanična gel elektroforeza.....	35
4.4.6.	Bojanje i fluorescentna mikroskopija	36
4.4.7.	Softverska analiza.....	36
4.5.	Statističke metode.....	38
4.5.1.	Statistička analiza glikana	39
5.	REZULTATI	40
5.1.	Opća, klinička i antropometrijska obilježja ispitanika	40
5.2.	Bazalni hematološki i biokemijski pokazatelji.....	42
5.3.	Karakteristike procedure	44
5.4.	Razlike u biokemijskim pokazateljima prije i 24 sata nakon koronarne angiografije.....	44
5.5.	Rezultati mjerenja ukupnog oksidacijski kapaciteta (TOC).....	47
5.6.	Razlike u ukupnom antioksidacijskom kapacitetu (TAC) bazalno, 4 i 24 sata nakon koronarne angiografije	48
5.7.	Razlike u oštećenju DNA u alkalnom komet testu bazalno, 4 i 24 sata nakon koronarne angiografije.....	49
5.8.	Razlike u N-glikozilaciji imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme.....	51
5.8.1.	Promjene N-glikozilacije imunoglobulina G nakon primjene empagliflozina i koronarne angiografije.....	52
5.8.2.	Promjene N-glikozilacije ukupnih proteina plazme nakon primjene empagliflozina i koronarne angiografije.....	54
5.8.3.	Analiza odnosa kliničkih i laboratorijskih varijabli s ukupnim antioksidacijskim kapacitetom	57
5.8.4.	Analiza povezanosti karakteristika procedure s oštećenjem DNA, bubrežnom funkcijom, N-glikozilacijom imunoglobulina G i ukupnim antioksidacijskim kapacitetom	58
6.	RASPRAVA.....	61
6.1.	Utjecaj empagliflozina na biokemijske pokazatelje nakon koronarne angiografije	63
6.2.	Utjecaj empagliflozina na ukupni oksidacijski kapacitet (TOC) nakon koronarne angiografije.....	65
6.3.	Utjecaj empagliflozina na ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) nakon koronarne angiografije.....	66
6.4.	Učinak empagliflozina na oksidacijsko oštećenje DNA nakon koronarne angiografije	67
6.5.	Utjecaj empagliflozina na N-glikozilaciju imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme nakon koronarne angiografije.....	68

6.6.	Utjecaj kliničkih i laboratorijskih pokazatelja na ukupni antioksidacijski kapacitet	70
6.7.	Utjecaj proceduralnih karakteristika na oštećenje DNA, bubrežnu funkciju, N-glikozilaciju imunoglobulina G i ukupni antioksidacijski kapacitet	71
6.8.	Hipotetski mehanizam protuupalnog i citoprotektivnog učinka empagliflozina.....	71
6.9.	Ograničenja istraživanja	74
7.	ZAKLJUČAK	76
8.	LITERATURA	77
9.	SAŽETAK	92
10.	SUMMARY	93
11.	ŽIVOTOPIS	94
12.	POPIS PUBLIKACIJA	95

POPIS KRATICA

A – Absorbancija

AV fistula – Arteriovenska fistula

ADCC – O antitijelima ovisna stanična citotoksičnost (engl. *Antibody Dependent Cellular Toxicity*)

CA – Koronarna angiografija (engl. *Coronary Angiography*)

CI-AKI – Kontrastom inducirana akutna bubrežna ozljeda (engl. *Contrast-Induced Acute Kidney injury*)

DAP – Umnožak doze i površine (engl. *Dose Area Product*)

eGFR – Procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated Glomerular Filtration Rate*)

EKG – Elektrokardiogram

Fab regija – Regija na molekuli imunoglobulina koja veže antigen (engl. *Fragment antigen-binding*)

Fc regija – Regija s kristalizirajućim fragmentima na molekuli imunoglobulina kojom se veže za Fc receptor na stanici (engl. *Fragment crystallizable*)

FDR – Stopa lažnog otkrića (engl. *False Discovery Rate*)

FLR – Fluorescencija (engl. *Fluorescence*)

FMD – Protokom posredovana dilatacija (engl. *Flow Mediated Dilatation*)

FT – Vrijeme fluoroskopije (engl. *Fluoroscopy Time*)

G – Označavanje veličine otvora intravenske igle/kanile (engl. *Gauge*)

GP – Kromatografski vrh glikana (engl. *Glycan Peak*)

GU – Jedinice glukoze (engl. *Glucose Units*)

HILIC – Tekućinska kromatografija hidrofilne interakcije (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

Hs troponin I – Visoko osjetljivi troponin I (engl. *High Sensitivity Troponin I*)

Hs troponin T – Visoko osjetljivi troponin T (engl. *High Sensitivity Troponin T*)

HZZJ – Hrvatski zavod za javno zdravstvo

ICAM 1 i 2 – Međustanična adhezijska molekula 1 i 2 (engl. *Intercellular Adhesion Molecule 1 and 2*)

KT – Krvni tlak

LAD – Lijeva prednja silazna koronarna arterija (eng. *Left Anterior Descending*)

MK – Mokraćna kiselina

NSTEMI – Akutni koronarni sindrom bez elevacije ST - segmenta (engl. *Non-ST-Elevation Myocardial Infarction*)

NT-proBNP – N-terminalni prohormon B tipa natriuretskog peptida (engl. *N-terminalni proBrain Natriuretic Peptide*)

OD – Optička gustoća (engl. *Optical Density*)

NO – Dušikov oksid (engl. *Nitric Oxide*)

PBS – Fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*)

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

PECAM 1 – Trombocitna/endotelna adhezijska molekula 1 (engl. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*)

PNGase F – Peptidna- N- glikozidaza F (engl. *Peptide-N-glycosidase F*)

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

PTFE – Politetrafluoroetilen

ROS – Reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

SE – standardna pogreška (engl. *Standard Error*)

SGLT2i – Inhibitori natrij-glukoza kotransportera 2 (engl. *Sodium-Glucose coTransporter-2 inhibitors*)

SLC5A1 – gen za SGLT1 kotrasporter (engl. *Solute carrier family 5, member 1*)

SLC5A2 – gen za SGLT2 kotrasporter (engl. *Solute carrier family 5, member 2*)

SPE – ekstrakcija čvrste faze (engl. *Solid Phase Extraction*)

STEMI – Akutni koronarni sindrom s perzistentnom elevacijom ST-segmenta (engl. *ST-Elevation Myocardial Infarction*)

TAC – Ukupni antioksidacijski kapacitet (engl. *Total Antioxidant Capacity*)

TI – Intenzitet repa kometa (engl. *Tail Intensity*)

TL – Duljina repa kometa (engl. *Tail Length*)

TOC – Ukupni oksidacijski kapacitet (engl. *Total Oxidative Capacity*)

TMB – Tetrametil-benzidin

UHPLC – Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatographic*)

v – Volumen

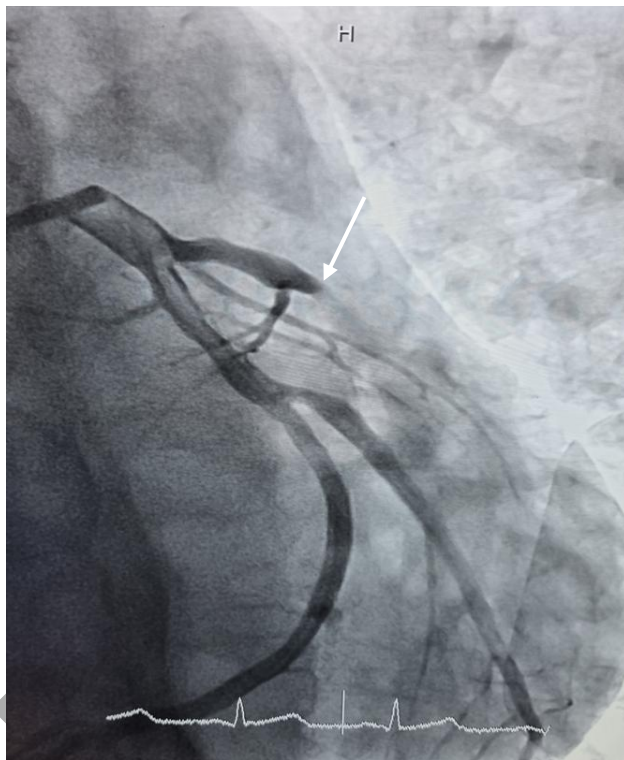
VCAM 1 i 2 – Vaskularna adhezijska molekula 1 i 2 (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1 and 2*)

1. UVOD

1.1. Koronarna angiografija

Koronarna angiografija (engl. *Coronary Angiography*, CA) je invazivna kardiološka pretraga kojom se omogućava vizualizacija koronarnih arterija upotrebom jednog kontrastnog sredstva pod rendgenskim zračenjem (Slika 1). Prvu selektivnu koronarnu angiografiju izveo je 30. listopada 1958. godine kardiolog dr. F. Mason Sones (Klinika Cleveland, Miami, Florida, SAD) prilikom aortografije kod bolesnika s aortnom regurgitacijom, kada je kateter pukim slučajem ušao u desnu koronarnu arteriju koja je tada prvi puta vizualizirana pod rendgenom, jer injekcija kontrasta nije zaustavljena pravovremeno (1). Do tada se smatralo da je injekcija kontrasta dana selektivno u koronarnu arteriju fatalna za bolesnika zbog izazivanja maligne odnosno po život ugrožavajuće srčane aritmije. Dva dana iza toga je dr. Sones učinio selektivnu koronarografiju lijeve i desne koronarne arterije kod bolesnika kod kojeg je bila planirana kateterizacija srca zbog mitralne regurgitacije. Prethodno je izračunao optimalni volumen i koncentracije kontrasta kako se ne bi ugrozio život bolesnika. Prije toga je 1953. godine radiolog dr. Sven Ivar Seldinger (Karolinska institut, Stockholm, Švedska) prvi puta opisao tehniku perkutane punkcije i plasiranja katetera u femoralnu arteriju koristeći žicu vodilicu (2). Uslijedila su poboljšanja tehnike i primjena katetera koji su prilagođeni anatomiji aorte i polazištima koronarnih arterija što su prvi puta opisali radiolog dr. Melvin P. Judkins (Klinika Cleveland, Miami, Florida, SAD) (3) koji je bio učenik pionira invazivne kardiologije dr. Sonesa i dr. Seldingera te radiolog dr. Kurt Amplatz (Klinička bolnica Minnesota, Minneapolis, SAD) (4). Kateteri koji se i danas svakodnevno koriste za sondiranje koronarnih arterija dizajnirali su dr. Judkins i dr. Amplatz. Od tada je koronarna angiografija zlatni standard za dijagnostiku i liječenje koronarne bolesti srca. Indikacije za koronarnu angiografiju možemo podijeliti na elektivne i urgentne. Na elektivnu koronarografiju upućuju se bolesnici sa sumnjom na stabilnu anginu pectoris (bol u prsima ili zaduhu) uz jednu ili više pozitivnih neinvazivnih kardioloških pretraga koje upućuju na koronarnu bolest srca (EKG, test opterećenja, ultrazvuk srca, scintigrafija srca), zatim bolesnici s bolestima srčanih zalistaka i teškim stupnjem disfunkcije zalistaka (stenoza i regurgitacija srčanih zalistaka) te u današnje vrijeme i predtransplantacijska obrada kod uznapredovale bolesti organa, npr. bubrega (5). Urgentne koronarografije izvode se kod bolesnika koji ispunjavaju kriterije akutnog koronarnog sindroma: akutni koronarni sindrom s perzistentnom ST elevacijom (engl. *ST-Elevation Myocardial Infarction*, STEMI),

akutni koronarni sindrom bez ST elevacije (engl. *Non-ST-Elevation Myocardial Infarction*, NSTEMI) i nestabilna angina pectoris (6).



Slika 1. Koronarna angiografija kod bolesnika s akutnim koronarnim sindromom s perzistentnom ST elevacijom u prednjim srčanim odvodima. Strelicom je prikazana okludirana lijeva prednja silazna koronarna arterija (engl. *Left Anterior Descending, LAD*). Vlastiti izvor.

1.1.1. Komplikacije

Sama pretraga danas je povezana s niskom učestalošću komplikacija koja je manja od 1% i rizikom smrtnosti manjim od 0,05% (7). Iako se činilo da se razvojem materijala i tehnologije kao i sve boljim vještinama osoblja u kateterizacijskim laboratorijima učestalost komplikacija smanjila, i dalje postoji određeni rizik komplikacija, pogotovo vezanog za akutnu bubrežnu ozljedu (8). Komplikacije vezane uz proceduru možemo podijeliti na one vezane za psihički stres bolesnika (strah, anksioznost), punkciju krvne žile (disekcija krvne žile, pseudoaneurizma,

arteriovenska (AV) fistula), primjenu kontrastnog sredstva (alergije, kontrastom inducirana nefropatija, maligna aritmija) i rendgensko zračenje.

1.1.1.1. Anksioznost

Prevalencija anksioznosti prije invazivnih kardioloških procedura je prema dostupnoj literaturi u rasponu od 24 – 72% (9). U istraživanju koje su proveli Sara i sur. pokazana je veća prevalencija endotelne disfunkcije u koronarnim arterijama kod bolesnika s dijagnozom anksioznosti (10). Koudouovoh-Tripp i sur. dokazali su proinflamatornu aktivaciju trombocita u stanju akutnog i kroničnog mentalnog stresa (11). Endotelna disfunkcija i povećana agregacija trombocita mogu doprinijeti razvoju aterosklerotske bolesti srca i destabilizirati već postojeće plakove u koronarnim arterijama s posljedičnim razvojem akutnog koronarnog sindroma, što samo po sebi nosi povišeni rizik pobolijevanja i smrtnosti (12). Kod anksioznih osoba je povišen simpatički tonus s posljedičnim povišenjem krvnog tlaka i frekvencije srca te rizikom od srčane aritmije (13). U dosadašnjim istraživanjima je dokazano da je razina anksioznosti kod bolesnika koji dolaze na koronarnu angiografiju znatno povišena prije same procedure, a pogotovo ako se radi o ženama, mlađim osobama i perkutanoj koronarnoj intervenciji (engl. *Percutaneous Coronary Intervention*, PCI) (14). Istraživanje koje su proveli De Jong-Watt i Arthur je pokazalo da i sama duljina čekanja na koronarnu angiografiju može imati negativan utjecaj na psihološko stanje bolesnika, odnosno dulji boravak bolesnika na listi čekanja povećavao je razinu anksioznosti (15). Nadalje, anksioznost visokog stupnja povezana je s lošijim ishodima kardiovaskularnih bolesti u smislu povećanja rizika od srčanog infarkta i rizika smrti nakon postavljene dijagnoze koronarne bolesti srca (16). Prisutnost anksioznosti može smanjiti suradljivost bolesnika kod svih postupaka koji se provode prije, tijekom i nakon invazivne procedure (17). Uobičajene mjere koje se poduzimaju radi smanjenja psihičkog stresa kod bolesnika su razgovor i edukacija od strane medicinskog osoblja i farmakološka mjera premedikacije različitim benzodiazepinima u oralnom obliku zbog njihovog anksiolitičkog učinka (18). U istraživanju koje su proveli Vlastra i sur. pokazana je povezanost primjene diazepama u dozi od 5 mg sa smanjenjem anksioznosti umjerenog stupnja u usporedbi s ispitanicima bez premedikacije (9).

1.1.1.2. Ozljeda krvne žile

Od početaka uvođenja pretrage najčešće korišteni vaskularni pristup bila je punkcija femoralne arterije. Femoralni pristup nosi veći rizik razvoja vaskularnih komplikacija: pseudoaneurizme, AV fistule, lokalnog i retroperitonealnog krvarenja, venske tromboze uslijed produljenog ležanja, i obično znači dulji boravak u bolnici. Prelazak na transradijalni pristup punkcijom radijalne arterije kao prvi pristup za koronarnu angiografiju smanjio je rizik vaskularnih komplikacija, iako ih nije u potpunosti eliminirao. RIVAL (engl. *Radial Vs femorAL access for coronary intervention*), randomizirana i multicentrična klinička studija pokazala je superiornost transradijalnog pristupa u smanjenju lokalnih vaskularnih komplikacija u odnosu na femoralni pristup i neinferiornost u ishodima učinkovitosti (19). Radijalna arterija je lako kompresibilna, nema pridružene vene niti živca, boravak u bolnici je kraći i bolesnicima je ugodniji i prihvatljiviji. Najčešća komplikacija transradijalnog pristupa je spazam radijalne arterije koji, ukoliko perzistira, zahtijeva promjenu pristupnog mjesta (20). I dalje postoji rizik tromboze radijalne arterije, prema literaturi u rasponu od 5 – 10 %, ali kako šaka ima dvojni arterijski opskrbu putem radijalne i ulnarne arterije, obično ne izaziva kliničke simptome ishemije u normalnim uvjetima (21,22). Cjeloviti endotel u krvnim žilama važan je za funkciju žile jer je pokazano da regulira vaskularni tonus (23). Istraživanjem koje su proveli Dawson i sur. pokazano je smanjenje smicanjem posredovane vazodilatacije kod bolesnika s koronarnom bolesti srca nakon koronarne angiografije (24). Druga studija na mladim i zdravim ispitanicima također je pokazala da nakon radijalne kateterizacije dolazi do smanjenja smicanjem posredovane vazodilatacije što je ukazivalo da postupak oštećuje funkciju arterije (25). Utvrđeno je da je oporavak endotelne funkcije nakon kateterizacije radijalne arterije mjeren protokom posredovane dilatacije (engl. *flow-mediated dilatation*, FMD) uslijedio nakon 3 mjeseca, dok se funkcija vaskularnih glatkih mišićnih stanica oporavlja za 1 – 6 mjeseci (25).

1.1.1.3. Kontrastna sredstva

Primjena kontrastnog sredstva koji sadržava jod omogućava vidljivost koronarne arterije pod rendgenskim zrakama, no istovremeno upravo razgradnja joda može generirati produkciju reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Sama interakcija kontrastnog medija s tkivom i stanicama može dovesti do stvaranja ROS što generira oksidacijski stres i

neravnotežu između stvaranja ROS i mogućnosti neutralizacije antioksidacijskim mehanizmima (26). Kontrastni medij ima citotoksično i citostatsko djelovanje i direktno je toksično za tubularne epitelne stanice bubrega (27).

Kontrastna sredstva u upotrebi su od 1950-ih i tradicionalno se dijele na ionska i neionska te monomerna i dimerna, što ih dalje dijeli prema osmolalnosti u odnosu na plazmu na hiper-osmolalna, nisko-osmolalna i izo-osmolalna. Hiper-osmolalna kontrastna sredstva (ionski monomeri) imaju osmolalnost 1400 do 2200 mOsm/kg vode što je 5-8 puta više u odnosu na plazmu. Danas se rijetko koriste jer je njihova primjena povezana s visokom incidencijom nuspojava, pogotovo kontrastom inducirane akutne bubrežne ozljede (engl. *Contrast-Induced Acute Kidney Injury*, CI-AKI). Danas su najčešće u upotrebi kontrastna sredstva koja sadrže više atoma joda u odnosu na molekulu kontrasta omjera 1,5-6:1 što je rezultiralo manjom osmolalnosti i višom viskoznosti te boljom radiološkom vidljivosti. Nisko-osmolalna (neionski monomeri i dimeri) kontrastna sredstva spadaju u drugu generaciju i osmolalnost im je 600 do 800 mOsm/kg vode što je 2-3 puta više od plazme, u širokoj su upotrebi zbog niske cijene i manjeg rizika za razvoj CI-AKI. Izo-osmolalna (neionski dimeri) kontrastna sredstva su treća generacija, osmolalnosti gotovo kao plazma (300 mOsm/kg vode) uz visoku viskoznost te je rizik od CI-AKI, kao i za nisko-osmolalna kontrastna sredstva, manji (28).

Najčešća nuspojava primjene kontrastnog sredstva je alergijska reakcija u vidu kožnog osipa dok je životno ugrožavajuća anafilaktička reakcija znatno rjeđa. Premedikacija kortikosteroidima (metilprednizolon, prednizolon, hidrokortizon) i antihistaminikom (difenhidraminom) sat vremena prije primjene kontrasta smanjuje rizik za alergijsku reakciju kod osoba koje su već imale alergijsku reakciju. Moguće su i odgođene kožne reakcije (osip, svrbež) koje počinju obično 6 do 12 sati iza davanja kontrasta i nisu životno ugrožavajuće (29). Poznato je da primjena jednog kontrasta može inducirati poremećaj rada štitne žlijezde, bilo hipertireozu ili hipotireozu zbog prisutnih slobodnih iona joda koji su biološki aktivni. Tireotoksikoza je također moguća, no rijetka. Posebno su rizični bolesnici s poznatom Gravesovom bolesti, multinodoznom gušom i tireotoksikozom, gdje je najbolje izbjegavati pretragu ili bolesnike blisko nadzirati. Nešto manjeg rizika za razvoj tireopatije vezane za primjenu kontrastnog sredstva su oni sa autoimunom upalnom bolesti štitnjače (Hashimotov tireoiditis) i stanjem nakon parcijalne tireoidektomije (30).

1.1.1.3.1. Kontrastom inducirana akutna bubrežna ozljeda

Od svih procedura koje zahtijevaju primjenu kontrastnog sredstva upravo su koronarna angiografija i perkutana koronarna intervencija najčešće povezane s akutnim pogoršanjem bubrežne funkcije nakon primjene kontrasta (31). Incidencija CI-AKI je prema literaturi u rasponu od 3 do 13% (32). Najvažniji rizični čimbenici za razvoj CI-AKI su visoka životna dob, komorbiditeti (šećerna bolest, bubrežna bolest, srčano zatajivanje, arterijska hipertenzija, polivaskularna bolest) i volumen primijenjenog kontrasta. Patogenetski mehanizmi nastanka CI-AKI posljedica su indirektnog djelovanja kontrastnog medija koji zbog svoje viskoznosti dovodi do hipoperfuzije bubrega i posljedično hipoksije i ishemije medule bubrega što rezultira produkcijom ROS te direktnog citotoksičnog učinka kontrasta na tubularne epitelne stanice s posljedičnom disfunkcijom mitohondrija, apoptozom, piroptozom, autofagijom i nastankom intersticijske upale (33). S druge strane, sam jodni kontrast može dovesti do prekomjerne produkcije ROS i smanjiti antioksidacijske zaštitne mehanizme suprimirajući antioksidacijske enzime s posljedičnim porastom oksidacijskog stresa i nastankom upale (34). Novija istraživanja ukazuju na epigenetske regulatorne čimbenike, kao što je mikroRNA, koji imaju ulogu u citotoksičnom učinku kontrasta i produkciji ROS (35).

Prema KDIGO smjernicama (engl. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*) CI-AKI je definiran prisutnošću jednog od sljedećih kriterija nakon intravaskularne primjene kontrasta (36):

1. Apsolutni porast kreatinina za 0,3 mg/dL (26,5 μ mol/L) ili više unutar 48 sati od primjene kontrasta
2. Porast serumskog kreatinina najmanje 50% unutar 7 dana nakon davanja kontrasta
3. Diureza manja od 0,5 ml/kg tjelesne težine/sat koja perzistira najmanje 6 sati nakon procedure s kontrastnim sredstvom.

Iako su pojedine studije koje su uspoređivale izo-osmolalna i nisko-osmolalna kontrastna sredstva rezultirale superiornošću izo-osmolalnih kontrasta u odnosu na pojavu CI-AKI, studije i meta-analize koje su uslijedile nisu uspjele to potvrditi te je stav većine stručnih društava da se obje vrste kontrasta mogu koristiti s preporukom primjene što manjeg volumena, dok su se istovremeno istraživanja pomaknula prema medikamentoznim preventivnim mjerama (37–42). U istraživanju koje su proveli Chen i sur., povećanje volumena izo-osmolalnog kontrasta jodiksana za 100 ml bilo je povezano s povećanim rizikom akutne bubrežne ozljede za 16%,

dok strategija redukcije volumena kontrasta nije značajno utjecala na rizik akutne bubrežne ozljede kod bolesnika koji su bili podvrgnuti elektivnoj PCI (43).

1.1.1.3.2. Rana bubrežna ozljeda

Iako su smjernice jasne, većina bolesnika koji se podvrgavaju elektivnoj koronarnoj angiografiji i perkutanoj koronarnoj intervenciji otpušta se iz bolnice nakon 24 do 48 sati te zbog kratke hospitalizacije ne mogu zadovoljiti kriterije CI-AKI. Odgovarajuća hidracija bolesnika prije i nakon procedure, bilo parenteralno ili peroralno, je za sada jedina mjera prevencije CI-AKI (44) te se kao takva i primjenjuje u svakodnevnoj praksi. Prema smjernicama Europskog kardiološkog društva kod bolesnika s umjerenom i teškom kroničnom bubrežnom bolesti preporučena je parenteralna hidracija fiziološkom otopinom 1 – 1,5 ml/kg tjelesne težine 12 sati prije i 24 sata iza PCI (45). Upravo hidracija dovodi do smanjenja vrijednosti kreatinina u serumu nakon CA i PCI u odnosu na bazalnu vrijednost prije procedure. Zbog istog razloga vrijednost procijenjene brzine glomerularne filtracije (engl. *estimated Glomerular Filtration Rate*, eGFR) pri normalnoj funkciji bubrega iza procedure poraste. Čini se da je odsustvo smanjenja vrijednosti serumskog kreatinina u ranom periodu iza koronarne angiografije vrlo rani i osjetljivi pokazatelj narušene funkcije bubrega i rizika za CI-AKI. U istraživanju koje su proveli Ribichini i sur. minimalni porast (5–10%) vrijednosti serumskog kreatinina 12 sati iza davanja kontrastnog sredstva bio je najosjetljiviji pokazatelj rizika za CI-AKI, a također i pokazatelj bubrežnog oštećenja 30 dana iza procedure s kontrastnim sredstvom (46).

1.1.1.4. Rendgensko zračenje

Rendgensko zračenje je neophodno kako bi se vizualizirale koronarne arterije tijekom koronarne angiografije i perkutane koronarne intervencije. Kardiološki kateterizacijski laboratoriji obično su opremljeni uređajem koji ima mogućnost spremanja snimke na dva načina: fluorografija s opcijom spremanja snimke i cineangiografija. Fluorografija izlaže bolesnika manjoj dozi zračenja uz posljedično i slabiju rezoluciju slike, dok je kod cineangiografije obrnuto, odnosno viša je doza zračenja i bolja rezolucija. Negativni učinci rendgenskog zračenja direktno su u vezi s dozom zračenja i posljedičnim razvojem kožnih

promjena pa sve do nastanka zloćudnih tumora (47). Smrt stanice uzrokovana ionizirajućim rendgenskim zračenjem obično se klasificira u indukcijsku i proliferacijsku smrt, dok su molekularni mehanizmi smrti posljedica apoptoze, nekroze, autofagije, imunološki posredovane smrti, ferroptoze i piroptoze, u konačnici ukoliko je doza dovoljno velika rendgensko zračenje uzrokuje fizičko razaranje stanice (48). Brojna istraživanja pokazala su da prilikom izlaganja rendgenskom zračenju dolazi do povećane produkcije ROS i smanjena antioksidacijskih enzima (49).

U istraživanju koje su proveli Jaillet i sur., ionizirajuće zračenje je dovelo do porasta oligomanoznog tipa N-glikana na račun kompleksnog tipa N-glikana, smanjenja glikozaminoglikana u glikokaliksu i promijenjene ekspresije glikozilacijskih gena u endotelnim stanicama, te time endotelni glikom i ekspresija adhezijskih molekula biva promijenjena djelovanjem ionizirajućeg rendgenskog zračenja, što u budućnosti može postati jedan od terapijskih ciljeva (50). Na animalnom modelu pokazana je promjena glikozilacije pod utjecajem niske doze ionizirajućeg zračenja s pretežito kompleksnim tipom N-glikana koji ima terminalno pozicionirane fukoze i sijalinsku kiselinu (51). Iako invazivna kardiologija predstavlja manji udio medicinskih procedura koje koriste ionizirajuće zračenje, upravo ove procedure doprinose najvećem udjelu ukupne isporučene doze zračenja u medicinskoj praksi. (52,53). Nadalje, pokazano je da je izlaganje malim dozama rendgenskog zračenja povezano s višim rizikom kardiovaskularne smrti i u odnosu na populaciju žrtava koje su preživjele atomski napad u Japanu (54). Meta analiza 93 studije ukazala je na povezanost doze zračenja i kardiovaskularne bolesti kao i na razlike između akutnog ili kroničnog izlaganja (55).

U današnje vrijeme smatra se potrebnim smanjiti izlaganje bolesnika rendgenskom zračenju te se fluorografija s opcijom spremanja slike počela naširoko koristiti. Primjena zaštitne opreme za bolesnike i kontinuirana edukacija osoblja u kardiološkim kateterizacijskim laboratorijima danas rezultira smanjenjem doze rendgenskog zračenja s očuvanom kvalitetom slikovnog prikaza (56).

1.2. Oksidacijski stres i endotelna funkcija

Jedna od uloga očuvanog endotela je omogućavanje vazorelaksacije kao odgovor na vaskularni stres (57). Mehanički, kemijski i humoralni agensi potiču reaktivnost endotela koji putem nekoliko medijatora, prvenstveno dušikovog oksida (engl. *Nitric Oxide*, NO), održava vazomotorni tonus i strukturalni integritet. NO ima važnu ulogu u endogenoj antioksidacijskoj

aktivnosti zbog svojih vazodilatatorskih, protuupalnih i antiagregacijskih svojstava (58). N-glikani iz endotelnih stanica mogu imati protektivni i antioksidacijski učinak, jer mogu ukloniti ROS i prevenirati oštećenje endotelnog sloja (59).

Endotelna disfunkcija uzrokovana oksidacijskim stresom početni je događaj u patogenezi mnogih kardiovaskularnih bolesti. Neravnoteža između ROS, biodostupnosti NO i antioksidacijskih elemenata, što nazivamo oksidacijskim stresom, potiče endotelnu disfunkciju karakteriziranu promijenjenom modulacijom vazomotornog tonusa i oštećenim protuupalnim i antitrombotskim karakteristikama endotela (60). Smanjena biodostupnost NO može biti uzrokovana povećanom degradacijom NO uzrokovanom ROS ili smanjenom ekspresijom/aktivacijom endotelne NO sintaze. ROS su produkti normalnog staničnog aerobnog metabolizma koji se stvaraju tijekom redukcije kisika i imunološkog odgovora, a uključuju nestabilne slobodne radikale kao što su superoksidni anion, lipidni radikali, vodikov peroksid, hipoklorna kiselina i peroksinitrit (61). U niskim do umjerenim koncentracijama ROS izvršavaju fiziološke funkcije kao što je signaliziranje, ali kada njihova prekomjerna proizvodnja nadmaši antioksidacijski obrambeni mehanizam dolazi do oksidacijskog oštećenja DNA, proteina, ugljikohidrata, lipida i drugih makromolekula, dovodeći do oksidacijskog stresa (62).

Prvi korak endotelne disfunkcije zove se endotelna aktivacija, odnosno ekspresija abnormalnih protrombotskih i proupalnih karakteristika endotelnih stanica što dovodi do kroničnih promjena (63). Dosadašnja istraživanja pokazala su da tijekom koronarne angiografije dolazi do porasta oksidacijskog stresa povezanog s endotelnom disfunkcijom i posljedičnog razvoja upale, vazokonstrikcije i mobilizacije stanica imunskog sustava. Suvišak ROS tijekom i nakon koronarne angiografije doprinosi oksidaciji lipida, proteina i DNA u vaskularnom endotelu. Oksidacijsko oštećenje inducirano pretragom ima potencijal pogoršanja već postojeće kardiovaskularne bolesti i pridonosi nastanku nove lezije ili akutizaciji od ranije postojeće lezije. Stupanj oksidacijskog stresa može i individualno varirati, a važni su čimbenici količina primijenjenog kontrasta, duljina procedure i opće stanje bolesnika.

Istraživanje povezanosti koronarne angiografije i oksidacijskog stresa započelo je ispitivanjem prisutnosti i razine ROS te su kroz vrijeme u uporabu ušle dodatne metode kvantificiranja direktnih i indirektnih pokazatelja oksidacijskog stresa, kao što je dokazivanje oštećenja DNA u cirkulirajućim limfocitima bolesnika nakon perkutane transluminalne koronarne angioplastike (engl. *Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty*, PTCA) pomoću alkalnog komet testa i mikronukleus testa (64).

Rezultati takvih istraživanja upućivali su na oksidacijsko oštećenje DNA nakon PTCA, s obzirom na prisutnost mikronukleusa kod pacijenata podvrgnutih PTCA u usporedbi s onima koji su bili podvrgnuti dijagnostičkoj koronarnoj angiografiji. U sličnim studijama dokazano je kako PTCA inducira apoptozu, a također se kao jedan od mehanizama spominje i ishemijsko-reperfuzijska ozljeda kao induktor oštećenja DNA i kromosoma u cirkulirajućim leukocitima (65).

Međutim, i sama invazivna dijagnostička procedura može izazvati oksidacijski stres i proupalno stanje uslijed endotelne disfunkcije i akutne ozljede arterije. Mjerenje pokazatelja oksidacijskog stresa kod pacijenata nakon elektivne perkutane koronarne intervencije i nakon dijagnostičke koronarne angiografije pokazalo je u obje skupine bolesnika značajno povećanje biljega oksidacijskog stresa u odnosu na bazalne vrijednosti (25).

Invazivne angiografske metode koriste kontrastna sredstva koje imaju citotoksični i citostatski učinak te povećavaju koncentraciju ROS s posljedičnim oštećenjem DNA. U studijama je provedeno ispitivanje oštećenja DNA u cirkulirajućim limfocitima prije i nakon elektivne dijagnostičke koronarne angiografije te je zabilježen značajan porast oštećenja DNA nakon procedure, što je još naglašenije kod bolesnika s koronarnom bolešću kod kojih razina oštećenja DNA korelira s težinom bolesti (66).

S obzirom na dokazani oksidacijski stres izazvan koronarografijom, izvedene su i studije koje su ispitivale utjecaj antioksidansa na smanjenje reperfuzijskog oštećenja miokarda ROS. U istraživanjima je, kao najčešći antioksidans, korišten vitamin C upotrebom kojeg je došlo do značajnog pada koncentracije pokazatelja oksidacijskog stresa nakon koronarne angiografije (67).

Novije studije uzimale su u obzir sve više parametara, kao što je dinamika oksidacijskog stresa kroz određeni vremenski interval, te utjecaj akumulacije doze zračenja. Tako su Szewczyk-Golec i sur. u svom istraživanju primijetili da se razine antioksidansa ne razlikuju značajno neposredno nakon procedure s obzirom na bazalne vrijednosti, ali je zato zabilježen značajan porast 14 dana nakon procedure, neovisno o tome je li se radilo o intervenciji ili dijagnostičkoj proceduri (68).

Istraživanje koje su proveli Vukajlović i sur. pomoću komet testa na limfocitima iz periferne krvi potvrdilo je veću razinu oštećenja DNA kod bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u usporedbi sa zdravim kontrolama, a također i veću razinu oštećenja DNA i kromosoma nakon PCI u usporedbi s bazalnim razinama koja je korelirala i bila proporcionalna s dozom zračenja tijekom PCI (66).

1.3. Uloga glikokaliksa i glikana

Endotelne stanice u krvnim žilama su obložene tankim slojem negativnog naboja koji je bogat glikanima i naziva se glikokaliks (69). Ideja o tankom endotelnom kapilarnom sloju se počela razvijati još 1940. godine, no nije ga bilo moguće vizualizirati prije upotrebe elektronskog mikroskopa 1966. godine (70–72). Općenito u živim organizmima, pa tako i kod čovjeka glikokaliks ima ulogu barijere između lumena i intime krvne žile, isto tako je važan za prijenos informacija između ta dva odjeljka te na taj način štiti organizam od invazije raznih patogena, te također, regulira adheziju leukocita i prevenira trombozu (73–76).

Sastavnice glikokaliksa sintetiziraju se u endotelnim stanicama i bivaju izlučene na površinu stanice u strukturi kojoj skelet čine proteoglikani, glikoproteini i glikolipidi, dok se glikozaminoglikani vežu kao bočni lanci na jezgru proteina (62,63). Zastupljeno je pet tipova glikozaminoglikana, od kojih heparan sulfat ima najviši udio i čini 50 do 90%, potom slijede hondroitin sulfat i hijaluronska kiseline te manje zastupljeni keratan sulfat i dermatan sulfat (78). Strukturni glikoproteini su adhezijske molekule i uključuju obitelji selektina i integrina koji posreduju između endotelnih stanica, leukocita, trombocita i izvanstaničnog matriksa te molekule superobitelji imunoglobulina sa svojim transmembranskim domenama kao što su međustanična adhezijska molekula 1 i 2 (engl. *Intercellular Adhesion Molecule 1 and 2*, ICAM 1 i 2), vaskularna adhezijska molekula 1 i 2 (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1 and 2*, VCAM 1 i 2) i trombocitna/endotelna adhezijska molekula 1 (engl. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*, PECAM 1) (79).

Glikani su vezani na proteine (proteoglikani i glikoproteini) i lipide (glikolipidi) u gelu glikokaliksa, a mogu biti vezani i za RNA i nalaziti se na površini stanice. Uključeni su u skoro sve molekularne interakcije na staničnoj površini i međustaničnom prostoru, a svojom su građom povezani s fiziologijom organizma i patofiziologijom bolesti (80). Sastav glikokaliksa proizlazi iz brojnih interakcija i preklapanja enzimskih puteva te je odraz procesa uključenih u metabolizam stanice i nije primarni produkt gena (81).

Glikozilacija je proces kojim dolazi do vezivanja složenih šećernih struktura na proteine i lipide djelovanjem enzima glikoziltransferaza (82). To je najčešća kotranslacijska i postranslacijska modifikacija proteina. Razlikujemo dva osnovna tipa vezivanja: N-glikozilacija i O-glikozilacija koje se odvijaju u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu; te rjeđe zastupljene C-glikozilacija i S-glikozilacija i na kraju ne-enzimska glikacija (83–85). N-glikozilacijom se kovalentno vežu N-acetilglukozamin (GlcNAc) s dušikom iz amida (NH₂) aminokiselinskog ostatka asparagina (Asn) te tako nastaju N-vezani glikani (GlcNAcβ1-Asn).

Opisano je pet tipova N-glikanskih veza, od kojih je GlcNAc β 1-Asn najčešći tip N-glikanske veze (86). O-vezani glikani nastaju vezivanjem najčešće N-acetilgalaktozamina (GalNAc) s kisikom iz hidroksilne skupine (OH) aminokiselinskih ostataka serina (Ser) ili treonina (Thr), a rjeđe se radi o vezivanju s N-acetilglukozaminom (GlcNAc), manozom i fukozom (82).

Strukturno u svojoj jezgri N-vezani glikani imaju dva N-acetilglukozamina (GlcNAc) od kojih je jedan na svom kraju vezan za asparagin (Asn) dok se na drugi nastavlja grananje u svom osnovnom obliku s tri manoze (Man3GlcNAc2Asn). Nadogradnjom grana na osnovnu strukturu (Man3GlcNAc2Asn) nastaju tri tipa N-glikana: oligomanozni, kompleksni i hibridni tip. U oligomanoznom tipu su na osnovni oblik dodane manoze. Kompleksni tip ima grane koje počinju s N-acetilglukozaminom, dok je hibridni tip kombinacija prethodna dva tipa tako da ima jednu granu koja počinje s N-acetilglukozaminom i drugu granu s manozama (87). Slijed N-glikoziliranog proteina je opisan formulom Asn-X-Ser/Thr, gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro) (88). U jednom proteinu može biti vezano više različitih glikana te tako nastaju nove i drugačije glikoforme iste molekule bilo da se radi o makroheterogenosti – vezanje glikana na različita glikozilirajuća vezna mjesta na proteinu ili mikroheterogenosti – vezanje različitih glikana na glikozilirajućem veznom mjestu na proteinu (89,90). Upravo su promjene koje rezultiraju različitim glikoformama molekula u fokusu istraživanja nastanka i razvoja bolesti kao potencijalnih biljega za otkrivanje, prognozu i liječenje bolesti (91).

U ljudskoj plazmi oko polovica ukupnih proteina je N-glikozilirana što se odražava na sklapanje, topivost, razgradnju, izlučivanje i aktivnost proteina i govori o biološkoj važnosti samog procesa (92). Glikozilaciji podliježu svi proteini plazme i albumin kao najzastupljeniji plazma protein, za kojeg se dugo smatralo da je neglikozilirani plazma protein, no albumin podliježe nekanonskoj N-glikozilaciji na Asn¹²³ i Asn⁶⁸ (93). U populaciji različitih osoba i glikozilacija proteina je različita, no kod jedne jedinice je stabilna te se u organizmu mijenja ovisno o dobi i stilu života, i različita je ovisno o spolu (94–96). Lako dostupni biološki uzorci za analizu glikozilacije proteina su plazma, serum i slina.

Rane promjene IgG N-glikana sa smanjenom galaktozilacijom i sijalizacijom su zabilježene godinama prije dijagnoze reumatoidnog artritisa (97). Patofiziološka povezanost bolesti s izmijenjenom glikozilacijom proteina opisana je kod nastanka zloćudnih, autoimunih i upalnih bolesti (98–100). Molekula imunoglobulina, pa tako i IgG, sastoji se od dva teška i dva laka lanca, koja se dijele na regiju koja veže antigen (engl. *Fragment antigen-binding*, Fab) i regiju s kristalizirajućim fragmentima kojom se veže za Fc receptor na stanici (engl. *Fragment crystallizable*, Fc), tako da na jednu Fc regiju dolaze dvije Fab regije. Tipično vezno mjesto za

N-glikane je Fc regija na teškim lancima IgG. Fc regija IgG je u interakciji s Fc receptorom na površini stanice te je bilo koja promjena u obrascu glikozilacije povezana s izmijenjenim imunološkim odgovorom (101). Glikozilacija Fab regije je opisana u 15 do 25% slučajeva (102,103). Osim brojnih bolesti u kojima je dokumentirana promijenjena glikozilacija IgG, također su fiziološki procesi kao starenje i trudnoća povezani s promijenjenim obrascem glikozilacije pa je tako starenje negativno povezano s galaktozilacijom dok u trudnoći raste galaktozilacija i sijalizacija IgG, moguće radi smanjenja imunološkog odgovora majke na dijete (104).

Poznato je da su predilekcijska mjesta za razvoj aterosklerotskog plaka u krvnim žilama upravo ona na kojima je promijenjeni tok krvi zbog bifurkacije ili tortuoziteta krvne žile što dovodi do povećanog stresa mehaničkom frikcijom krvi na vaskularnu stijenku uslijed sile smicanja. Na takvim mjestima dokazano je stanjenje sloja glikokaliksa zbog povećane aktivnosti proteolitičkog enzima šedaze koja cijepa strukturne membranske proteine (105). Nadalje, kod bolesnika koji imaju koronarnu bolest srca utvrđena je smanjena debljina endotelnog glikokaliksa i viša razina hijaluronske kiseline u koronarnim arterijama te je promjena bila u korelaciji s proširenošću bolesti, dok je u bolesnika s povišenim vrijednostima krvnog tlaka oštećenje glikokaliksa bilo u korelaciji s krutošću arterija (106,107). U istraživanju koje su proveli Menni i sur. je pokazano da je promjena N-glikana IgG povezana s povećanim rizikom za razvoj aterosklerotske kardiovaskularne bolesti, na način da su sržno fukozilirani N-glikani IgG bili povezani s višim rizikom za razvoj bolesti, dok je protektivni i protuupalni učinak imala sijalizacija N-glikana IgG (108).

Promjene glikoma su zabilježene kod bolesnika s akutnim srčanim infarktom, bez obzira radi li se o STEMI ili NSTEMI srčanom infarktu, u odnosu na populaciju bez infarkta, rezultati koji su bili usporedivi s uobičajenim biljezima za dijagnozu i prognozu bolesti kao što su visoko osjetljivi troponin T (engl. *High Sensitivity Troponin T*, hs troponin T) i N-terminalni prohormon B tipa natriuretskog peptida (engl. *N-terminalni proBrain Natriuremic Peptide*, NTproBNP) (109). Istraživanje s glikanima na populaciji bolesnika sa šećernom bolesti tip 2 ukazalo je i na spolne razlike prema profilu N-glikana IgG i riziku za kardiovaskularnu bolest (110).

Ispravna glikozilacija iznimno je važna za funkciju bubrega. Prva prepreka koja zaustavlja propuštanje proteina i makromolekula iz glomerula je sloj endotelnih stanica koji u sebi ima pore veličine 60 - 80 nm (111). Takve endotelne pore su prevelike za albumine (dijametar 3,6 nm) koji bivaju zaustavljeni slojem glikokaliksa koji oblaže endotelne stanice i pore što čini glomerularnu membransku barijeru visoko selektivnom (112).

Pokazano je da promijenjena aktivnost enzima heparanaze koja razgrađuje heparan sulfat prisutan u glikokaliksu što dovodi do povećane propusnosti glomerularne membrane, a također je dosadašnjim istraživanjima potvrđena povezanost ovog enzima s razvojem fibroze bubrega, pogotovo kod dijabetičke nefropatije (113,114). Esposito i sur. su u svom istraživanju otkrili da je izmijenjena N-glikozilacija proteina nefrina iz podocita rezultirala promjenom citoskeleta s posljedičnim poremećajem u filtracijskoj funkciji (115). Na animalnom modelu mutacija enzima uključenih u sintezu sijalinske kiseline uzrokovala je cijepanje glomerularne membrane s posljedičnom proteinurijom (116). Istraživanje koje su proveli Barrios i sur. je identificiralo promjene IgG N-glikozilacije koje su bile povezane s bubrežnom bolesti umjerenog stupnja (117).

1.4. Inhibitori natrij-glukoza kotransportera 2 (SGLT2 inhibitori)

Inhibitori natrij-glukoza kotransportera 2 (engl. *Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors*, SGLT2i) su novi lijekovi za snižavanje glukoze u krvi koji inhibiraju reapsorpciju glukoze u proksimalnom tubulu u bubrezima. Uz snižavanje glukoze u krvi, dodatni učinci su im redukcija tjelesne težine i visceralne pretilosti, snižavanje tlaka i poboljšanje lipidnog profila (118).

U organizmu su dva glavna natrij-glukoza kotransportera SGLT1 i SGLT2 (engl. *Sodium-glucose cotransporter 1/2*), oba se nalaze u bubregu. SGLT2 je najviše zastupljen u bubregu (S1 i S2 segment proksimalnog tubula) i zaslužan je za 90% renalne reapsorpcije glukoze, dok SGLT1 dominira u tankom crijevu i udio renalne reapsorpcije glukoze je do 10% (S3 segment proksimalnog tubula) (119). Izuzev toga, SGLT2 nađen je u mozgu, jetri štitnjači, skeletnim mišićima i gušterači, a SGLT1 u skeletnim mišićima, srcu, dušniku, mozgu, prostati i testisima (120). Gen koji kodira SGLT2 je *SLC5A2* (engl. *Solute carrier family 5, member 1*) na kromosomu 16p11.2, a gen za SGLT1 je *SLC5A1* na kromosomu 22p13.1 (121).

Prvi inhibitor SGLT2 koji je ušao u upotrebu je dapagliflozin u dozi od 10 mg, a koji se dominantno izlučuje bubregom i zahtijeva redukciju doze za 50% kod bolesnika sa zatajivanjem jetre, nakon njega je slijedio empagliflozin, najselektivniji za SGLT2 receptore s maksimalnom dnevnom dozom od 25 mg i dvojnim putem eliminacije lijeka iz organizma – 55% bubreg i 40% jetra (122).

U istraživanjima s kardiovaskularnim ishodima kod bolesnika sa ili bez šećerne bolesti primjena SGLT2i bila je povezana sa smanjenjem kardiovaskularne i ukupne smrtnosti i hospitalizacija zbog srčanog zatajivanja, a pokazan je i pozitivan učinak u očuvanju funkcije bubrega u

studijama s renalnim ishodima kao što su smanjenje albuminurije i incidencije bubrežnog zatajivanja (123,124). Mehanizam tako raširenog pozitivnog učinka u smislu preživljavanja i bolje funkcije organa predmnijeva i antioksidacijsko djelovanje. Predloženo je nekoliko mehanizama odgovornih za protektivni renalni učinak SGLT2i: smanjen oksidacijski stres u proksimalnim tubulima bubrega, redukcija upale i fibroze, smanjena aktivacija simpatičkog živčanog sustava i poboljšana funkcija mitohondrija (125). Budući da SGLT2 nije eksprimiran u ljudskom srcu, predloženi mehanizmi kardioprotektivnog učinka uključuju osmotsku diurezu, natriurezu, poboljšanu renalnu funkciju, sniženje krvnog tlaka, poboljšanu vaskularnu funkciju, reduciranu produkciju proinflamatornih citokina i smanjenje razine urične kiseline (126). Dodatno, SGLT2i imaju sposobnost redukcije oksidacijskog stresa izazvanog visokim razinama glukoze u srcu i bubrezima te kao potencijalni antioksidansi pružaju direktni renoprotektivni i kardioprotektivni učinak. Uz to, smanjuju produkciju slobodnih radikala i povećavaju ekspresiju antioksidacijskih sustava kao što su superoksid dismutaza i glutathion peroksidaza (127).

Oksidacijski stres aktivira mnoštvo transkripcijskih faktora koji dovode do ekspresije kemokina i proupalnih citokina. Redukcijom oksidacijskog stresa SGLT2i smanjuju upalu kroz regulaciju transkripcijskih čimbenika spomenutih kemokina i citokina. Uz ove direktne protuupalne učinke, SGLT2i smanjuju upalu regulacijom aktivnosti renin-angiotenzin sustava, promjenom tkivne hemodinamike i ravnoteže redoks sustava (128).

Istraživanja antioksidacijskog djelovanja SGLT2i novijeg su datuma i započela su prvenstveno na animalnim dijabetičkim modelima i staničnim kulturama (129). Protektivni učinak SGLT2i na staničnoj kulturi mišjih endotelnih stanica pokazan je kroz smanjenje unosa glukoze u stanice i posljedične proizvodnje ROS u mitohondrijima (130). Učinak empagliflozina na biljege oksidacijskog stresa istražen je i na srčanom tkivu dijabetičkih miševa, gdje je zabilježen porast lipidnih hidroperoksida i malondialdehida uz smanjenje razine superoksid dismutaze i glutathion peroksidaze kod netretiranih miševa u usporedbi s onima tretiranim empagliflozinom (131). U istoj je studiji pokazano da tretman empagliflozinom suprimira nastanak fibroze inhibicijom TGF- β /SMAD signalnog puta. Pozitivan učinak empagliflozina potvrđen je u studiji na dijabetičkim srčanim endotelnim stanicama mikrovaskulature, gdje je tretman empagliflozinom smanjio razine mitohondrijskih i unutarstaničnih ROS (132). Kliničke studije započele su na bolesnicima sa srčanim zatajenjem gdje je zabilježen pozitivan učinak SGLT2i na tijek i prognozu bolesti, iako s još uvijek nerazjašnjenim mehanizmom. U istraživanju koje su proveli Kondo i sur. pokazano je kako SGLT2i reduciraju aktivnost NADPH oksidaze putem

AMPK/Rac1 signalnog puta te suprimiraju apoptotične i upalne kaskade u humanom miokardu (133).

Ocjena rada
u tijeku

2. CILJ RADA

Koronarna angiografija je dijagnostička metoda koja je sama po sebi invazivna i izaziva stres kod bolesnika te narušava redoks homeostazu i bubrežnu funkciju.

Glavni cilj istraživanja je utvrditi može li jedna doza SGLT2 inhibitora empagliflozina primijenjenog prije elektivne dijagnostičke koronarne angiografije smanjiti stres kod bolesnika.

Sekundarni ciljevi su:

1. Odrediti promjenu ukupnog oksidacijskog i antioksidacijskog kapaciteta plazme prije i poslije pretrage.
2. Odrediti oštećenje DNA prije i poslije pretrage.
3. Odrediti promjenu glikozilacije ukupnih proteina plazme i imunoglobulina G (IgG).
4. Odrediti parametre bubrežne funkcije prije i poslije pretrage.

3. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Primjena jedne doze SGLT2i empagliflozina prije elektivne koronarografije dovest će do smanjenja oksidacijskih oštećenja te smanjenja stupnja rane bubrežne ozljede u odnosu na bazalnu funkciju čime će se zaštititi bolesnik i anulirati oštećenja uzrokovana invazivnom pretragom.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

Rad je izveden u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Ispitivanje je provedeno prospektivno i u skladu sa smjernicama dobre kliničke prakse (Good clinical practice, European Union Directive 2001/20/EC) i Helsinškom konvencijom te je dobilo suglasnosti od Etičkog povjerenstva Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ (br.04000000/23-65), Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu i Bioetičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Istraživanje je uključilo 60 bolesnika (starosti 18 godina i više) upućenih na elektivnu koronarnu angiografiju u Opću bolnicu „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu od 5. listopada 2023. godine do 29. siječnja 2024. godine.

Isključni kriteriji bili su: (1) kronično bubrežno zatajivanje ($eGFR < 30 \text{ ml/min/1,73 m}^2$), (2) teška srčana insuficijencija (NYHA IV), (3) akutni koronarni sindrom ili elektivna PCI unazad 6 mjeseci, (4) aktivna maligna bolest, (5) akutne upalne bolesti, (6) autoimuna bolest, (7) kronična terapija SGLT2i, (8) pacijenti sa šećernom bolesti, (9) pacijenti sa sindromom zatajivanja srca s reduciranom ejekcijskom frakcijom i (10) očekivano trajanje života manje od 12 mjeseci.

Ispitanicima su na njima razumljiv način objašnjeni ciljevi, plan istraživanja i njihova uloga u istraživanju. Svaki ispitanik je imao dovoljno vremena da na miru pročita informirani pristanak i nakon što je odlučio da je suglasan, samostalno je potpisao i datirao informirani pristanak.

Nakon potpisivanja informirane suglasnosti ispitanici su randomizacijom podijeljeni u dvije skupine: (1) ispitivana skupina (standardna skrb + primjena jedne doze empagliflozina od 10 mg peroralno u medicinski kontroliranim uvjetima 2 sata prije koronarografije) i (2) kontrolna skupina (standardna skrb).

Potom se pristupalo ispunjavanju upitnika osmišljenog za ovo istraživanje koji uključuje navike, datum zadnje menstruacije za žene, povijest bolesti i kroničnu terapiju lijekovima. Izostanak menstrualnog krvarenja 12 mjeseci i više je bio kriterij za postmenopauzu. U obrazac liste provjere koji je osmišljen za istraživanje upisivani su: broj randomizacije, spol, dob, inicijali ispitanika, tjelesna težina (kg), tjelesna visina (cm), indeks tjelesne mase (ITM, kg/m^2), vrijednosti krvnog tlaka (mmHg) i pulsa, podatke iz fizikalnog nalaza, EKG, vrijeme davanja premedikacije, postupak i vremena uzorkovanja krvi (t_0 , t_1 i t_2), vrijeme početka koronarne

angiografije, pristup i karakteristike procedure: (FT, DAP, vol. CM), obilježavanje, čuvanje i transport uzoraka na -80°C.

4.1.1. Uzorkovanje kliničkih parametara

Nakon ispunjavanja upitnika pristupilo se sakupljanju uzoraka za istraživanje.

Krvni tlak se mjerio nakon mirovanja od 5 minuta, izvršena su tri mjerenja u razmaku od jedne minute u sjedećem položaju na desnoj ruci. Vrijednost krvnog tlaka računala se kao srednja vrijednost drugog i trećeg mjerenja. Koristio se tlakomjer Omron M6 Comfort® s orukvicom 22 - 42 cm. Tjelesna težina i visina mjerile su se na najbližih 0,1 kg i 0,1 cm na SECA® vagi i visinomjeru. Indeks tjelesne mase (ITM) se računao kao omjer težine i visine² (kg/m²). Vrijednosti ≥ 25 kg/m² označavaju prekomjernu tjelesnu težinu dok vrijednosti ≥ 30 kg/m² označavaju pretilost.

Nakon toga svim se ispitanicima snimao elektrokardiogram (EKG) i postavljao periferni venski put (intravenska kanila, Vygonule V, PTFE, 20 G, vanjski dijametar 1,1 mm, duljine 32 mm, brzina protoka 60 ml/min) što je standardna procedura za sve bolesnike koji se podvrgavaju elektivnoj koronarnoj angiografiji.

Venska krv, natašte, uzorkovana je za bazalne (t₀) vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara: eritociti (E), hemoglobin (Hb), hematokrit (Htc), leukociti (L), trombociti (Tr), glukoza u plazmi (GUP), urea, kreatinin, kalij (K), natrij (Na), kloridi (Cl), bilirubin, aspartat-amino transferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), alkalna fofataza (AF), gama-glutamil transferaza (GGT), ukupni kolesterol (TC), lipoprotein niske gustoće (LDL), lipoprotein visoke gustoće (HDL), trigliceridi (Tg), željezo (Fe), nezasićeni kapacitet vezanja željeza (UIBC), ukupni kapacitet vezanja željeza (TIBC), feritin, visoko osjetljivi C-reaktivni protein (hs CRP), glikozilirani hemoglobin (HbA1c), visoko osjetljivi troponin I (hs troponin I), vitamin D, paratireoidni hormon (PTH), tireotropni hormon (TSH), ukupni kalcij (uCa), ionizirani kalcij (iCa), fosfati (P). Kompletna krvna slika je analizira na SYSMEX XN-1000® hematološkom analizatoru s fluorescentnom protočnom citometrijom. Vitamin D i hs troponin I su određivani kemiluminiscentnim imunokemijskim testom na ALINITY® imunokemijskom analizatoru (Abbott). Hemoglobin A1c u venskoj krvi određivao se na DxC 700 AU® biokemijskom analizatoru. Biokemijski parametri hs CRP, GUP, TC, Tg, HDL, LDL, Fe i UIBC određivali su se na biokemijskom dijelu integriranog ALINITY® sustava (Abbott).

Procjena bubrežne funkcije vršila se eGFR kalkulatorom CKD-EPI i izražena je u ml/min/1,73 m².

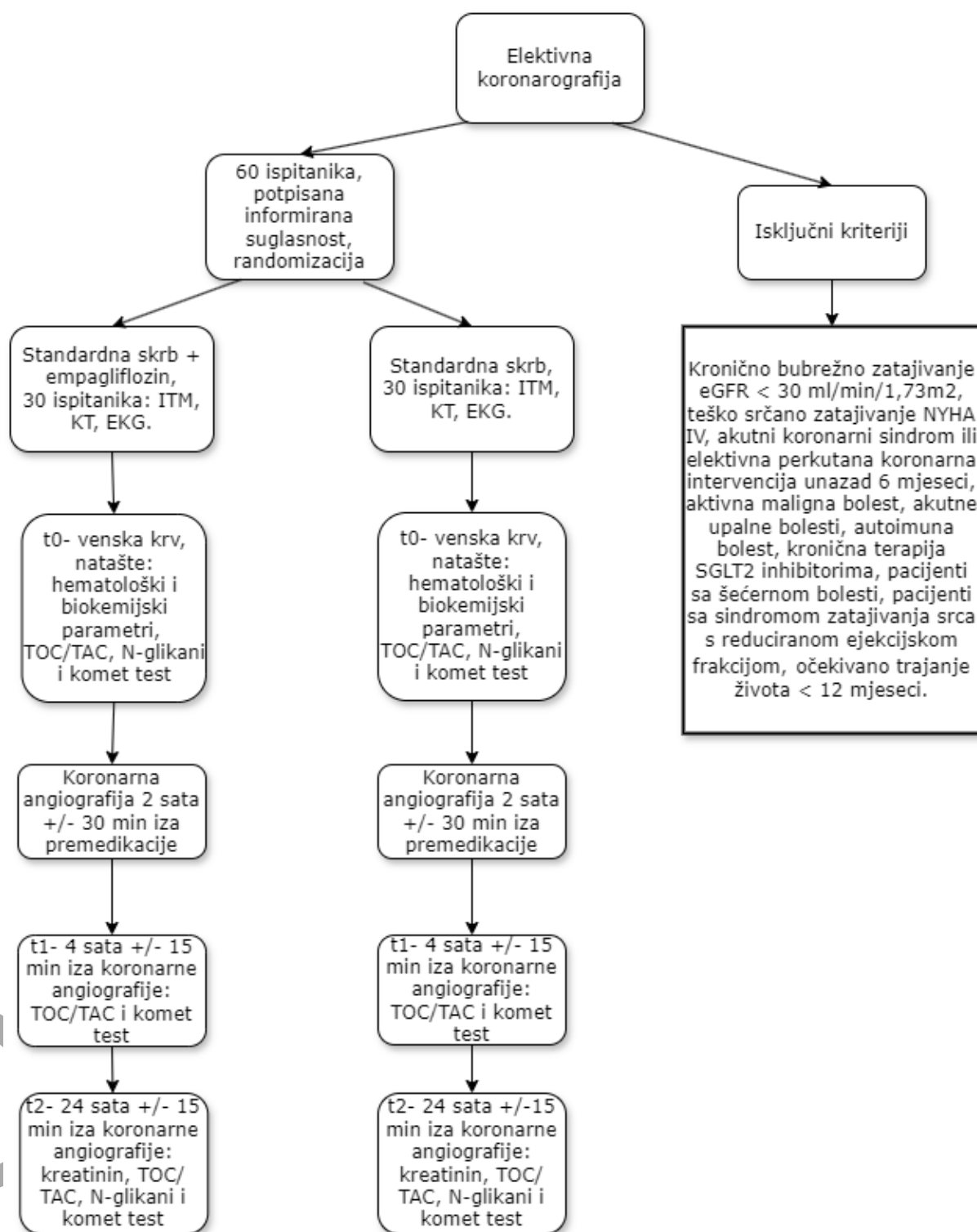
Iz bazalnog venskog uzorka separirala se plazma za određivanje ukupnog oksidacijskog kapaciteta (TOC, engl. *Total Oxidative Capacity*), ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC, engl. *Total Antioxidant Capacity*) i N-glikana IgG i ukupnih proteina plazme te puna krv za alkalni komet test.

Koronarna angiografija izvodila se standardno, transradijalnim ili transfemoralnim pristupom. Prije koronarografije svi su ispitanici dobili diazepam peroralno u dozi od 5 mg (uobičajena premedikacija). Koristile su se standardne dijagnostičke uvodnice i dijagnostički kateteri veličine 5 ili 6F. Za lokalnu anesteziju se standardno supkutano daje 1 ml 2% lidokainklorida. Kontrastni medij je bilo neionsko, dimerno, heksajodirano, vodotopivo kontrastno sredstvo (Visipaque 320 mg I/ml). Volumen utrošenog kontrasta po koronarnoj angiografiji prikazan je u mililitrima (ml). Doze zračenja koje su ispitanici primili tijekom koronarne angiografije (Siemens Artis Zee) mjerene su vremenom fluoroskopije u minutama (engl. *Fluoroscopy Time*, FT) i umnoškom doze i površine tijekom postupka u $\mu\text{Gy}/\text{m}^2$ (engl. *Dose Area Product*, DAP). Uvodnica se nakon dijagnostičke koronarne angiografije vadi odmah iza postupka.

Drugi uzorak venske krvi (t1) je uziman 4 sata (± 15 min) iza koronarne angiografije za TOC, TAC i komet test.

Treći uzorak venske krvi (t2) je uziman 24 (± 15 min) nakon koronarne angiografije za određivanje kreatinina, TOC, TAC, N-glikana IgG i ukupnih proteina plazme te komet test.

Tijek istraživanja s uključivanjem ispitanika i vremenskim točkama uzorkovanja krvi je prikazan na slici 2.

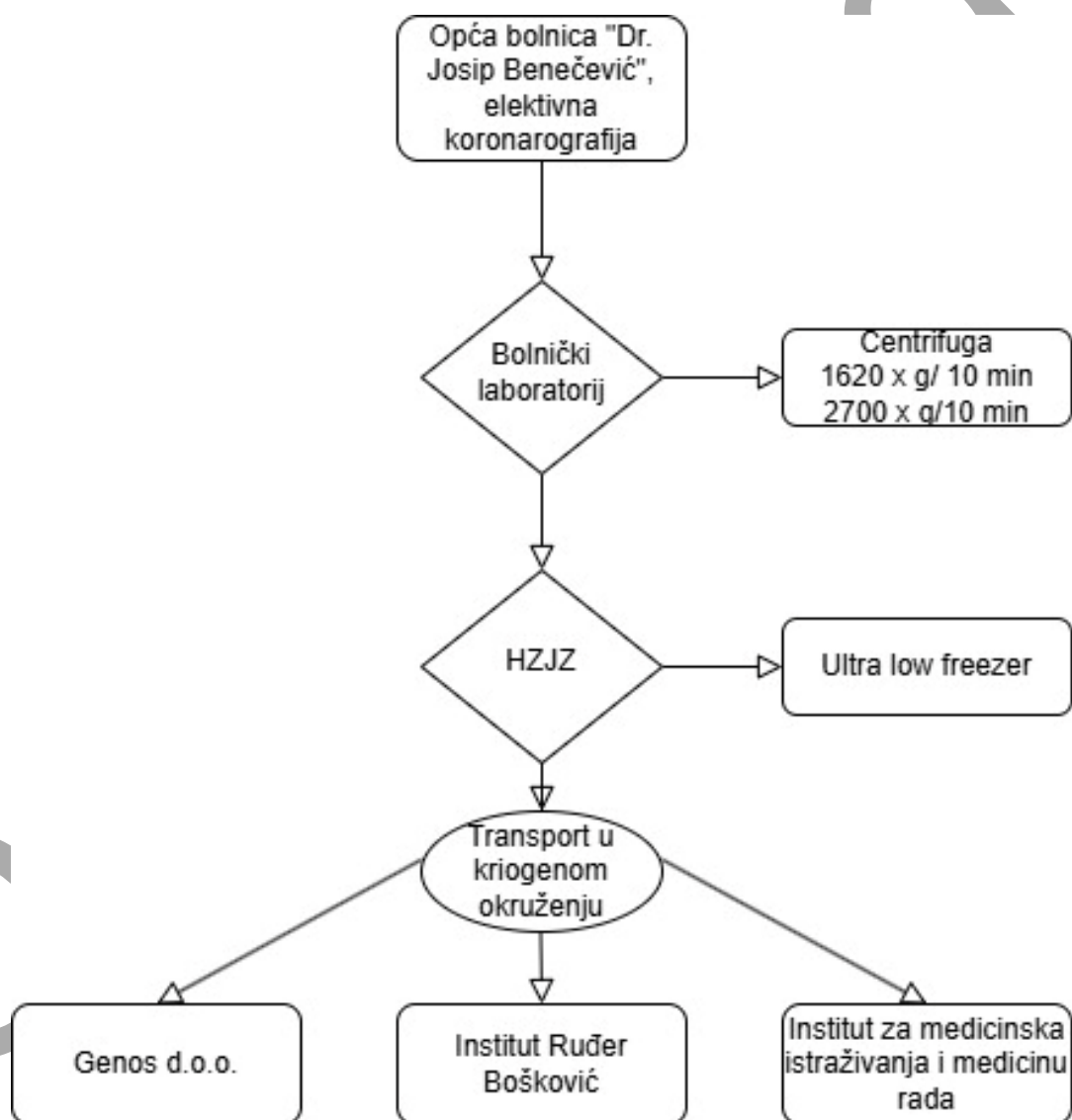


Slika 2. Dijagram prikazuje tijek provedenog istraživanja.

ITM = indeks tjelesne mase; KT = krvni tlak; EKG = elektrokardiogram; TAC = ukupni antioksidacijski kapacitet; TOC = ukupni oksidacijski kapacitet. Nacrtano pomoću alata draw.io.

Uzorci plazme i pune krvi za određivanje TOC, TAC, N-glikana i komet test zamrznuti su na -80°C. Kada su prikupljeni svi uzorci, zajedno su transportirani u kriogenom okruženju na -80 °C u Institut Ruđer Bošković (TOC, TAC), Genos d.o.o. (N-glikani IgG i ukupni proteini plazme) i Institut za medicinska istraživanja (komet test) u Zagrebu.

Tijek istraživanja u odnosu na lokacije i transport uzoraka je prikazan na slici 3.



Slika 3. Dijagram prikazuje tijek provedenog istraživanja u odnosu na lokacije i transport uzoraka. HZJZ = Hrvatski zavod za javno zdravstvo Brodsko – posavske županije. Nacrtano pomoću alata drawio.io.

4.2. Laboratorijske metode

4.2.1. Ukupni oksidacijski kapacitet (TOC)

Uzorci venske krvi, uzeti u sterilnim uvjetima u epruvetu s heparinom (zeleni čep) centrifugirani su na 1620 x g na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta te je iza toga odvojeno 0,5 ml plazme u krioepruveticu (obilježenu kriomarkerom) i odmah spremljeno na -80 °C u kriokutiju. Kada su skupljeni svi uzorci, organiziran je prijevoz na -80°C u Institut Ruđer Bošković gdje su uzorci pohranjeni na -80°C.

Temeljni princip određivanja ukupnog oksidacijskog kapaciteta ili određivanja ukupnog peroksida je reakcija endogenog peroksida (H_2O_2) s peroksidazom. Prilikom reakcije dolazi do oksidacije tetrametil-benzidina (TMB) koji je kromogeni supstrat i nastaje plavo obojenje (134). Što je više peroksida u uzorku, intenzivnija je reakcija s peroksidazom i intenzivnije oksidiranje TMB boje što se vidi kao plava boja oksidiranog TMB. Dodatkom stop otopine (sumporna kiselina, 2 M H_2SO_4) zaustavlja se reakcija i plava boja proporcionalno postaje žuta. Intenzitet boje se spektrofotometrijski mjeri na čitaču mikropločica na 450 nm kao vrijednost absorbancije (A) Što je viša vrijednost absorbancije, to znači da manji postotak svjetla biva transmitiran kroz uzorak. Kvantifikacija endogenog peroksida se vrši u odnosu na standardnu krivulju s različitim razrjeđenjima vodikovog peroksida. Vrijednosti TOC se izražavaju kao ekvivalent H_2O_2 μM .

4.2.1.1. Priprema standarda peroksida

Za određivanje TOC najprije su se pripremila različita razrjeđenja peroksida, tzv. standardi (Tablica 1). Standardi su pomiješani neposredno prije kapanja i držani na ledu (4 °C).

Tablica 1. Priprema različitih koncentracija vodikovog peroksida (standarda) za određivanje ukupnog peroksida u plazmi.

Standard	Koncentracija H ₂ O ₂ (mM)	Volumen H ₂ O ₂ (μL)	Volumen H ₂ O (μL)
1	0	0	0
2	0,125	500 0,250 mM	500
3	0,250	500 0,5 mM	500
4	0,5	500 1mM	500
5	1	100 100 mM	9 900
	100 mM	10 μL 30%	969 μL

4.2.1.2. Priprema reakcijske mješavine

Reakcijska mješavina za 96 jažica pripremljena je miješanjem 20 ml pufera, 200 μL supstrata i 20 μL peroksidaze (1000:10:1). Nakon što je napravljena, reakcijska mješavina može stajati najviše do 15 min. U svaku jažicu se kapalo 200 μL reakcijske mješavine.

4.2.1.3. Postupak analize

Sam postupak izveden je na način da se prvo pipetiralo 10 μL standarda, kontrole i uzoraka plazme u svaku jažicu, nakon čega se unutar jedne minute dodavalo 200 μL reakcijske mješavine po jažici. Slijedilo je mjerenje 1. absorbancije na 450 nm te potom inkubacija mikropločice kroz 20 minuta nakon čega se dodalo 50 μL stop otopine u jažice. Poslije 2-3 min mikropločica se lagano protresla kako bi se boja u jažici ravnomjerno raspodijelila. Iza toga se očitavala 2. absorbancija na 450 nm. Rezultat je razlika očitane absorbancije između drugog (2.) i prvog (1.) mjerenja (2.A – 1.A).

4.2.2. Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC)

Uzorci venske krvi, uzeti u sterilnim uvjetima u epruvetu s heparinom (zeleni čep) centrifugirani su na 1620 x g na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta te je iza toga odvojeno 0,5 ml plazme u krioeproveticu (obilježenu kriomarkerom) i odmah spremljeno na -80 °C u

kriokutiju. Kada su skupljeni svi uzorci, organiziran je prijevoz na -80°C u Institut Ruđer Bošković gdje su uzorci pohranjeni na -80°C .

Mjerenje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta temelji se na reakciji endogenih antioksidansa s vodikovim peroksidom (135). Plazma se inkubira s vodikovim peroksidom kojeg uklanjaju endogeni antioksidansi. Iza toga slijedi reakcija preostalog vodikovog peroksida s peroksidazom i dodatak tetrametil-benzidina (TMB). Obzirom da prisutni endogeni antioksidansi uklanjaju peroksid tijekom inkubacije, što je više antioksidansa u plazmi to će manje biti preostalog peroksida te će reakcija s peroksidazom biti slabija. Posljedično će plavo obojenje zbog oksidiranog TMB biti slabijeg inteziteta. Reakcija se zaustavlja stop otopinom ($2\text{ M H}_2\text{SO}_4$) i plava boja proporcionalno prelazi u žutu. Intenzitet boje se mjeri spektrofotometrijski na čitaču mikropločica na 450 nm . Što je više antioksidansa prisutno u uzorku, to je niža izmjerena absorbancija (A). Kvantifikacija ukupnih antioksidansa određuje se u odnosu na standardnu krivulju s različitim razrjeđenjima mokraćne kiseline (MK) koja je jedan od glavnih endogenih antioksidansa u krvi. Vrijednosti TAC izražavaju se kao ekvivalent mokraćne kiseline u μM . Viša vrijednost ekvivalenta mokraćne kiseline znači da je više antioksidansa prisutno u uzorku.

4.2.2.1. Priprema standarda mokraćne kiseline

Za određivanje TAC najprije su pripremljena različita razrjeđenja mokraćne kiseline, standardi (Tablica 2). Inicijalno je izvagan $0,01\text{ gram}$ mokraćne kiseline i otopljen u $900\text{ }\mu\text{L}$ vode (H_2O) i $100\text{ }\mu\text{L}$ natrijeva hidroksida (10 M NaOH) čime se dobila koncentracija standarda od 10 mg/mL mokraćne kiseline. Standardi su pomiješani neposredno prije kapanja i držani na ledu (4°C).

Tablica 2. Način pripreme različitih koncentracija mokraćne kiseline (standarda) za određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta.

Standardi	Koncentracija MK (mg/mL)	Koncentracija MK (mM)	Volumen MK (μ L)	Volumen H ₂ O (μ L)
1	0	0	0	0
2	0,0188	0,0938	500	500
3	0,0375	0,1875	500	500
4	0,075	0,375	500	500
5	0,125	0,75	500	500
6	0,25	1,5	500	500
7	0,5	3	500	500
8	1	6	500	500

4.2.2.2. Priprema reakcijskih mješavina A i B

Za TAC se pripremaju dvije reakcijske mješavine.

Reakcijska mješavina A za 96 jažica dobivena je miješanjem 10 mL puferske otopine (citratni pufer) i 10 μ L 30% peroksida (H₂O₂), (1000:1). U svaku je jažicu stavljeno 100 μ L reakcijske mješavine A.

Reakcijska mješavina B za 96 jažica je pripremljena miješanjem 5 mL puferske otopine (citratni pufer), 50 μ L supstrata i 5 μ L peroksidaze, (1000:10:1). Dodavano je 50 μ L reakcijske mješavine B po jažici. Nakon što se naprave reakcijske mješavine A i B, stabilne su 15 minuta.

4.2.2.3. Postupak analize

Prvo se pipetiralo 25 μ L standarda, kontrole i uzoraka plazme po jažici, nakon toga je slijedilo dodavanje 100 μ L reakcijske mješavine A po jažici unutar jedne minute. Potom se pričekalo 3 minute i očitavana je 1. absorbancija na 450 nm. Slijedilo je dodavanje 50 μ L reakcijske mješavine B po jažici, također unutar jedne minute. Inkubacija mikropločice trajala je 15 minuta. Potom je dodano 50 μ L stop otopine u jažice i nakon 2-3 minute mikropločica se lagano potresla kako bi se boja ravnomjerno raspodijelila te je iza toga očitana 2. absorbancija na 450 nm. Rezultat je dobiven razlikom očitane absorbancije između drugog (2.) i prvog (1.) mjerenja (2.A - 1.A).

4.3. Analiza N-glikana

Uzorci venske krvi, uzeti u sterilnim uvjetima u EDTA epruvetu centrifugirani su na 1620 x g na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta. Iza toga se odvojila plazma koja je centrifugirana na 2700 x g na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta te je potom 0,5 ml plazme stavljeno u krioepruveticu (obilježenu kriomarkerom) i odmah spremljeno na -80 °C u kriokutiju. Kada su skupljeni svi uzorci, organiziran je prijevoz na -80°C u Genos d.o.o. gdje su uzorci pohranjeni na -80°C.

Priprema uzoraka i analiza N-glikana je rađena prema protokolu koji je ranije opisan (15,16). Za analizu N-glikana ukupnih proteina plazme koristili su se uzorci plazme volumena 10 µL, dok je za izolaciju imunoglobulina G (IgG) potreban volumen plazme od 100 µL.

4.3.1. Izolacija imunoglobulina G

Afinitetna kromatografija je metoda koja se koristi za izolaciju imunoglobulina G (IgG). Koriste se monolitne ploče s 96 jažica koje sadrže protein G (BIA Separations, Ajdovščina, Slovenija). Prije upotrebe, monolitna ploča je isprana ultra čistom vodom tip 1 održavanom na 18,2 MΩ (Purelab Ultra, VWR, PA, SAD) i uravnotežena s fosfatnim puferom (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS, pH 7,4). Uzorci plazme volumena 50 µL su razrijeđeni 7 puta s PBS-om. Slijedilo je nanošenje razrijeđenih uzoraka plazme na ploču s proteinom G i zatim ispiranje s PBS-om kako bi se uklonili nevezani proteini. Potom se IgG otpustio od protein G monolitnih ploča postupkom elucije sa 100 mM mravlje kiseline (0,1 M HCOOH, pH 2,5, Merck, Darmstadt, Njemačka) i odmah neutraliziralo do pH 7,0 s amonijevim bikarbonatom (1 M NH₄HCO₃, Thermo Fisher Scientific, MA, SAD) radi stabilnosti IgG. Na taj su se način priređeni eluati IgG osušili preko noći i suhi pohranjeni na -20 °C do postupka deglikozilacije.

4.3.2. Deglikozilacija i obilježavanje N-glikana

4.3.2.1. Denaturacija

Deglikozilacija izoliranih i osušenih uzoraka IgG započela je postupkom denaturacije. Uzorci IgG su se resuspendirali sa 30µL 1,33% natrijevog dodecil sulfata (CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na, SDS)

i potom su se inkubirali na 65 °C kroz 10 minuta. Denaturacija uzoraka plazme za analizu N-glikana ukupnih proteina plazme vršila se tako što se u 10 µL plazme dodalo 20 µL 2% SDS te je iza toga slijedila inkubacija na 65 °C kroz 10 minuta. Nakon postupka denaturacije slijedila je deglikozilacija, označavanje i pročišćavanje koji su se izveli na isti način za oba tipa uzoraka (IgG i uzorci plazme).

4.3.2.2. Deglikozilacija

Višak SDS-a neutralizirao se dodatkom 10 µL of 4% Igepal-CA630 (Sigma-Aldrich, MO, SAD) nakon čega su se uzorci stavili u miješalicu (engl. shaker) kroz 15 minuta. Dodatkom 1,2 U PNGase F u 10 µL 5 x PBS po uzorku (Promega, WI, USA) te potom inkubacijom na 37 °C preko noći, N-glikani su otpušteni s okosnice proteina.

4.3.2.3. Obilježavanje

Oslobođeni N-glikani obilježili su se fluorescentnom bojom 2-aminobenzamidom (2-AB). Po uzorku se dodalo 25 µL otopine za obilježavanje. Slijedila je inkubacija na 65°C kroz 2 sata nakon čega se uzorcima dodalo 700 µL acetonitrila. Višak boje i drugih reagensa uklonio se pomoću ekstrakcije čvrste faze (engl. Solid phase extraction, SPE) za koju se koristio Acroprepadv 1 mL 0,2 µm wwPTFE ploča koja je polipropilenski membranski filter (Pall, NY, SAD) i služi kao stacionarna faza. Nakon što su se uzorci prenijeli na ploču za filtriranje primijenio se vakuum kako bi se otklonilo otapalo, a glikani se vezali za hidrofilni filter. Slijedilo je ispiranje 5x s 200 µL 96% acetonitrila po jažici i eluiranje glikana sa 180 µL ultra čiste vode. Tako obilježeni N-glikani čuvaju se na -20 °C do analize.

4.3.3. Hidrofilna interakcijska tekućinska kromatografija ultravisoke učinkovitosti

Fluorescentno obilježeni N-glikani analiziraju se tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatographic*, UHPLC) koja se temelji na kromatografiji s hidrofilnim interakcijama i detekcijom fluorescencije (HILIC-UHPLC-FLR) na instrumentu Waters Acquity UPLC H-klase. Instrument je pod kontrolom

softvera Empower 3, build 3471 (Waters, Milford, MA, SAD). Uzorci su se držali na 10 °C prije injektiranja, a temperatura odvajanja bila je 60 °C za IgG i 25 °C za N-glikane proteina plazme. Kromatografsko odvajanje glikanskih struktura provodilo se na Waters UPLC Glycan bridged ethylene hybrid (BEH) amid kromatografskim stupcima (130 Å, 1,7 µm BEH parti-Biomolecules 2023, 13, 375 4 od 13 cles, 2,1 × 100 mm). Otapalo A je 100 mM amonijev format (NH₄HCO₂, pH 4,4) koje je hidrofilna frakcija mobilne faze. Otapalo B je LC-MS acetonitril kao hidrofobna frakcija. Za odvajanje N-glikana proteina plazme koristio se linearni gradijent 70-53% otapala B brzine protoka 0,56 ml/min u 25-minutnom analitičkom ciklusu. Odvajanje IgG glikana bilo je s linearnim gradijentom od 75-62% otapala B pri brzini 0,4 ml/min u 29-minutnom analitičkom ciklusu. Priprema uzoraka za analizu započela je miješanjem uzoraka sa 100% LC – MS acetonitrilom u omjeru 25:75 (v : v) za N-glikane IgG i 30:70 (v : v) za N-glikane proteina plazme. Korišten je vanjski standard hidroliziranih i 2-AB obilježenih glukoznih oligomera (dekstran) radi kalibracije metode te su na taj način vremena zadržavanja pojedinačnih glikana pretvorena u jedinice glukoze (GU). Valne duljine ekscitacije i emisije bile su postavljene na 250 odnosno 428 nm.

4.3.4. Izračun deriviranih svojstava

Obrada podataka izvedena je na način da se izvršila manualna korekcija kromatografskih vršaka nakon automatskog algoritma integracije. Kontrola kvalitete svih kromatograma provedena je prije manualne integracije, što je uključivalo intenzitet signala, oblik vršaka, dekstransku ljestvicu te odsutnost osnovnog i značajnog pomaka vršaka kao i neočekivanih vršaka u kromatogramu. Svaki kromatogram razdvojio se u 39 vršaka N-glikana ukupnih proteina plazme i 24 vrška N-glikana IgG. Količina glikana unutar pojedinačnog vrška prikazana je kao postotak u odnosu na ukupnu površinu svih integriranih vršaka prema formuli:

$$GP_{\text{pojedinačni}} = GP_{\text{pojedinačni}} / GP_{\text{ukupni}} \times 100.$$

Agalaktozilacija (G0) obuhvaća sve kompleksne N-glikanske strukture koje ne sadrže galaktozu. Monogalaktozilacija (G1) uključuje N-glikane s jednom galaktoziliranom granom, dok su digalaktozilirani N-glikani (G2) karakterizirani prisutnošću galaktoze na obje grane. Svi kompleksni N-glikani koji sadrže N-acetilglukozamin (GlcNAc) pripadaju deriviranom

svojstvu račvajućeg N-acetilglukozamina (B), dok su oni s fukozom svrstani u derivirano svojstvo fukozilacije (F). Strukture koje sadrže sijalinsku kiselinu pripadaju deriviranom svojstvu sijalinizacije (S).

Matematički izrazi za svako derivirano svojstvo definirani su kao:

Agalaktozilacija (G0) = GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP6

Monogalaktozilacija (G1) = GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11

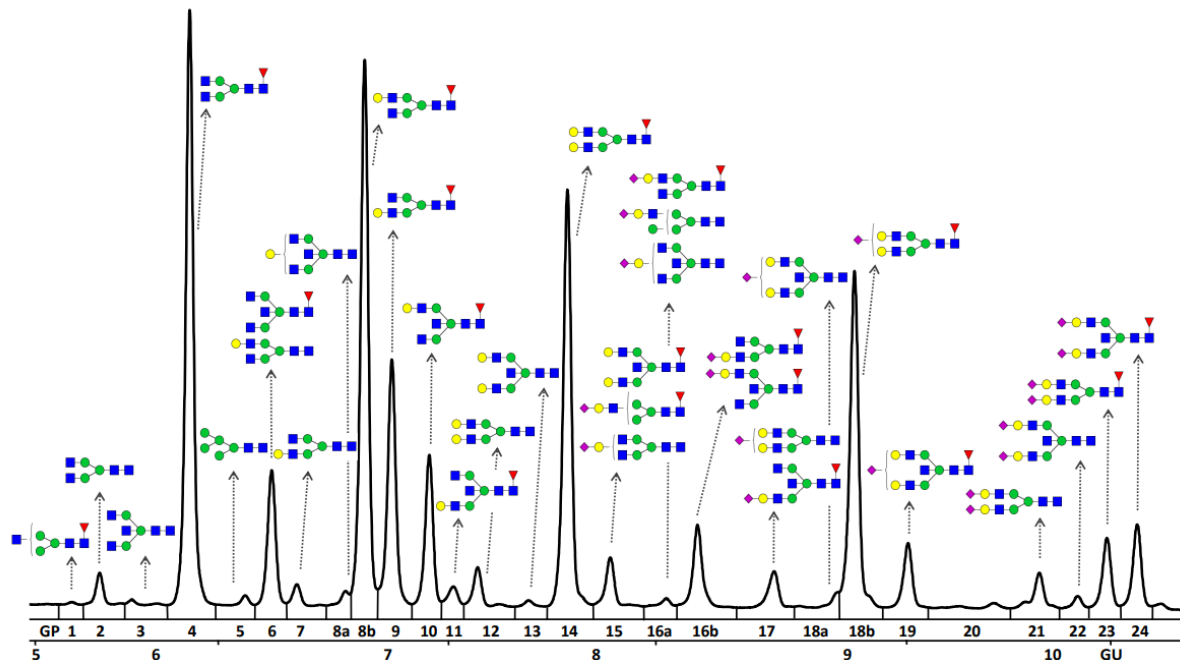
Digalaktozilacija (G2) = GP12 + GP13 + GP14 + GP15

Račvajući N-acetilglukozamin (B) = GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24

Fukozilacija (F) = GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP20 + GP23 + GP24

Sijalinizacija (S) = GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24

Na slici 4 prikazan je primjer kromatograma N-glikana IgG.



Slika 4. Kromatogram N-glikana IgG. Preuzeto i prilagođeno iz: Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, Lauc G. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up.

Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018;1864:2034-9 (97).

Izračunato je dodatnih 16 deriviranih svojstava plazme temeljenih na prisutnosti specifičnih šećernih ostataka, definirano na sljedeći način:

Nisko razgranati glikani (LB) = GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23

Visoko razgranati glikani (HB) = GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36 + GP37 + GP38 + GP39

Agalaktozilacija (G0) = GP1 + GP2

Monogalaktozilacija (G1) = GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP13

Digalaktozilacija (G2) = GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23

Trigalaktozilacija (G3) = GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35

Tetragalaktozilacija (G4) = GP36 + GP37 + GP38 + GP39

Asijalinizacija (S0) = GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11

Monosijalinizacija (S1) = GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17

Disijalinizacija (S2) = GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24 + GP25 + GP26 + GP27

Trisijalinizacija (S3) = GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36

Tetrasijalinizacija (S4) = GP37 + GP38 + GP39

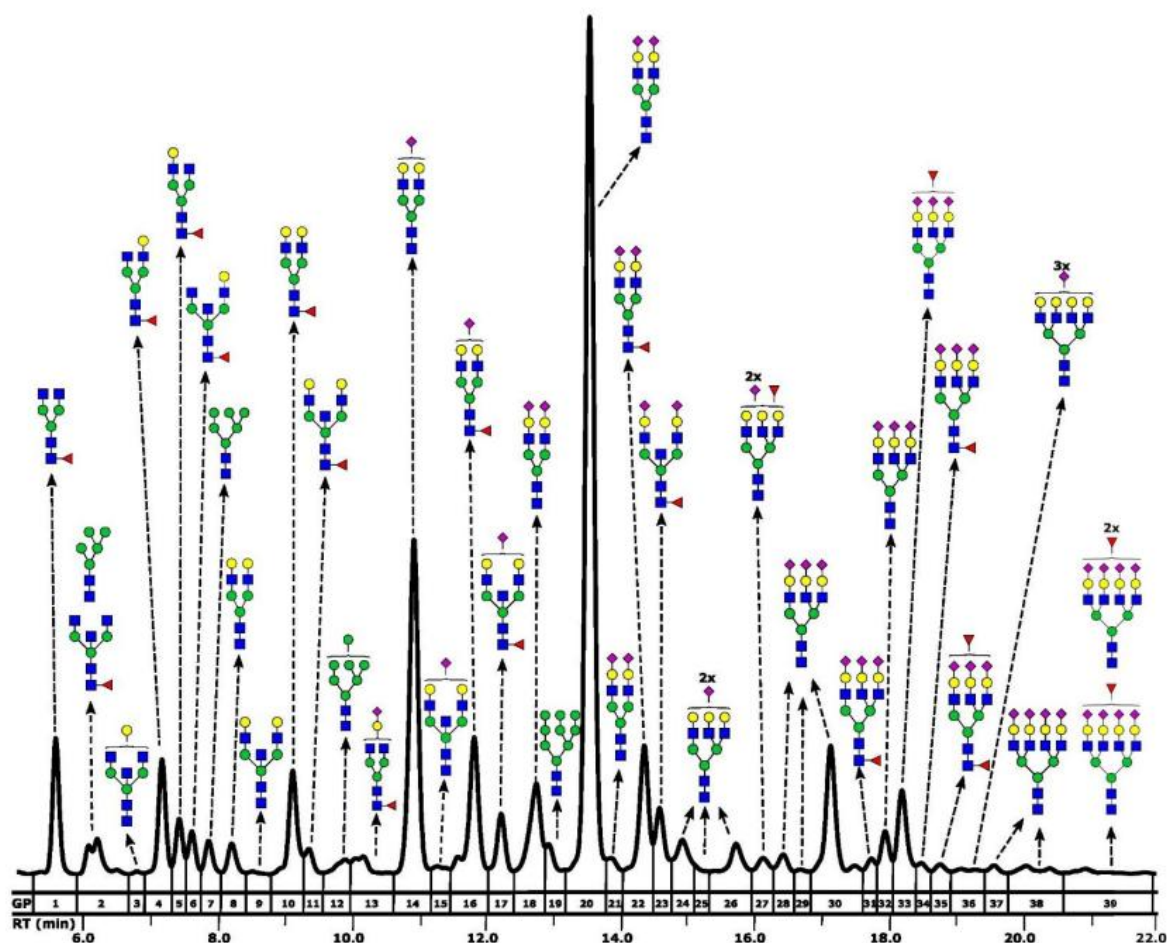
Račvajući N-acetilglukozamin (B) = GP2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP11 + GP15 + GP17 + GP23

Antenarna fukozilacija (AF) = GP27 + GP33 + GP35 + GP39

Sržna fukozilacija (CF) = GP1 + GP2 + GP4 + GP5 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP16 + GP17 + GP22 + GP23 + GP31 + GP34 + GP35

Oligomanozne strukture (HM) = GP7 + GP12 + GP19

Primjer kromatograma N-glikana ukupnih proteina plazme prikazan je na slici 5.



Slika 5. Kromatogram N-glikana ukupnih proteina plazme. Preuzeto i prilagođeno iz: Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, Lauc G. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864:2034-9 (97).

4.4. Komet test

Komet test ili jednostanična gel elektroforeza je tehnika za otkrivanje oštećenja i popravka u molekuli DNA. Naširoko je prihvaćen alkalni komet test po Singhu i sur. (136). Za test se mogu koristiti svježi uzorci pune krvi kao i smrznuti uzorci na -80°C koji se mogu upotrijebiti do godine dana nakon pohrane. Priprema uzoraka i analiza slijedila je protokol koji je prethodno opisan u Milić i sur. 2019. godine (137).

4.4.1. Priprema stakalaca za mikroskopiranje

Agarosa normalnog tališta (engl. *normal melting point agarose*) svježe je otopljena u destiliranoj vodi (priprema vode pomoću MiliQ sustava na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska), zagrijana u mikrovalnoj pećnici do vrenja i ohlađena do 70°C na grijaćoj ploči (Jenway 1201 Hotplate, Jenway Ltd. Felsted, Dumow, Essex, VB).

Na mikroskopska stakla postavljena u horizontalni položaj (Vitrognost, Biognost, Zagreb, Hrvatska) stavljeno je 300 µl agaroze koja je nakon toga pokrivena pokrovnim stakalcem dimenzija 24x60 mm (Vitrognost, Biognost, Zagreb, Hrvatska). Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi u horizontalnom položaju, pokrovno stakalce je uklonjeno te su stakalca osušena na 70 °C na grijaćim pločama te držana u kutijama za mikroskopske preparate do upotrebe na suhom i tamnom mjestu.

4.4.2. Uzorkovanje krvi, čuvanje i transport

Uzorci pune venske krvi (100 µl) uzeti u sterilnim uvjetima iz EDTA epruvete i pohranjeni su odmah nakon uzorkovanja u kriokutije te su pohranjeni na -80°C. Kada su skupljeni svi uzorci, organiziran je prijevoz na -80°C na Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada gdje su uzorci pohranjeni na -80°C (Deep Freezer DF 490, nuve, Ankara, Turska).

4.4.3. Otapanje i priprema jednostanične suspenzije

Obzirom na ukupni broj uzoraka, komet test se izvodio u više navrata po maksimalno 16 uzoraka po ciklusu. U jednom ciklusu otapanja, uzorci su odmrzavani u vodenoj kupelji (SBS 40 shaking water bath, Stuart, Fisher Scientific, Leicestershire, Velika Britanija) na 37°C na 5 minuta. U pripremnim uzorcima određeno je uzimanje 14 µl uzorka u koji se dodalo 550 µl svježe pripremljene 0,6%-tne agaroze niskog tališta (engl. *low melting point agarose*) pripremljene u PBS-u bez dodatka Ca²⁺ i Mg²⁺ koja je nakon otapanja i grijanja u mikrovalnoj pećnici tog istog dana držana na 37°C.

4.4.4. Liza stanica

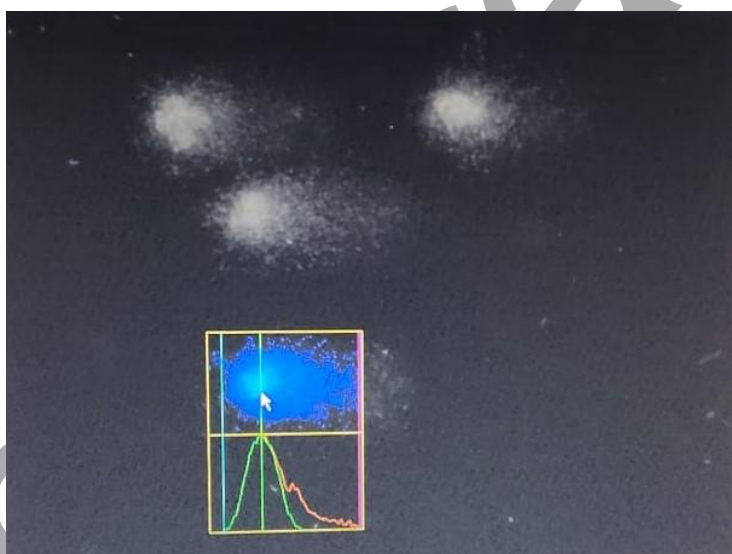
Za ovo istraživanje koristio se 2-gelni sustav (2 gela odvojena na istom mikroskopskom stakalcu). Za svaki gel od smjese krvi i LMP gela uzeto je 70 μ l, te je svaki gel bio odmah pokriven pokrovnim stakalcem 24x24 mm (Vitrognost, Biognost, Zagreb, Hrvatska). Za svaki uzorak pripremljena su 3 stakla, svako s dva gela. Nakon 10 minuta u horizontalnom položaju iznad leda (ali ne direktno na ledu) u metalnoj kadici sa staničevinom radi solidifikacije te uključenom električnom grijalicom radi isušivanja zraka iznad gelova, pokrovnice su skinute, stakalca obilježena grafitnom olovkom te uronjena leđa o leđa u vertikalne hladne staklene košice (maksimalni kapacitet je 16 stakalaca) (Coplin jar, Kartell S.p.A., MI, Italija) napunjene otopinom za liziranje staničnih membrana i ostalih organela. Otopina za lizu bila je svježije pripremljena i ohlađena na +4°C i sastojala se od 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH = 10,1% natrijevog sarkozinata, 1% Triton X-100, 10% dimetil sulfoksida (sve kemikalije: Kemika, Zagreb, Hrvatska). Sva stakla su držana 1h na +4°C u mraku.

4.4.5. Denaturacija i jednostanična gel elektroforeza

Nakon liziranja, slijedila je denaturacija u svježe pripremljenoj hladnoj vodenoj otopini (10 mM NaOH, 200 mM Na₂EDTA, pH = 13) u novim vertikalnim staklenim košicama, a prije uranjanja stakla za alkalni komet test bila su lagano isprana destiliranom vodom da bi se uklonili ostaci prethodne otopine na +4°C. Nakon 20 minuta, ostatak od denaturacije koji sadrži stanične nukleotide sada oslobođene od proteina i histona (za svaki ciklus pripremila se 1 L svježe ohlađene otopine za denaturaciju) stavio se u horizontalnu elektroforezu u koju stane maksimalno 32 mikroskopska stakla (Scieplast, London, UK; power supply Biorad, Hercules, Kalifornija, SAD), stakalca su uronjena na središnji dio za velike gelove horizontalno te je elektroforeza na 0,8V/cm trajala sljedećih 20 minuta. Nakon toga, stakalca su bila neutralizirana 5 minuta vodenom otopinom 0,4 M Tris pufera (pH 7,5) i zatim dehidrirana u gradijentu etanola (dva puta po 10 minuta u 70%-tnom etanolu te jednom po 10 minuta u 96%-tnom etanolu, Kemika, Zagreb, Hrvatska). Stakla su sljedeći dan nakon sušenja spremljena u mikroskopske kutije i držana na tamnom i suhom mjestu do pregleda i analize.

4.4.6. Bojanje i fluorescentna mikroskopija

Na dan analize, svako staklo je rehidrirano 10 minuta destiliranom vodom, te je stavljeno 50 μ l po gelu vodene otopine etidij bromida (20 μ g/mL), zatim je staklo isprano destiliranom vodom od suviška boje te odmah analizirano na fluorescencijskom mikroskopu (Olympus BX51, Tokyo, Japan, 200 $\times$ povećanje) povezanom CCD kamerom s kompjuterom i softverom za analizu slike pojedinačne stanice (Comet Assay IV; Instem, London, VB). Softverska analiza upotrebom Comet Assay IV koja je provedena za ovo istraživanje je prikazana na slici 6.



Slika 6. Softverska analiza kometa (Comet Assay IV). Vlastiti izvor.

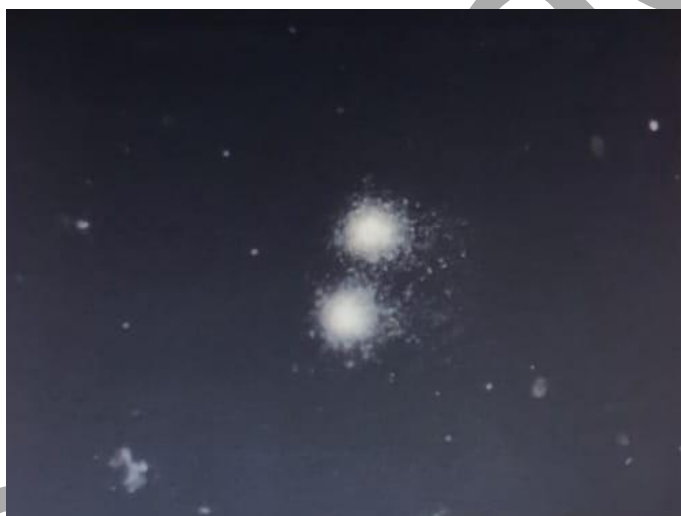
Na svakom gelu izbrojano je i ručno podešeno za svaku stanicu analiziranje za minimalno 50 pojedinačnih stanica ili tzv. kometa. Ekscitacijski filter je bio 515–560 nm, a barijerni filter 590 nm. Izvor svjetlosti je bila LED lampa (LED illumination lamp SET-COOL-0003 - CoolLED - pE300 pE-300, CoolLED Ltd., Andover, Velika Britanija).

4.4.7. Softverska analiza

Softver je analizirao različite parametre, a parametar koji se koristio u daljnjoj analizi je bio intenzitet repa kometa (engl. *Tail Intensity*, TI), koji odgovara postotku DNA u repu kometa

(kada je stanica oštećena, ona ima rep tj. ima oblik kometa; neoštećena DNA je nakon lize, denaturacije te elektroforeze okruglog oblika) te dužina repa kometa (engl. *Tail Length*, TL), što odgovara dužini repa kometa oštećene DNA, ali nije svaki put dostojno mjerilo oštećenja jer i jedan mali fragment koji je brže putovao nego veći fragmenti može stvoriti dojam dugog repa i velikog oštećenja DNA, ali se ovaj parametar povijesno dugo koristio pa se još uvijek koristi za usporedbu s rezultatima drugih autora.

Slike 7. i 8. prikazuju neoštećeni i oštećeni komet u alkalnom komet testu koje je provedeno za ovo istraživanje.



Slika 7. Neoštećena DNA (okrugli oblik) vidljiva fluorescentnim mikroskopom. Vlastiti izvor.



Slika 8. Oštećena DNA (intenzivan i dugačak rep kometa) vidljiva fluorescentnim mikroskopom. Vlastiti izvor.

Analizirale su se vrijednosti: srednja vrijednost, medijan, minimum, maksimum, standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*, SD) i standardna pogreška (engl. *Standard Error*, SE). Rezultati su dalje analizirani Break down Anova varijancom s posthoc modifikacijom. Usporedbom dva gela istog uzorka nisu nađene razlike, te su oba gela, odnosno njihove vrijednosti analizirane zajedno kao uzorak od 100 kometa.

U ovom istraživanju za alkalni komet test nisu korištene interne kontrole. Rezultati su bili uspoređivani s rezultatima baze podataka na 19 000 pojedinaca za koje su utvrđeni intervali vrijednosti za kontrolne vrijednosti zdrave populacije, za populaciju koja nema rizik tumorima, za tumorsku i one kojima će prema tim vrijednostima kvaliteta života a time i preostale živuće godine biti narušene (138,139).

4.5. Statističke metode

Veličina uzorka nije generirana statističkim izračunom već je bila definirana na osnovu dosadašnjih objavljenih istraživanja kojima je pokazana učinkovitost jedne doze SGLT2i na tri nezavisne skupine od ukupno 45 ispitanika (140) i učinak na smanjenje oksidacijskog stresa na animalnom uzorku od četiri nezavisne skupine s ukupno 51 jedinkom (141). Ovo istraživanje uključilo je više ispitanika u odnosu na ranija istraživanja, ukupno 60 ispitanika podijeljenih u dvije skupine po 30 ispitanika (kontrolna i ispitivana skupina). Za analizu raspodjele je korišten Shapiro-Wilk test. Varijable su prikazane kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom kod normalne raspodjele, kod nenormalne raspodjele kao medijan s interkvartilnim rasponom. Razlike u kontinuiranim varijablama s normalnom distribucijom između dvije nezavisne skupine analizirane su Student t-testom, dok je u slučaju nenormalne raspodjele korišten Mann Whitney test. Kategorijske varijable izražene su kao broj i postotak, a razlike između skupina analizirane su χ^2 testom. Evaluacija razlika prije i nakon koronarne angiografije među grupama za potvrdu efekta empagliflozina učinjena je dvosmjernom analizom varijance (2-way ANOVA). Korelacije su ispitane Pearsonovim (kontinuirane varijable) i Spearmanovim testom (kategorijske varijable). Za procjenu učinka svake varijable na oksidacijski stres korištene su regresijske metode. Statistički značajnim je smatran $p < 0,05$.

4.5.1. Statistička analiza glikana

Kako bi se uklonile eksperimentalne varijacije iz mjerenja, na UHPLC podatke glikana provedena je normalizacija i korekcija serija (engl. *batch correction*). Za usporedivost mjerenja među uzorcima, provedena je normalizacija prema ukupnom području. Prije korekcije serija, normalizirani podaci glikana su log-transformirani zbog desne asimetrije njihovih distribucija i multiplikativne prirode serijskih efekata. Korekcija serija provedena je na log-transformiranim mjerenjima koristeći ComBat metodu, pri čemu je tehnički izvor varijacije (koji uzorak je analiziran na kojoj ploči) modeliran kao serijski kovarijat. Kako bi se korigirala mjerenja za eksperimentalnu grešku, procijenjeni serijski efekti oduzeti su od log-transformiranih mjerenja. Longitudinalna analiza uzoraka pacijenata tijekom razdoblja promatranja provedena je korištenjem linearnog modela mješovitih učinaka, gdje je glikanski/klinički parametar (npr. glikani, TAC, TL, eGFR, CRP) bio zavisna varijabla. Klinički status (npr. empagliflozin, KVB, hipertenzija, pušenje, menopauza) i interakcija između kliničkog statusa i vremena modelirani su kao fiksni učinci, dok je vrijeme također modelirano kao fiksni učinak. Pojedinačni ID bio je uključen u model kao slučajni presjek (engl. *random intercept*).

Prije analize, glikanski/klinički parametri transformirani su u standardnu normalnu distribuciju pomoću inverzne rang-transformacije na normalnost. Korištenje rang-transformiranih varijabli osigurava da su procijenjeni učinci različitih glikana usporedivi, jer će imati istu standardiziranu varijancu. Stopa lažnog otkrića (engl. *False Discovery Rate*, FDR) kontrolirana je primjenom Benjamini-Hochbergove metode na razini od 0,05. Podaci su analizirani i vizualizirani korištenjem programskog jezika R (verzija 4.3.3).

5. REZULTATI

5.1. Opća, klinička i antropometrijska obilježja ispitanika

Istraživanje je provedeno na 60 bolesnika, od kojih je po 30 muškog ili ženskog spola. Puši 20 (33 %) bolesnika, a 12 (20 %) navodi povremeno konzumiranje alkohola. Od 30 žena, 27 (90 %) ih je u menopauzi. Najučestalija terapija su antihipertenzivi kod 52 (87 %) bolesnika, acetilsalicilnu kiselinu uzima 29 (48 %) te statine 46 (77 %) bolesnika. U sinusnom ritmu je bilo 57 (95 %) bolesnika. Nema značajnih razlika u općim i kliničkim obilježjima između dvije skupine (Tablica 3).

Tablica 3. Opća i klinička obilježja ispitanika.

	Broj (%) bolesnika			P*
	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina	Ukupno	
Spol				
M	15 (50)	15 (50)	30 (50)	> 0,99
F	15 (50)	15 (50)	30 (50)	
Pušenje	12 (40)	8 (27)	20 (33)	0,27
Konsumira alkohol	5 (17)	7 (23)	12 (20)	0,52
Menopauza (n = 30)	13/15 (87)	14/15 (93)	27/30 (90)	> 0,99
IM	5 (17)	4 (13)	9 (15)	> 0,99 [†]
PCI	4 (13)	3 (10)	7 (12)	> 0,99 [†]
CVI	2 (7)	4 (13)	6 (10)	0,67 [†]
Terapija				
Varfarin	1 (3)	1 (3)	2 (3)	> 0,99 [†]
NOAK	3 (10)	2 (7)	5 (8)	> 0,99 [†]
ASK	16 (53)	13 (43)	29 (48)	0,61
antihipertenzivi	28 (93)	24 (80)	52 (87)	0,25 [†]
RAASi	23 (82)	23 (96)	46 (89)	0,20
CCB	15 (54)	14 (58)	29 (56)	0,73
BB	22 (79)	13 (54)	35 (67)	0,06
diuretik	11 (39)	11 (45)	22 (42)	0,63
ostalo	2 (7)	0	2 (4)	0,49 [†]
Statini	23 (77)	23 (77)	46 (77)	> 0,99
Ezetimib	1 (3)	5 (17)	6 (10)	0,20 [†]
anti PCSK9	1 (3)	0	1 (2)	> 0,99 [†]
Sinus ritam	28 (93)	29 (97)	57 (95)	> 0,99 [†]
Fibrilacija atrijsa	2 (7)	1 (3)	3 (5)	> 0,99 [†]

* χ^2 test; [†]Fisherov egzaktni test

IM = infarkt miokarda; PCI = perkutana koronarna intervencija; CVI = cerebrovaskularni inzult; NOAK = novi oralni antokoagulansi; ASK = acetilsalicilna kiselina; RAASi = inhibitori renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava; CCB = blokatori kalcijevih kanala; BB = beta blokatori.

Medijan dobi bolesnika je 65 godina u obje skupine, s rasponom u kontrolnoj skupini od 47 do 80 godina, a u ispitivanoj od 49 do najviše 78 godina starosti. Nema značajne razlike u dobi, antropometrijskim obilježjima i vrijednostima pulsa s obzirom na skupine. Jedino su vrijednosti sistoličkog tlaka značajno više u ispitivanoj skupini, u odnosu na kontrolu (medijan 133 mmHg vs. 124 mmHg) (Mann Whitney U test, P = 0,02) (Tablica 4).

Tablica 4. Razlike u dobi, antropometrijskim obilježjima, vrijednostima arterijskog tlaka i pulsa u odnosu na skupine.

	Median (IQR)		Difference	95% CI	P*
	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina			
Dob (godine)	65 (59 - 68)	65 (60 - 72)	2	-3 do 6	0,49
Tjelesna masa (kg)	81,5 (72 - 85,3)	77 (70 - 95,3)	1	-8 do 10	0,85
Tjelesna visina (cm)	167 (162 - 172)	165 (161 - 174)	-1	-6 do 4	0,67
ITM(kg/m ²)	28,6 (25,3 - 31,5)	30,3 (26,3 - 32)	0,9	-1,5 do 3,3	0,42
Opseg struka (cm)	97,5 (92 - 104,3)	101 (89,8 - 107,3)	2	-4 do 8	0,53
SKT	124 (115 - 133)	133 (122 - 143)	9	1,5 do 16,5	0,02
DKT	76 (70 - 83)	79 (74 - 85)	3,5	0 do 8	0,07
Puls	74,5 (65 - 82,8)	70 (61 - 75,3)	-5	-11 do 1	0,09

*Mann Whitney U test (Hodges-Lehmann median difference)

ITM = indeks tjelesne mase; SKT = sistolički krvni tlak; DKT = dijastolički krvni tlak.

5.2. Bazalni hematološki i biokemijski pokazatelji

Nema značajnih razlika u bazalnim hematološkim i biokemijskim nalazima kod ispitanika (Tablica 5). Medijan vrijednosti crvene krvne slike (eritrociti, hemoglobin, hematokrit), leukocita i trombocita bio je sličan između skupina. Također, nije bilo značajnih razlika u biokemijskim parametrima, uključujući glukozu u krvi (GUK), funkcijske parametre bubrega (urea, kalij, natrij, klor), jetrene enzime (AST, ALT, GGT, AF) te lipidni profil (kolesterol, trigliceridi, HDL-K, LDL-K). Nije uočena značajna razlika u HbA1c ($p = 0,20$). Također, razine feritina, vitamina D, paratiroidnog hormona (PTH) i tiroidnog stimulirajućeg hormona (TSH) nisu se značajno razlikovale.

Tablica 5. Vrijednosti bazalnih (t0) laboratorijskih nalaza između skupina bolesnika.

	Median (IQR)		Difference	95% CI	P*
	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina			
Eritrociti	4,6 (4,3 - 4,9)	4,6 (4,3 - 4,8)	-0,02	-0,24 do 0,20	0,88
Hemoglobin	136,5 (124,3 - 147,5)	138 (130,5 - 145,5)	1,0	-6 do 9	0,76
Hematokrit	41,2 (37,6 - 44)	40,5 (39 - 43,1)	-0,3	-2,2 do 1,8	0,81
Leukociti	6,7 (5,2 - 7,8)	6,1 (5,4 - 8)	0,07	-0,96 do 0,85	0,91
Trombociti	195,5 (168,8 - 236)	216,5 (196,5 - 258,8)	24	-1 do 49	0,06
GUK	5,5 (4,9 - 5,8)	5,6 (5,2 - 6,3)	0,2	-0,1 do 0,6	0,21
Urea	5,9 (5,3 - 7,4)	5,8 (4,7 - 6,9)	-0,3	-1,1 do 0,5	0,48
K	4,2 (4 - 4,4)	4,3 (4,1 - 4,5)	0,1	-0,1 do 0,3	0,23
Na	141 (140 - 142)	141 (139 - 142)	0	-1 do 0	0,32
Cl	105 (102,8 - 106)	104,5 (102 - 106)	0	-2 do 1	0,59
bilirubin	11 (8 - 18)	11 (8 - 14)	-1	-4 do 2	0,56
AST	24 (22 - 29,5)	28 (22 - 32,3)	2	-1 do 6	0,18
ALT	24 (17,8 - 26,5)	27 (19,8 - 38,3)	4	-1 do 10	0,09
AF	77,5 (59 - 86)	73,5 (59,8 - 90)	0	-12 do 11	0,97
GGT	19 (15 - 29,3)	22 (17,3 - 31)	2	-2 do 8	0,23
Kolesterol	4,5 (3,7 - 5,6)	4,8 (4 - 5,3)	0,2	-0,5 do 0,8	0,61
Trigliceridi	0,9 (0,8 - 1,3)	1,2 (0,9 - 1,7)	0,2	-0,1 do 0,5	0,15
HDL-K	1,3 (1,1 - 1,6)	1,3 (1,2 - 1,6)	0,1	-0,1 do 0,2	0,26
LDL-K	2,7 (2,2 - 3,6)	3 (2,5 - 3,4)	0,2	-0,3 do 0,6	0,54
Željezo	17,5 (10 - 22)	18 (12 - 21)	1	-2 do 4	0,42
UIBC	43 (37,3 - 51,3)	39 (34,8 - 47,5)	-2	-8 do 4	0,44
TIBC	61 (53 - 65)	59 (54,5 - 64,3)	0	-5 do 4	0,91
Ferritin	114 (43,4 - 179,6)	145,1 (78,6 - 278,7)	31,9	-13,9 do 93,4	0,17
HbA1C	36 (34 - 39,3)	38 (36 - 39,3)	1	-1 do 3	0,20
HbA1C %	5,5 (5,3 - 5,7)	5,6 (5,4 - 5,7)	0,10	-0,10 do 0,30	0,23
Vitamin D	57,9 (41,1 - 85,1)	55,7 (40,8 - 69,4)	-5,9	-18,9 do 8,0	0,43
PTH	46 (36,2 - 60,2)	44,3 (39,2 - 54,5)	-0,99	-8,6 do 6,6	0,87
TSH	1,6 (1 - 2,4)	1,8 (1,1 - 2,4)	0,07	-0,42 do 0,51	0,80
Ukupni Ca	2,3 (2,3 - 2,4)	2,4 (2,3 - 2,5)	0,03	-0,03 do 0,08	0,32
Ioizirani Ca	1,2 (1,2 - 1,2)	1,2 (1,2 - 1,2)	0,01	-0,01 do 0,03	0,32
Fosfati	1 (0,9 - 1,1)	1 (0,9 - 1,1)	0	-0,09 do 0,08	0,95

*Mann Whitney U test (Hodges-Lehmann median difference)

GUK = glukoza u krvi; AST = aspartat-aminotransferaza; ALT = alanin-aminotransferaza; AF = alkalna fofataza; GGT = gama-glutamilttransferaza; HDL-K = HDL kolesterol; LDL-K = LDL kolesterol; UIBC = nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC = ukupni kapacitet vezanja željeza; HbA1C = hemoglobin A1C; PTH = paratiroidni hormon; TSH = tiroidni stimulirajući hormon.

5.3. Karakteristike procedure

Nema značajne razlike između skupina s obzirom na vrijeme zračenja, dozu zračenja i količinu kontrasta koju su ispitanici dobili tijekom koronarne angiografije.

Tablica 6. Razlike prema vremenu zračenja, dozi zračenja i količini kontrasta.

	Median (IQR)		Difference	95% CI	P*
	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina			
FT (min)	1,9 (1,4 - 3,8)	1,7 (1 - 3,7)	-0,3	-0,9 do 0,3	0,28
DAP (uG/m2)	694,7 (461,7 - 1568,7)	660 (442,7 - 1410,3)	-35,13	-341,5 do 239,5	0,73
vol.CM (ml)	82 (67,3 - 100,3)	76 (65 - 93,8)	-2	-15 do 11	0,76

*Mann Whitney U test (Hodges-Lehmann median difference)

FT = Vrijeme fluoroskopije; DAP = Umnožak doze i površine; vol.CM = volumen kontrastnog medija.

5.4. Razlike u biokemijskim pokazateljima prije i 24 sata nakon koronarne angiografije

U kontrolnoj skupini bolesnika, 24 sata nakon koronarografije, u odnosu na bazalne vrijednosti, značajno su više vrijednosti hs troponina I (Wilcoxonov test, $P = 0,006$) i eGFR (Wilcoxonov test, $P = 0,04$).

U ispitivanoj skupini su značajno više vrijednosti hs troponina I (Wilcoxonov test, $P = 0,002$) i vrijednosti hs CRP (Wilcoxonov test, $P < 0,001$) 24 sata nakon koronarografije u odnosu na bazalne vrijednosti (Tablica 7).

Tablica 7. Razlike u biokemijskim pokazateljima između dva mjerenja u pojedinoj skupini bolesnika.

	Median (IQR)		Difference	95% CI	<i>P</i> *
	Bazalne vrijednosti	24 sata nakon koronarografije			
Kontrolna skupina					
hs troponin I	3,3 (0,7 – 4,7)	4,4 (1,5 – 13,2)	1	0,25 do 5,6	0,006
Kreatinin	75 (68 – 90)	74 (65 – 85)	-2,5	-6 do 0,5	0,06
eGFR	79,6 (67,6 – 90,9)	84,1 (75,9 – 93,1)	2,6	0 do 6,2	0,04
hs CRP	1,5 (0,7 – 3,7)	2,1 (0,9 – 3,4)	0,2	-0,05 do 0,55	0,17
Ispitivana skupina					
hs troponin I	3,7 (1,7 – 6,6)	5,1 (2,2 – 18,4)	1,6	0,4 do 15,1	0,002
Kreatinin	74 (66 – 87)	79 (64 – 92)	2,5	-0,5 do 6,0	0,11
eGFR	80,7 (74,2 – 92,5)	78,2 (67,9 – 91,2)	-2,5	-5,6 do 0,4	0,12
hs CRP	1,75 (0,9 – 2,8)	2,4 (1,2 – 3,9)	0,65	0,4 do 1,1	<0,001

*Wilcoxonov test (Hodges-Lehmann median difference)

Nema značajne razlike u vrijednostima hs troponina I, kreatinina, eGFR i hs CRP između skupina kod bazalnog mjerenja i 24 sata nakon koronarne angiografije (Tablica 8).

Tablica 8. Razlike u biokemijskim pokazateljima između skupina kod bazalnog mjerenja i 24 sata nakon koronarne angiografije.

	Median (IQR)		Difference	95% CI	P*
	Kontrolna skupina	Interventna skupina			
Bazalne vrijednosti					
hs troponin I	3,3 (0,7 – 4,7)	3,7 (1,7 – 6,6)	0,6	-1,0 do 2,4	0,56
Kreatinin	75 (68 – 90)	74 (66 – 87)	0	-9 do 9	0,99
eGFR	79,6 (67,6 – 90,9)	80,7 (74,2 – 92,5)	0,8	-98,2 do 9,5	0,87
hs CRP	1,5 (0,7 – 3,7)	1,75 (0,9 – 2,8)	-0,1	-0,8 do 0,5	0,86
24 sata nakon koronarografije					
hs troponin I	4,4 (1,5 – 13,2)	5,1 (2,2 – 18,4)	1	-1,8 do 4,1	0,51
Kreatinin	74 (65 – 85)	79 (64 – 92)	5	-3 do 15	0,24
eGFR	84,1 (75,9 – 93,1)	78,2 (67,9 – 91,2)	-6,3	-13,7 do 1,9	0,12
hs CRP	2,1 (0,9 – 3,4)	2,4 (1,2 – 3,9)	0,35	-0,6 do 1,3	0,43

*Mann Whitney U test (Hodges-Lehmann median difference)

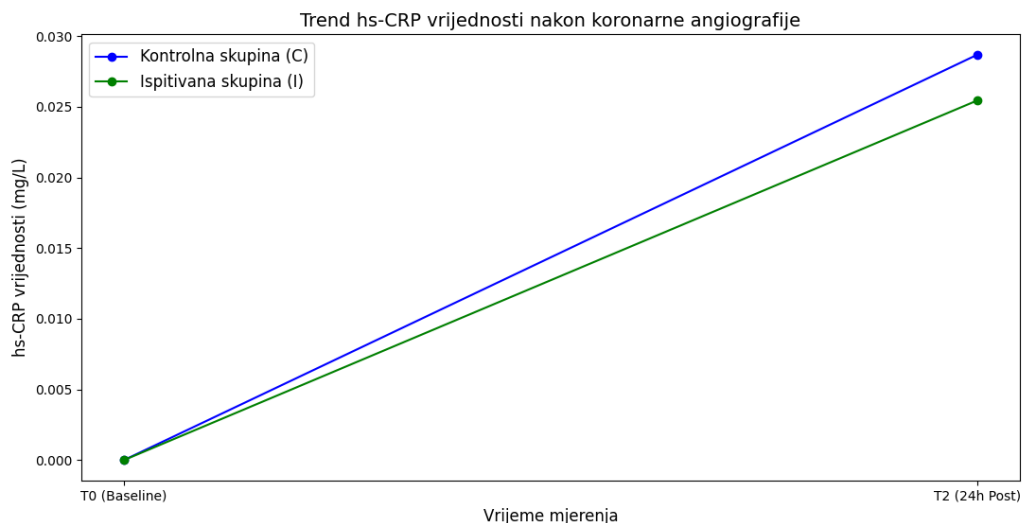
Nakon normalizacije vrijednosti biokemijskih pokazatelja intervencija je imala različit utjecaj na prikazane biokemijske parametre. Zabilježen je mali efekt na hs troponin I bez statističke značajnosti. Vrijednost kreatinina je blago porasla, iako je osnovna p-vrijednost ($p=0,01015$) značajna, prilagođena p-vrijednost ($p_{\text{pril.}}=0,24701$) sugerira da promjena nije značajna. Nadalje, došlo je do smanjenja eGFR (Efekt= $-0,017$) te osnovna p-vrijednost ($p=0,00417$) sugerira značajnu promjenu, no prilagođena p-vrijednost ($p_{\text{pril.}}= 0,15222$) nakon korekcije pokazuje da promjena nije značajna. Opaža se pozitivni efekt na hs CRP (Efekt= $0,014$) uz nisku standardnu pogrešku ($SP= 0,004$) što je statistički značajna ($p=0,00059$) promjena, ali nakon korekcije je manja prilagođena p-vrijednost ($p_{\text{pril.}}=0,04313$). Sve navedene promjene su prikazane u tablici 9.

Tablica 9. Efekt, standardna pogreška i prilagođena p-vrijednost za biokemijske pokazatelje.

	Efekt	SP	p	$p_{\text{pril.}}^*$
hs troponin I	0,002	0,008	0,82232	0,95285
Kreatinin	0,015	0,006	0,01015	0,24701
eGFR	-0,017	0,006	0,00417	0,15222
hs CRP	0,014	0,004	0,00059	0,04313

*Benjamini-Hochbergova korekcija

Usporedba porasta hs CRP vrijednosti između dvije skupine tijekom dva vremenska mjerenja: bazalno (T0) i nakon 24 sata (T2) otkriva da je trend porasta hs CRP manji u ispitivanoj skupini ($\Delta \text{hs CRP}= 0,003237328$) (Slika 9).



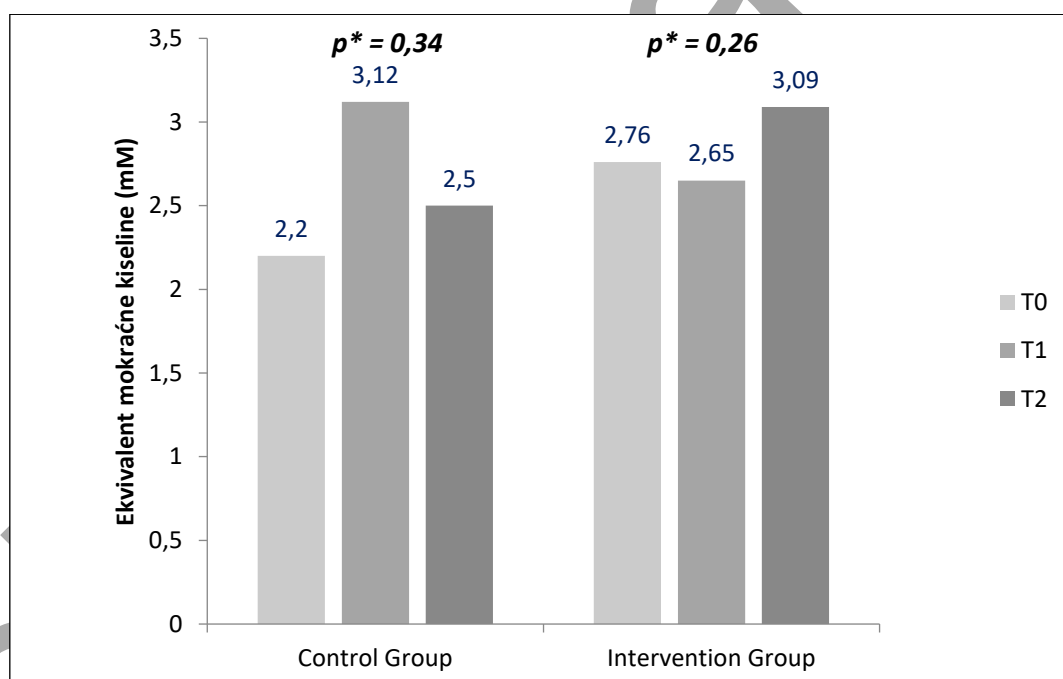
Slika 9. Razlika u trendu porasta hs CRP između dvije skupine.

5.5. Rezultati mjerenja ukupnog oksidacijski kapaciteta (TOC)

Obrađeno je ukupno 180 uzoraka (60 ispitanika u tri vremenske točke). Iz analize su isključeni hemolitični i lipemični uzorci. Preostalih 147 uzoraka ($t_0=49$, $t_1=43$ i $t_2=55$) nije dalo rezultate koji bi se mogli interpretirati. Direktno mjerenje endogenog peroksida (H_2O_2) u biološkom uzorku je zahtjevno zbog kratkog vremena poluživota i nestabilnosti visoko reaktivnih molekula što dovodi do nemogućnosti interpretacije dobivenog rezultata (142). Nadalje, uzrok konfliktnih rezultata mjerenja treba tražiti u mogućim interferencijama s lijekovima koje ispitanici uzimaju u trajnoj terapiji kada govorimo o bazalnom uzorku. Za uzorke nakon same procedure moguća je i interferencija s lijekovima koji se daju tijekom koronarne angiografije. Na primjer, kontrastno sredstvo korišteno tijekom angiografije može izazvati prooksidacijske učinke (143). Također, pojedini endogeni spojevi kao što su proteini, lipidi ili druge biomolekule mogu interferirati s reakcijama tijekom mjerenja ukupnog oksidacijskog kapaciteta (144).

5.6. Razlike u ukupnom antioksidacijskom kapacitetu (TAC) bazalno, 4 i 24 sata nakon koronarne angiografije

Vrijednosti TAC su 4 sata iza koronarne angiografije više u kontrolnoj skupini u odnosu na ispitivanu skupinu, dok su vrijednosti TAC 24 sata iza koronarne angiografije više u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. Nema značajnih razlika u vrijednostima TAC između mjerenja, u pojedinoj skupini bolesnika (Slika 10).



Slika 10. Razlike u TAC između mjerenja u pojedinoj skupini bolesnika.

T0 = bazalno mjerenje; T1 = mjerenje 4 sata iza koronarne angiografije; T2 = mjerenje 24 sata iza koronarne angiografije; *Fridemanov test.

Nema značajnih razlika u vrijednostima TAC između skupina, kod bazalnog mjerenja, te mjerenja 4 i 24 sata iza koronarne angiografije (Tablica 10).

Tablica 10. Razlike u TAC između skupina, u tri točke mjerenja.

	Median (IQR)		Difference	95% CI	P*
	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina			
Bazalna vrijednost					
TAC (n: 26/23)	2,39 (1,08 – 3,57)	2,50 (2,04 – 3,11)	-0,06	-0,08 do 0,76	0,87
4 sata nakon završene koronarografije					
TAC (n: 21/22)	3,12 (1,91 – 3,63)	2,65 (2,22 – 3,71)	-0,06	-0,81 do 0,74	0,90
24 sata nakon završene koronarografije					
TAC (n: 29/26)	2,50 (1,76 – 3,52)	2,94 (2,11 – 3,98)	0,41	-0,43 do 1,22	0,34

*Mann Whitney U test (Hodges-Lehmann median difference)

5.7. Razlike u oštećenju DNA u alkalnom komet testu bazalno, 4 i 24 sata nakon koronarne angiografije

Oštećenje DNA mjereno intenzitetom repa (TI) kometa u komet testu je značajno manje 24 sata iza koronarne angiografije u ispitivanoj u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann Whitney U test, P=0,019) (Tablica 11).

Tablica 11. Oštećenje DNA mjereno intenzitetom repa (TI) u komet testu.

Intenzitet repa kometa							
	Ispitivana skupina			Kontrolna skupina			
	Median	25 per	75 per	Median	25 per	75 per	<i>p</i> *
t0, n=3000	4,591084	0,7809	12,4553	4,161104	0,6558	12,0853	0,067
t1, n=3000	4,911155	0,9368	13,0040	5,438835	0,8856	14,9207	0,057
t2, n=3000	4,524698	0,6751	12,5777	4,749902	0,7255	14,5809	0,019

*Mann Whitney U test

t0 = bazalno mjerenje; t1 = mjerenje 4 sata iza koronarne angiografije; t2 = mjerenje 24 sata iza koronarne angiografije.

Oštećenje DNA mjereno duljinom repa (TL) kometa u komet testu je značajno manje u bazalnom mjerenju (Mann Whitney U test, $P=0,033$) te značajno manje 4 i 24 sata iza koronarne angiografije u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann Whitney U test, $P<0,01$) (Tablica 12).

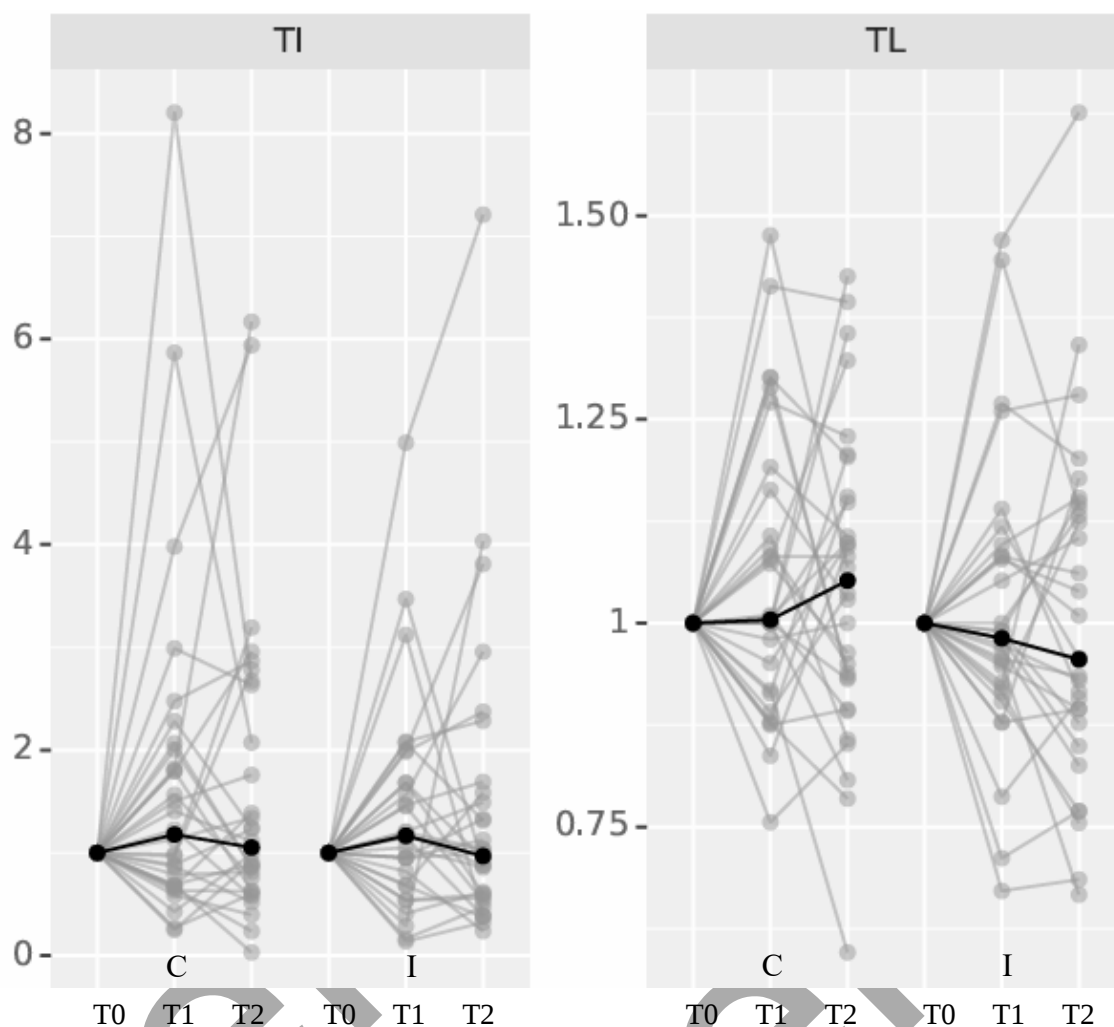
Tablica 12. Oštećenje DNA mjereno duljinom repa (TL) kometa u komet testu.

Duljina repa kometa							
	Ispitivana skupina			Kontrolna skupina			P^*
	Median	25 per	75 per	Medijan	25 per	75 per	
t0, n=3000	22,08333	17,9167	17,9167	22,5	18,3333	18,3333	0,033
t1, n=3000	22,5	17,5000	27,9167	22,91667	18,3333	29,5833	<0,01
t2, n=3000	22,08333	17,0833	27,5000	22,91667	17,9167	29,1667	<0,01

*Mann Whitney U test

t0 = bazalno mjerenje; t1 = mjerenje 4 sata iza koronarne angiografije; t2 = mjerenje 24 sata iza koronarne angiografije.

Nakon normalizacije i korekcije opaža se trend manjeg oštećenja DNA u alkalnom komet testu mjereno intenzitetom repa kometa 24 sata iza koronarne angiografije u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (Efekt= -0,009; SP= 0,012; $p= 0,45302$; $p_{\text{pril.}}= 0,81575$). Također je vidljivo smanjenje oštećenja DNA mjereno duljinom repa kometa 4 i 24 sata iza koronarne angiografije u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (Efekt= -0,010; SP=0,013; $p= 0,46248$; $p_{\text{pril.}}= 0,81575$). Prikazano na slici 11.



Slika 11. Intenzitet repa i duljina repa kometa između skupina u tri mjerne točke.

TI = intenzitet repa kometa; TL = duljina repa kometa; C = kontrolna skupina; I = ispitivana skupina; T0 = bazalno mjerenje; T1 = mjerenje 4 sata iza koronarne angiografije; T2 = mjerenje 24 sata iza koronarne angiografije.

5.8. Razlike u N-glikozilaciji imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme

Ukupno su izolirana 22 glikanska profila, uključujući 6 profila imunoglobulina G i 16 profila ukupnih proteina plazme. Glikanski profili ukupnih proteina plazme i IgG su dobiveni za sve uzorke. Na osnovu glikanskih profila su uspješno izračunata derivirana svojstva kako je opisano u poglavlju 4.3.4. Iako nije bilo značajne razlike u profilima glikana u skupinama prije i 24 sata nakon koronarne angiografije, opažen je trend modulacije N-glikozilacije imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme (Tablica 13 i 14, Slika 10 i 11). Provedena analiza glikanskih,

biokemijskih, kliničkih i proceduralnih parametara nije pokazala značajne razlike (Tablica 15 i 16).

5.8.1. Promjene N-glikozilacije imunoglobulina G nakon primjene empagliflozina i koronarne angiografije

U kontrolnoj skupini, 24 sata iza koronarne angiografije, N-glikozilacija imunoglobulina G pokazuje trend smanjenja udjela račvajućih N-acetilglukozamina (B), monogalaktoziliranih (G1) i digalaktoziliranih (G2) glikana imunoglobulina G te trend porasta udjela sržne fukoze (CF), agalaktoziliranih (G0) i sijaliniziranih (S) glikana imunoglobulina G (Tablica 13, Slika 10).

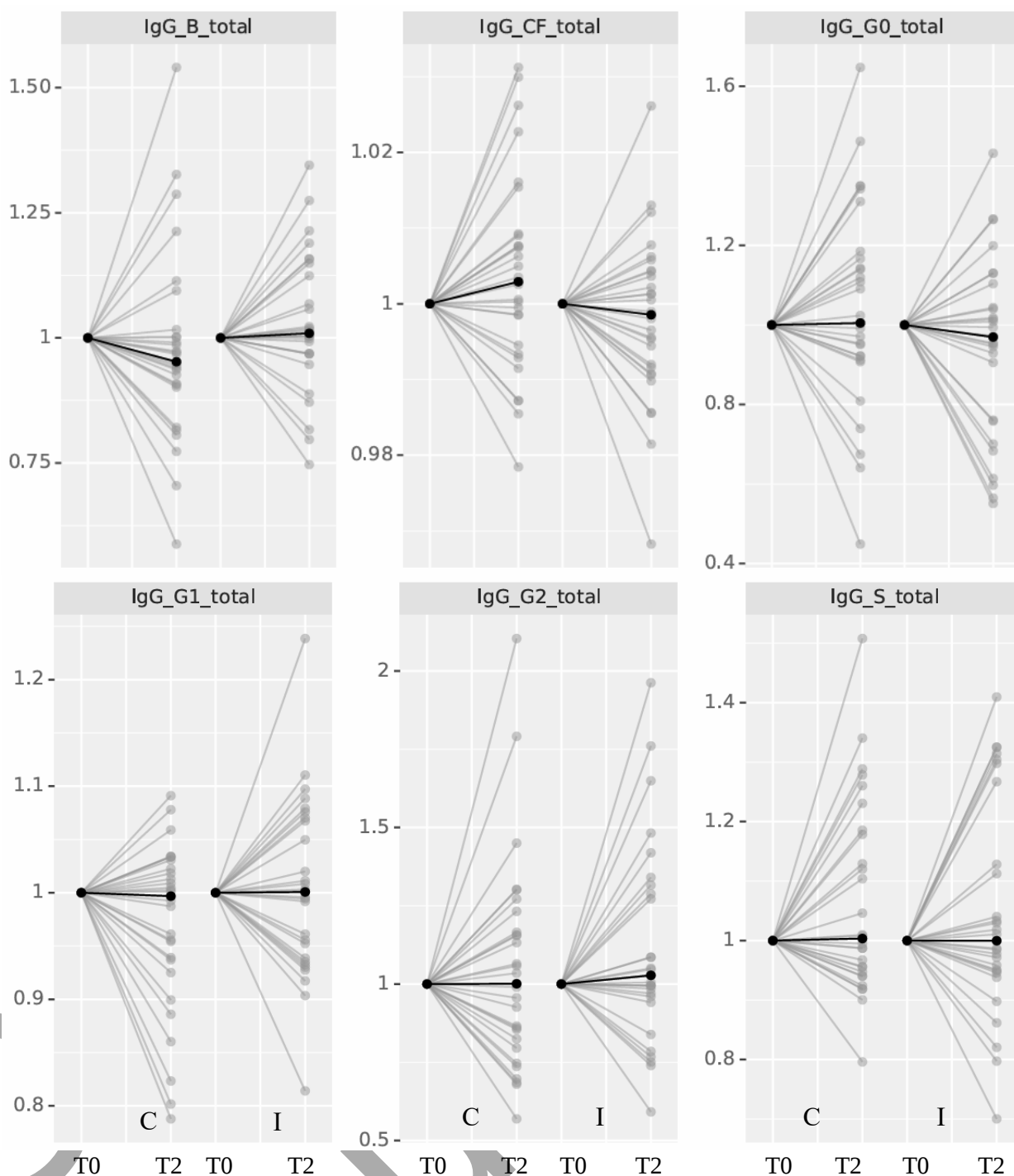
U ispitivanoj skupini, 24 sata iza koronarne angiografije, N-glikozilacija imunoglobulina G otkriva trend smanjenja udjela sržne fukoze (CF) i agalaktoziliranih (G0) glikana te održanu sijalizaciju (S) uz trend porasta račvajućih N-acetilglukozamina (B), monogalaktoziliranih (G1) i digalaktoziliranih (G2) glikana. Promjene nisu značajne, a najizraženiji utjecaj je na udio sržne fukoze (CF: Efekt= -0,026) i račvajućeg N-acetilglukozamina (B: Efekt= 0,022). Prikazano u tablici 13 i slici 12.

Tablica 13. Utjecaj intervencije na glikanski profil imunoglobulina G.

	Efekt	SP	<i>p</i>	<i>p</i> _pril*
IgG_B_ukupno	0,022	0,014	0,11963	0,81575
IgG_CF_ukupno	-0,026	0,014	0,06124	0,81575
IgG_G0_ukupno	-0,017	0,015	0,27118	0,81575
IgG_G1_ukupno	0,016	0,012	0,21015	0,81575
IgG_G2_ukupno	0,012	0,015	0,42976	0,81575
IgG_S_ukupno	-0,006	0,014	0,68936	0,86933

*Benjamini-Hochbergova korekcija

B = račvajući N-acetilglukozamin; CF = sržna fukoza; G0 = agalaktozilirani; G1 = monogalaktozilirani; G2 = digalaktozilirani i S = sijalinizirani glikani.



Slika 12. Razlike u N-glikozilaciji imunoglobulina G između skupina i smjer promjene glikozilacije između vremenskih točaka.

B = računajući N-acetilglukozamin; CF = sržna fukoza, G0 = agalktozilirani; G1 = monogalaktozilirani, G2 = digalaktozilirani i S = sijalinizirani glikani; C = kontrolna skupina; I = ispitivana skupina; T0 = bazalno mjerenje; T2 = mjerenje 24 sata iza koronarne angiografije.

5.8.2. Promjene N-glikozilacije ukupnih proteina plazme nakon primjene empagliflozina i koronarne angiografije

N-glikozilacija ukupnih proteina plazme, 24 sata iza koronarne angiografije, u kontrolnoj skupini pokazuje trend smanjenja udjela sržne fukoze (CF), afukoziliranih (AF), agalaktoziliranih (G0), račvajućih N-acetilglukozamina (B), visoko-manoznih (HM), monogalaktoziliranih (G1), asijaliniziranih (S0) i nisko-razgranatih (LB) glikana. Nepromijenjen je udio tetragalaktoziliranih (G4) i tetrasijaliniziranih (S4) glikana. Istovremeno se u istoj skupini prikazuje trend porasta udjela digalaktoziliranih (G2), trigalaktoziliranih (G3), monosijaliniziranih (S1), disijaliniziranih (S2), trisijaliniziranih (S3) i visoko-razgranatih (HB) glikana (Tablica 14, Slika 11).

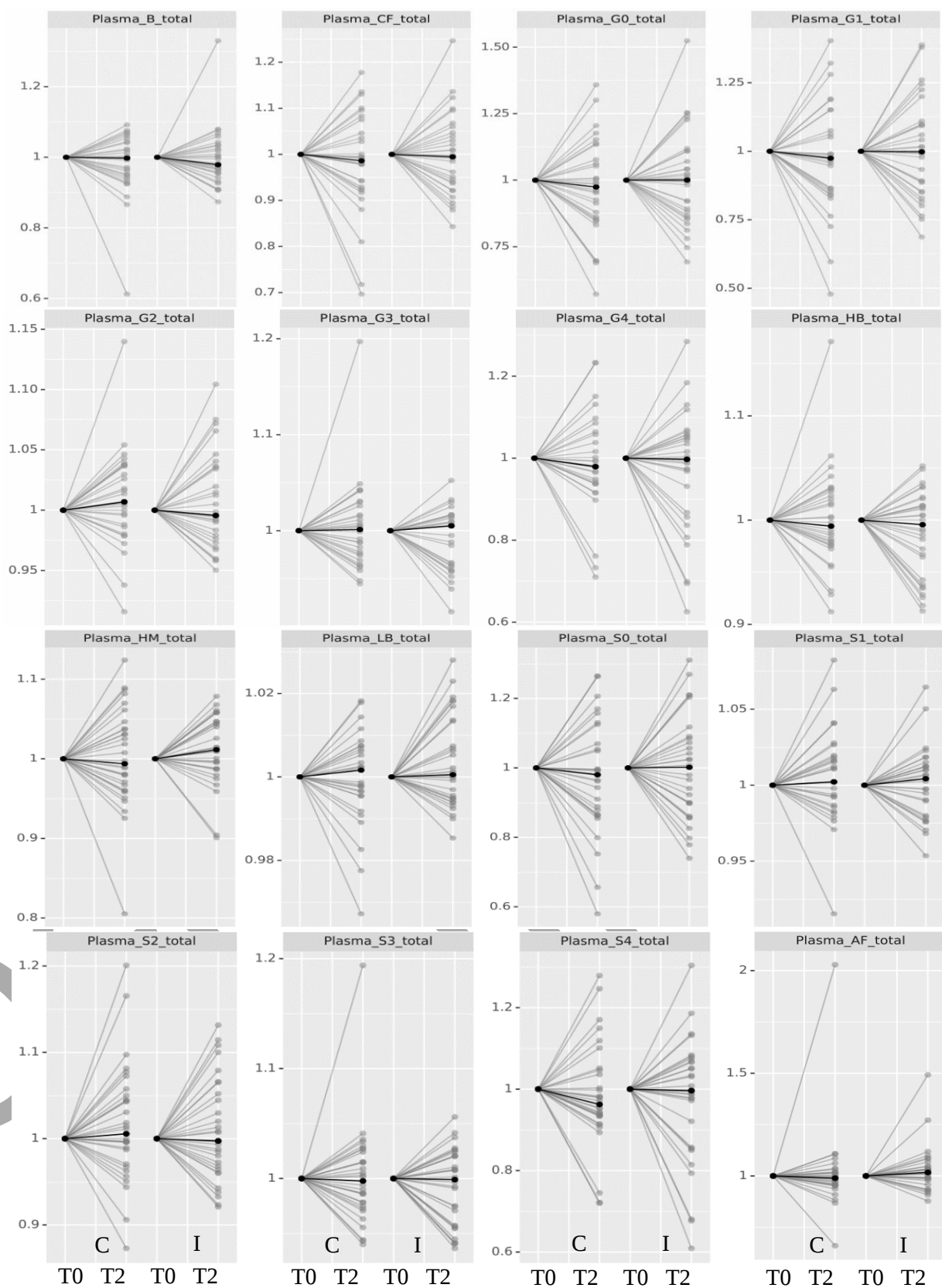
U ispitivanoj skupini, 24 sata iza koronarne angiografije, bilježi se trend smanjenog udjela visoko-razgranatih (HB), digalaktoziliranih (G2), trigalaktoziliranih (G3), disijaliniziranih (S2), trisijaliniziranih (S3) glikana. Nepromijenjen je udio tetragalaktoziliranih (G4), monosijaliniziranih (S1), tetrasijaliniziranih (S4) i visoko-manoznih (HM) glikana, dok je istovremeno prisutan trend porasta udjela račvajućeg N-acetilglukozamina (B), sržne fukoze (CF), antenarne fukoze (AF), agalaktoziliranih (G0), monogalaktoziliranih (G1), nisko-razgranatih (LB) i asijaliniziranih (S0) glikana. Navedene promjene nisu statistički značajne, a najveće pozitivne promjene uočene su za monogalaktozilirane (G1: Efekt=0,009) i afukozilirane (AF: Efekt= 0,006) glikane, dok su najveće negativne promjene opažene za trigalaktozilirane (G3: Efekt= - 0,007) i visoko-razgranate (HB: Efekt= -0,007) glikane. Prikazano u tablici 14 i slici 13.

Tablica 14. Utjecaj intervencije na glikanski profil ukupnih proteina plazme.

	Efekt	SP	<i>p</i>	<i>p</i> _pril*
Plazma_B_ukupno	0,003	0,006	0,63470	0,86695
Plazma_CF_ukupno	0,004	0,009	0,62670	0,86695
Plazma_G0_ukupno	0,007	0,009	0,39911	0,81575
Plazma_G1_ukupno	0,009	0,011	0,39788	0,81575
Plazma_G2_ukupno	-0,005	0,011	0,64749	0,86695
Plazma_G3_ukupno	-0,007	0,005	0,14190	0,81575
Plazma_G4_ukupno	-0,001	0,009	0,95639	0,99738
Plazma_HB_ukupno	-0,007	0,005	0,18506	0,81575
Plazma_HM_ukupno	0,002	0,007	0,77639	0,92913
Plazma_LB_ukupno	0,005	0,005	0,31348	0,81575
Plazma_S0_ukupno	0,010	0,011	0,35418	0,81575
Plazma_S1_ukupno	-0,002	0,005	0,66712	0,86933
Plazma_S2_ukupno	-0,007	0,012	0,59213	0,86451
Plazma_S3_ukupno	-0,005	0,005	0,27666	0,81575
Plazma_S4_ukupno	0,000	0,009	0,99757	0,99757
Plazma_AF_ukupno	0,006	0,005	0,26605	0,81575

*Benjamini-Hochbergova korekcija

B = računajući N-acetilglukozamin; CF = sržna fukoza; G0 = agalaktozilirani; G1 = monogalaktozilirani; G2 = digalaktozilirani; G3 = trigalaktozilirani; G4 = tetragalaktozilirani; HB = visoko-razgranati; HM = visoko-manozni; LB = nisko-razgranati; S0 = asijalinizirani; S1 = monosijalinizirani; S2 = disijalinizirani; S3 = trisijalizirani; S4 = tetrasijalinizirani i AF = antenarna fukoza.



Slika 13. Razlike u N-glikozilaciji ukupnih proteina plazme između skupina i smjer promjena glikozilacije između vremenskih točaka.

B = račvajući N-acetilglukozamin; CF = sržna fukoza; G0 = agalktozilirani; G1 = monogalaktozilirani; G2 = digalaktozilirani; G3 = trigalaktozilirani; G4 = tetragalaktozilirani; HB = visoko-razgranati; HM = visoko-manozni; LB: nisko-razgranati; S0 = asijalinizirani; S1 = monosijalinizirani; S2 = disijalinizirani; S3 = trisijalinizirani; S4 = tetrasijalinizirani i AF = anternarna fukoza; C = kontrolna skupina; I = ispitivana skupina; T0 = bazalno mjerenje; T2 = mjerenje 24 sata iza koronarne angiografije.

5.8.3. Analiza odnosa kliničkih i laboratorijskih varijabli s ukupnim antioksidacijskim kapacitetom

Ispitivanje povezanosti kliničkih i laboratorijskih varijabli u odnosu na ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) nije pokazala statističke značajnosti, ali je pokazala određene trendove (Tablica 15). Ranija perkutana koronarna intervencija (Efekt= 0,014, p= 0,47174, p_pril.= 0,81575) i infarkta miokarda (Efekt= 0,018, p= 0,30609, p_pril.= 0,81575) u anamnezi su pokazali pozitivni trend bez statističkog značaja. Navika pušenja je imala blago pozitivan trend (Efekt=0,006, p= 0,69070, p_pril.=0,86933) dok je konzumacija alkohola pokazala negativan trend (Efekt= - 0,026, p= 0,10822, p_pril.= 0,81575). U laboratorijskim parametrima blagi pozitivni trend HbA1c (Efekt= 0,009, p= 0,21380, p_pril.= 0,81575) te negativan trend za vitamin D (Efekt= -0,007, p= 0,23586, p_pril.= 0,81575) i LDL kolesterol (Efekt= -0,005, p= 0,46443, p_pril.=0,81575). Menopauza je pokazala blago negativan trend (Efekt= -0,023, p= 0,37554, p_pril.=0,81575).

Tablica 15. Analiza povezanosti kliničkih i laboratorijskih pokazatelja s ukupnim antioksidacijskim kapacitetom.

Varijabla_1	Varijabla_2	Efekt	SP	<i>p</i>	<i>p</i> *_pril.
KBS	TAC	0,001	0,013	0,94615	0,99738
IM	TAC	0,018	0,017	0,30609	0,81575
PCI	TAC	0,014	0,019	0,47174	0,81575
menopauza	TAC	-0,023	0,026	0,37554	0,81575
pušenje	TAC	0,006	0,014	0,69070	0,86933
alkohol	TAC	-0,026	0,016	0,10822	0,81575
ITM	TAC	-0,004	0,007	0,57851	0,86451
SKT	TAC	-0,001	0,006	0,87795	0,98600
DKT	TAC	0,006	0,006	0,35582	0,81575
puls	TAC	0,006	0,006	0,34679	0,81575
LDL-K	TAC	-0,005	0,007	0,46443	0,81575
Feritin	TAC	-0,002	0,006	0,73755	0,89735
HbA1C	TAC	0,009	0,007	0,21380	0,81575
Vit. D	TAC	-0,007	0,006	0,23586	0,81575
Grupa	TAC	0,016	0,013	0,21050	0,81575

*Benjamini-Hochbergova korekcija

KBS = koronarna bolest srca u anamnezi; IM = infarkt miokarda u anamnezi; PCI = perkutana koronarna intervencija u anamnezi; ITM = indeks tjelesne mase (kg/m²); SKT = sistolički krvni tlak (mmHg); DKT = dijastolički krvni tlak (mmHg); LDL-K = LDL kolesterol; HbA1c = glikirani hemoglobin.

5.8.4. Analiza povezanosti karakteristika procedure s oštećenjem DNA, bubrežnom funkcijom, N-glikozilacijom imunoglobulina G i ukupnim antioksidacijskim kapacitetom

Ispitivanje utjecaja karakteristika procedure koje uključuju dozu zračenja (DAP), vrijeme zračenja (FT) i volumen kontrastnog medija (CM) s oštećenjem DNA, bubrežnom funkcijom, N-glikozilacijom imunoglobulina G i ukupnim antioksidacijskim kapacitetom nije pokazala statističku značajnost, ali je ukazala na trendove (Tablica 16). Najizraženiji pozitivan trend se opaža za duljinu repa (TL) kometa (DAP: Efekt 0,011, *p*= 0,08424; FT: Efekt 0,011, *p*= 0,08534; CM: Efekt= 0,009, *p*= 0,17093) dok je prilagođena *p* vrijednost za sve tri varijable

jednaka ($p_{\text{pril.}} = 0,81575$). Opaža se i pozitivan trend za intenzitet repa (TI) kometa identičnog efekta za sve tri varijable (Efekt= 0,004) i prilagođene p vrijednosti ($p_{\text{pril.}} = 0,81575$). Blago pozitivan trend za kreatinin u sve tri varijable (DAP: Efekt 0,003, $p = 0,28641$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$; FT: Efekt= 0,002, $p = 0,54359$, $p_{\text{pril.}} = 0,86451$; CM: Efekt=0,003, $p = 0,33075$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$). N-glikozilacija imunoglobulina G je pokazala dosljedan trend smanjenja monogalaktoziliranih profila za sve tri varijable (DAP: Efekt = - 0,004, $p = 0,52409$, $p_{\text{pril.}} = 0,86451$; FT: Efekt= - 0,007, $p = 0,23361$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$; CM: Efekt= - 0,005, $p = 0,44167$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$) i trend porasta sijalizacije za sve tri varijable (DAP: Efekt= 0,004, $p = 0,57470$, $p_{\text{pril.}} = 0,86451$; FT: Efekt= 0,010, $p = 0,15787$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$; CM: Efekt= 0,003, $p = 0,64443$, $p_{\text{pril.}} = 0,86695$). Utjecaj na ukupni antioksidacijski kapacitet je pozitivan za sve tri varijable, a najizraženiji za volumen kontrasta (CM: Efekt= 0,011, $p = 0,07904$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$).

Tablica 16. Analiza utjecaja karakteristika procedure: doza zračenja, vrijeme zračenja i volumen kontrastnog medija na oksidacijsko oštećenje DNA, bubrežnu funkciju, N-glikozilaciju imunoglobulina G i ukupni antioksidacijski kapacitet.

Varijabla_1	Varijabla_2	Efekt	SP	<i>p</i>	<i>p</i> *_pril.
DAP	TL	0,011	0,006	0,08424	0,81575
DAP	TI	0,004	0,006	0,45253	0,81575
DAP	kreatinin	0,003	0,003	0,28641	0,81575
DAP	IgG_G0_ukupno	0,001	0,007	0,89667	0,99178
DAP	IgG_G1_ukupno	-0,004	0,006	0,52409	0,86451
DAP	IgG_G2_ukupno	0,000	0,008	0,99639	0,99757
DAP	IgG_S_ukupno	0,004	0,007	0,57470	0,86451
DAP	IgG_B_ukupno	0,004	0,007	0,57618	0,86451
DAP	IgG_CF_ukupno	-0,004	0,007	0,58045	0,86451
DAP	TAC	0,002	0,006	0,79882	0,94054
FT	kreatinin	0,002	0,003	0,54359	0,86451
FT	TL	0,011	0,006	0,08534	0,81575
FT	TI	0,004	0,006	0,48051	0,81575
FT	IgG_S_ukupno	0,010	0,007	0,15787	0,81575
FT	IgG_G0_ukupno	0,000	0,008	0,98831	0,99757
FT	IgG_G1_ukupno	-0,007	0,006	0,23361	0,81575
FT	IgG_G2_ukupno	0,001	0,008	0,91708	0,99593
FT	TAC	0,003	0,007	0,65318	0,86695
FT	IgG_B_ukupno	0,001	0,007	0,83554	0,95304
FT	IgG_CF_ukupno	0,002	0,007	0,72244	0,89387
CM	TL	0,009	0,006	0,17093	0,81575
CM	TAC	0,011	0,006	0,07904	0,81575
CM	IgG_G2_total	0,009	0,008	0,21050	0,81575
CM	kreatinin	0,003	0,003	0,33075	0,81575
CM	IgG_B_ukupno	-0,007	0,007	0,34409	0,81575
CM	IgG_G0_ukupno	-0,006	0,007	0,42826	0,81575
CM	IgG_G1_ukupno	-0,005	0,006	0,44167	0,81575
CM	TI	0,004	0,006	0,46275	0,81575
CM	IgG_S_ukupno	0,003	0,007	0,64443	0,86695
CM	IgG_CF_ukupno	-0,001	0,007	0,92772	0,99593

*Benjamini-Hochbergova korekcija

DAP = doza zračenja; FT = vrijeme zračenja (min) i CM = volumen kontrastnog sredstva (ml).

6. RASPRAVA

Koronarna angiografija je invazivna kardiološka dijagnostička metoda koja omogućuje vizualizaciju koronarnih arterija primjenom kontrastnog sredstva pod rendgenskim zračenjem. Od prvog izvođenja 1958. godine, postala je zlatni standard u dijagnostici koronarne bolesti srca (1). Danas se izvodi s niskom učestalošću komplikacija (<1%) i minimalnim rizikom smrtnosti (<0,05%) (7). Unatoč tehničkim unapređenjima, određeni rizici ostaju, osobito rizik od kontrastom inducirane akutne bubrežne ozljede (CI-AKI) (8). Komplikacije se mogu podijeliti na one povezane s psihološkim stresom, vaskularnim pristupom, primjenom kontrastnog sredstva i rendgenskim zračenjem. Bolesnici podvrgnuti koronarnoj angiografiji često imaju povišenu razinu anksioznosti, osobito mlađe osobe, žene i oni koji se podvrgavaju perkutanoj koronarnoj intervenciji (14). Također, dulje čekanje na pretragu može povećati anksioznost i biti povezano s nepovoljnijim kardiovaskularnim ishodima (15,16). Premedikacija benzodiazepinima pokazala se korisnom u smanjenju anksioznosti prije zahvata (9). Vaskularni pristup igra važnu ulogu u riziku komplikacija – femoralni pristup nosi rizik razvoja pseudoaneurizmi, AV fistula, krvarenja i tromboza, dok je transradijalni pristup značajno smanjio učestalost ovih komplikacija, iako ih nije potpuno eliminirao (19). Najčešća komplikacija transradijalnog pristupa je spazam radijalne arterije, dok tromboza radijalne arterije ima učestalost 5-10% (20-22). Oporavak endotelne funkcije nakon kateterizacije radijalne arterije traje oko 3 mjeseca, dok glatke mišićne stanice arterije trebaju 1-6 mjeseci za potpuni oporavak (25). Kontrastna sredstva koja sadržavaju jod ključna su za vizualizaciju arterija, no njihova razgradnja dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i narušavanja redoks homeostaze (27). Kontrast pokazuje direktnu citotoksičnost prema bubrežnim tubularnim epitelnim stanicama, čime povećava rizik CI-AKI (32). Istraživanja su pokazala da je minimalni porast serumskog kreatinina (5-10%) unutar 12 sati osjetljiv marker rizika za CI-AKI (46). Negativni učinci ionizirajućeg zračenja izravno su povezani s dozom zračenja, a istraživanja pokazuju da izlaganje rendgenskim zrakama dovodi do povećanja produkcije ROS i smanjenja antioksidacijskih enzima, što doprinosi endotelnoj disfunkciji (49). Meta-analiza 93 studije potvrdila je povezanost doze zračenja i rizika od kardiovaskularnih bolesti (54). Povezanost koronarne angiografije i oksidacijskog stresa ispitivana je kroz analizu prisustva ROS, a kasnije su u primjenu uvedene metode kvantificiranja oštećenja DNA, poput alkalnog komet testa u cirkulirajućim limfocitima bolesnika nakon PTCA (63). Kasnija istraživanja pokazala su da i dijagnostička angiografija može uzrokovati značajno oštećenje DNA (65). Primjena antioksidansa, poput vitamina C, pokazala je smanjenje reperfuzijskog

oštećenja miokarda i pad koncentracije markera oksidacijskog stresa nakon koronarne angiografije (66). Glikokaliks je glikoproteinski sloj koji oblaže endotelne stanice krvnih žila, djelujući kao barijera između lumena i intime krvne žile. Ima ključnu ulogu u prijenosu signala, regulaciji adhezije leukocita i prevenciji tromboze (68). Njegovo stanjenje je dokazano kod bolesnika s koronarnom bolešću srca i arterijskom hipertenzijom (105,106). Studije su pokazale da promjena N-glikozilacije IgG s višestrukom sržnom fukozilacijom povećava rizik ateroskleroze, dok je sijalizacija N-glikana IgG povezana s protektivnim učinkom (107). Pravilna glikozilacija igra važnu ulogu i u funkciji bubrega, budući da glomerularna filtracijska membrana sadrži endotelne stanice prekrivene glikokaliksom, što sprječava propuštanje proteina i makromolekula (111). Inhibitori natrij-glukoza kotransportera 2 (SGLT2i), poput empagliflozina, primarno su razvijeni za liječenje šećerne bolesti tip 2, no istraživanja su pokazala njihove pleiotropne učinke, uključujući kardioprotekciju i nefroprotekciju (122-126). Eksperimentalna istraživanja na dijabetičkim animalnim modelima pokazala su da empagliflozin smanjuje lipidne hidroperokside i malondialdehid, ključne markere oksidacijskog stresa, povećava aktivnost antioksidacijskih enzima, uključujući superoksid dismutazu i glutation peroksidazu, smanjuje razinu mitohondrijskih i unutarstaničnih ROS u dijabetičkim endotelnim stanicama srčanog tkiva (130,131). Ovi nalazi podržavaju hipotezu da empagliflozin može imati zaštitni učinak na oksidacijsko oštećenje izazvano koronarnom angiografijom radi prevencije komplikacija povezanih s invazivnim kardiološkim procedurama.

Rezultati koji su dobiveni u ovom istraživanju ukazuju da primjena jedne doze SGLT2 inhibitora, empagliflozina modulira odgovor na stres kod bolesnika koji se podvrgava invazivnoj proceduri kao što je koronarna angiografija. U skupini ispitanika koji su povrh standardne skrbi dobili i empagliflozin 10 mg je pokazan rastući antioksidacijski trend mjeren ukupnim antioksidacijskim kapacitetom, zatim značajno manje oštećenje DNA mjereno intenzitetom repa i duljinom repa kometa u alkalnom komet testu i potencijalno moduliranje upalnog odgovora u zabilježenim promjenama N-glikozilacije imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme.

Istraživanje je provedeno prospektivno, randomizirano i uključilo je dvije skupine ispitanika s ciljem procjene učinka jedne doze SGLT2 inhibitora, empagliflozina na stres kod bolesnika koji se podvrgavaju invazivnoj proceduri, dijagnostičkoj koronarnoj angiografiji. Kontrolna i ispitivana skupina nisu se razlikovale po dobi, spolnoj zastupljenosti, antropometrijskim i kliničkim obilježjima, jedina razlika je bila u vrijednostima sistoličkog krvnog tlaka koji je bio viši u ispitivanoj skupini (medijan 133 mmHg vs. 124 mmHg , $p=0,02$) (Tablica 3 i 4). Nije

uočena značajna razlika između skupina u niti jednom od analiziranih laboratorijskih parametara, što sugerira da su obje skupine imale usporedive početne vrijednosti prije intervencije (Tablica 5). Posebno je važno napomenuti da nije uočena značajna razlika u HbA1c ($p = 0,20$), što dodatno potvrđuje sličan metabolički status između skupina. Dobiveni rezultati ukazuju na homogenost ispitivanih skupina u pogledu laboratorijskih nalaza prije intervencije, što omogućava objektivnu procjenu učinka terapije bez utjecaja početnih razlika u metaboličkom ili hematološkom statusu bolesnika.

Parametri povezani s izvođenjem angiografske procedure, uključujući vrijeme zračenja (FT), dozu zračenja (DAP) i volumen primijenjenog kontrastnog medija (vol. CM) odražavaju karakteristike same procedure. Rezultati pokazuju da nije bilo značajnih razlika između kontrolne i ispitivane skupine u niti jednom od ovih parametara (sve p -vrijednosti $> 0,05$). To potvrđuje da je sam postupak izvođenja koronarne angiografije bio usporediv u obje skupine, što znači da eventualni učinci empagliflozina na biološke parametre nisu posljedica različitog izvođenja procedure, već isključivo učinka lijeka. Ova analiza osigurava da su bolesnici u obje skupine bili izloženi sličnim uvjetima tijekom zahvata, čime se smanjuje mogućnost metodoloških pristranosti i omogućava preciznija procjena utjecaja empagliflozina na oksidacijski stres i ostale ispitivane parametre. Eksperimentalna vrijednost istraživanja je pojačana činjenicom da se dvije skupine nisu razlikovale te je istraživanje provedeno kontrolirano, što je u skladu s preporukama iz literature (145,146). Nadalje, u ovom istraživanju uspješno su izmjereni ključni parametri oksidacijskog stresa i upalnog odgovora, čime je prikazan učinak empagliflozina. Konkretno, određen je ukupni antioksidacijski kapacitet, koji odražava razinu oksidacijskog stresa i antioksidacijsku aktivnost empagliflozina. Također, izmjereno je oštećenje DNA, nastalo kao direktna posljedica disbalansa redoks homeostaze, te N-glikani, koji služe kao biomarkeri upalnih procesa induciranih oksidacijskim stresom. Ovi parametri su odabrani u skladu sa smjernicama koje su publicirali Murphy i sur., čime se potvrđuje relevantnost i metodološka utemeljenost provedenog istraživanja (147).

6.1. Utjecaj empagliflozina na biokemijske pokazatelje nakon koronarne angiografije

U ovom istraživanju rezultati mjerenja biljega nekroze miokarda ukazuju na značajno više otpuštanje hs troponina I u cirkulaciju 24 sata iza pretrage u odnosu na bazalnu vrijednost kod obje skupine ispitanika (kontrolna skupina medijan 3,3 ng/L vs. 4,4 ng/L, $p=0,006$; ispitivana skupina medijan 3,7 ng/L vs. 5,1 ng/L, $p=0,002$) (Tablica 7). Nije zabilježena značajna razlika

u vrijednostima hs troponina I bazalno i nakon 24 sata između dvije skupine (Tablica 8). Ovakav rezultat je u skladu s ranijim istraživanjima koja su pokazala da je ne samo perkutana koronarna intervencija nego i dijagnostička koronarna angiografija povezana sa značajnim porast biljega nekroze miokarda kao što je hs troponin T (147). Porast hs troponina I ipak je bio unutar referentnih vrijednosti i niti jedan ispitanik nije imao kliničke simptome povezane s ishemijom kao ni promjene u elektrokardiogramu. Porast kardiospecifičnog biljega ukazuje na stres uslijed invazivne pretrage koja može dovesti do sustavnog upalnog odgovora i mikrooštećenja miokarda kao što su pokazali Goldberg i suradnici u svom istraživanju (148). Porast hs CRP zabilježen je u obje skupine što je očekivani odgovor na stres povezan s invazivnim postupkom. Zabilježen je statistički značajan porast hs CRP u ispitivanoj skupini s malom standardnom pogreškom, a nakon korekcije i manjom p-prilagođenom vrijednosti (Efekt = 0,014; SP= 0,004; p=0,00059; p_pril.= 0,04313). Istovremeno, trend porasta hs CRP je bio manji u ispitivanoj skupini (Slika 7) što može ukazivati na potencijalni učinak empagliflozina u smanjenju upalnog odgovora. Brojna istraživanja ukazuju na smanjenje CRP nakon primjene SGLT2 inhibitora, no meta-analiza Wang i suradnika pokazala je da ukupno nije bilo značajne razlike u razini CRP, osim u placebo kontroliranim studijama gdje je zabilježena razlika (149). Meta analiza istraživanja provedenih na animalnim modelima koja su istraživala utjecaj tretmana SGLT2 inhibitorima pokazala je dosljedno i značajno smanjenje upalnih biljega, uključujući i CRP (150). Primjena empagliflozina bila je povezana sa smanjenjem upalnih biljega poput hs CRP kod bolesnika sa šećernom bolesti tip 2 (151). Zinman i sur. su u svom istraživanju pokazali smanjenje kardiovaskularnih događaja koji su povezani s upalom i oksidacijskim oštećenjem što ukazuje na citoprotektivni učinak lijeka (152).

Kod procjene bubrežne funkcije pratili smo eGFR i kreatinin, obzirom da se radi o invazivnoj pretrazi koja uključuje primjenu kontrastnog sredstva što može nepovoljno utjecati na bubrežnu funkciju. Određivanje eGFR je najbolji pokazatelj bubrežne funkcije obzirom da reflektira stupanj filtracije krvi u bubrežima. Mjerenje razine kreatinina standardno se koristi kao klinički marker bubrežne funkcije, budući da povišene vrijednosti ukazuju na smanjenu sposobnost bubrega za filtraciju otpadnih tvari, iako promjena razine kreatinina može kasniti u otkrivanju akutnih promjena, pa se kombinacija s eGFR smatra preciznijom. U ispitivanoj skupini vrijednost eGFR je smanjena nakon intervencije, a p-vrijednost (p=0,04) ukazuje na statističku značajnost prije normalizacije podataka. Između dvije skupine nije bilo značajne razlike u vrijednostima eGFR prije i dan nakon procedure. Nije opažena značajna promjena vrijednosti kreatinina u skupinama prije i 24 h nakon zahvata kao niti između skupina u oba mjerna

vremena. Opaženi trend porasta kreatinina i smanjenje eGFR 24 sata nakon koronarne angiografije u ispitivanoj skupini može se objasniti farmakološkim djelovanjem lijeka i hemodinamskim učincima na bubrege. SGLT2 inhibitori smanjuju reapsorpciju natrija u proksimalnim tubulima što povećava količinu natrija koja dolazi do makule dense i posljedično aktivacije tubuloglomerularne povratne sprege koja rezultira konstrikcijom aferentne arteriole i smanjenjem glomerularnog tlaka, te posljedično pada eGFR. Takvo smanjenje eGFR s porastom kreatinina 24 do 48 sati nakon primjene lijeka je hemodinamski odgovor i rana prilagodba bubrežne funkcije (153). Osmotska diureza (natriureza i glukozurija) zbog mehanizma djelovanja lijeka dovode do intravaskularne deplecije i redistribucije volumena što doprinosi smanjenju glomerularnog tlaka (154). Ove promjene hemodinamike i bubrežne funkcije su prolaznog karaktera i ne znače akutno oštećenje bubrega. Bolesnicima koji su na kroničnoj terapiji SGLT2 inhibitorima se savjetuje odgovarajuća hidracija pogotovo u slučaju povećanja stresa u organizmu kao kod akutnih infekcija (155). Pa tako i kod bolesnika koji se podvrgavaju invazivnim procedurama s upotrebom kontrasta nakon pretrage se provodi hidracija peroralnim ili parenteralnim putem. U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima kreatinina i eGFR između dvije skupine, što ukazuje na ključnu ulogu adekvatne postproceduralne hidracije u očuvanju bubrežne funkcije nakon koronarne angiografije.

6.2. Utjecaj empagliflozina na ukupni oksidacijski kapacitet (TOC) nakon koronarne angiografije

Određivanje TOC metodom mjerenja endogenog peroksida (H_2O_2) na osnovu reakcije s peroksidazom suočava se s nekoliko ograničenja i potencijalnih izvora pogreške. Direktno mjerenje endogenog H_2O_2 u biološkim uzorcima izrazito je zahtjevno zbog njegovog kratkog poluživota i visoke reaktivnosti. H_2O_2 se brzo razgrađuje u prisutnosti katalaze i drugih redoks sustava, što dovodi do varijabilnih rezultata i smanjene pouzdanosti mjerenja. Nadalje, njegova razina u uzorku može biti podložna promjenama tijekom pripreme i skladištenja, što dodatno otežava interpretaciju dobivenih rezultata (142). Interferencija s lijekovima u bazalnim i postproceduralnim uzorcima može kompromitirati određivanje TOC. U bazalnim uzorcima, kronična terapija ispitanika (npr. antihipertenzivi, statini) može utjecati na aktivnost oksidacijskih i antioksidacijskih sustava, stvarajući nepredvidivu interferenciju (143). U postproceduralnim uzorcima, dodatni lijekovi primijenjeni tijekom angiografije (npr. heparin,

nitroglicerina) mogu utjecati na rezultate peroksidazne reakcije, otežavajući pouzdanu procjenu stvarnog oksidacijskog kapaciteta. Kontrastna sredstva koja se koriste tijekom koronarne angiografije mogu inducirati oksidacijski stres putem povećane proizvodnje ROS, utjecati na redoks ravnotežu interakcijom s endogenim antioksidacijskim enzimima i povećati oksidacijsko oštećenje lipida i proteina te na taj način otežati tumačenje dobivenih rezultata (144). Interferencija s endogenim biomolekulama može dodatno utjecati na peroksidaznu reakciju. Proteini, posebno oni bogati tiolnim skupinama (npr. albumin, glutation), mogu reducirati H_2O_2 , mijenjajući izmjerene vrijednosti. Lipidi, uključujući oksidirane lipoproteine, mogu interferirati s peroksidaznim enzimima, dovodeći do promjena u kinetici reakcije. Mali metaboliti (npr. bilirubin, mokraćna kiselina) mogu djelovati kao antioksidansi ili prooksidansi, čime dodatno kompliciraju interpretaciju rezultata.

6.3. Utjecaj empagliflozina na ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) nakon koronarne angiografije

Trend promjena ukazuje na povećanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u obje skupine kroz vrijeme, ali ni u jednoj skupini promjene nisu značajne. Ispitivana skupina ima na početku nešto viši bazalni ukupni antioksidacijski kapacitet u usporedbi s kontrolom, što može ukazivati na bolje metaboličke uvjete u ovoj skupini prije procedure. U kontrolnoj skupini dogodio se nagli porast 4 sata nakon koronarne angiografije (t1), nakon čega slijedi pad 24 sata nakon koronarne angiografije (t2), dok je istovremeno u ispitivanoj skupini vidljiv stabilniji trend s konačnim porastom ukupnog antioksidacijskog kapaciteta 24 sata nakon koronarne angiografije (t2) (Slika 8). Ovakav rezultat sugerira da empagliflozin može doprinijeti stabilnijem antioksidacijskom odgovoru što je u skladu s literaturom koja ukazuje na kardioprotektivne učinke SGLT2 inhibitora. Istraživanje koje su proveli Daniele i suradnici ukazuje na zaštitne učinke empagliflozina u kontekstu kardiotoksičnosti uslijed kemoterapije, uključujući smanjenje upale i oksidacijskog stresa (156). Studija objavljena u časopisu *Cellular Signalling* pokazala je da empagliflozin smanjuje oksidacijski stres induciran hiperglikemijom u stanicama humanog bubrežnog epitela, što je povezano s regulacijom ekspresije gena koji su uključeni u upalu i oksidacijski stres (157). Nedavno objavljena klinička studija ispitala je učinak empagliflozina na serumske pokazatelje oksidacijskog stresa kod bolesnika sa šećernom

bolesti tip 2 i srčanom insuficijencijom te pokazala poboljšanje oksidacijskog profila nakon 12 tjedana terapije empagliflozinom (158).

6.4. Učinak empagliflozina na oksidacijsko oštećenje DNA nakon koronarne angiografije

Analiza je provedena prije i nakon normalizacije i korekcije podataka, čime je omogućena preciznija procjena utjecaja intervencije. Prije normalizacije nije bilo značajne razlike u intenzitetu repa kometa (TI) između dvije skupine u bazalnom mjerenju (t0). Nakon 4 sata (t1) opaža se povećanje oštećenja DNA, mjereno intenzitetom repa kometa, u obje skupine, no ono je bilo izraženije u kontrolnoj skupini, iako razlika nije dosegla statističku značajnost ($p=0,057$). Nakon 24 sata (t2) oštećenje DNA (TI) se smanjilo u obje skupine, ali značajno više u ispitivanoj skupini ($p=0,019$). Analiza duljine repa kometa (TL) je pokazala značajnu razliku između skupina u bazalnom (t0) mjerenju ($p=0,033$), pri čemu je kontrolna skupina imala nešto veće vrijednosti u odnosu na ispitivanu skupinu. Nakon 4 sata (t1) duljina repa kometa (TL) porasla je u obje skupine, ali je taj porast bio značajno veći u kontrolnoj skupini ($p<0,01$), što ukazuje na veće oštećenje DNA u skupini koja nije primala empagliflozin. Nakon 24 sata (t2), duljina repa (TL) u ispitivanoj skupini se smanjuje dok u kontrolnoj ostaje povišen ($p<0,01$). Ova promjena sugerira brži oporavak DNA kod ispitanika koji su primali empagliflozin. Nakon normalizacije i korekcije podataka, glavni trendovi su ostali isti, a individualne varijacije unutar skupina su smanjene, što povećava pouzdanost rezultata i ističe jasniju razliku između skupina. Pokazalo se da oba parametra (TI i TL) doprinose procjeni oksidacijskog stresa i oštećenja DNA. Rezultat sugerira da empagliflozin može smanjiti oksidacijsko oštećenje DNA inducirano koronarnom angiografijom. Ovaj učinak može biti posljedica antioksidacijskog djelovanja ili poboljšanja metaboličke homeostaze, što je u skladu s rezultatom ukupnog antioksidacijskog kapaciteta te s ranijim istraživanjima koja su pokazala kardioprotektivne učinke SGLT2 inhibitora (152,159,160). Brži oporavak DNA u ispitivanoj skupini dodatno podupire hipotezu da empagliflozin može imati zaštitne učinke u kontekstu oksidacijskog stresa izazvanog invazivnim kardiološkim postupcima.

6.5. Utjecaj empagliflozina na N-glikozilaciju imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme nakon koronarne angiografije

U ovoj analizi ispitivan je utjecaj jedne doze od 10 mg empagliflozina na glikanske profile imunoglobulina G (IgG_B, IgG_CF, IgG_G0, IgG_G1, IgG_2 i IgG_S) 24 sata nakon koronarne angiografije. Premda rezultati nisu pokazali statistički značajan rezultat nakon korekcije za višestruka testiranja, opaženi su određeni trendovi koji upućuju na potencijalni učinak intervencije. Najizraženiji trend je smanjenje sržne fukoze blizu granice značajnosti prije korekcije (CF: Efekt= -0,026; p= 0,06124; p_pril.= 0,81575) te može upućivati na specifičan učinak empagliflozina na ovo glikansko svojstvo. Sržna fukoza na N-glikanima imunoglobulina G ima ključnu ulogu u regulaciji protuupalnih svojstava imunoglobulina G, posebno putem smanjenja afiniteta za Fc γ receptore. Smanjenje sržne fukoze može pojačati staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (engl. *Antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) što je posebno korisno u odgovorima na patološke antigene i u kontekstu upale (161,162). Trend smanjenja agalaktoziliranih glikana imunoglobulina G (G0: Efekt= -0,017; p= 0,27118; p_pril.= 0,81575) doprinosi smanjenju upale nakon koronarne angiografije. Agalaktozilirani glikani povezani su s povećanom proupalnom aktivnošću, jer potiču vezanje za Fc γ receptore i aktivaciju komplementa (98). Povećanje agalaktoziliranih glikana povezano je s upalnim bolestima poput reumatoidnog artritisa i kardiovaskularnim bolestima (97). Smanjenje agalaktoziliranih glikana može ukazivati na smanjenje upalnog odgovora i potencijalni mehanizam djelovanja empagliflozina. Zatim slijedi trend porasta račvajućeg N-acetilglukozamina (B: Efekt= 0,022; p= 0,11963; p_pril.= 0,81575). Račvajući N-acetilglukozamin je struktura koja modulira funkciju imunoglobulina G i povezana je s proupalnim svojstvima (163). Monogalaktozilirani glikani predstavljaju prijelaznu fazu između agalaktoziliranih i digalaktoziliranih glikana te njihov porast (G2: Efekt= 0,016; p= 0,21015; p_pril.= 0,81575) može ukazivati na postupnu regulaciju glikozilacije prema protuupalnom profilu. Promjene u galaktozilaciji glikana često su povezane s adaptacijskim odgovorom na oksidacijski stres i upalu (97). Opaženi trendovi sugeriraju imunomodulacijski učinak empagliflozina. Iako promjene nisu statistički značajne, biološka značajnost ovih trendova ukazuje na potencijalno zaštitnu ulogu empagliflozina u regulaciji upalnih odgovora nakon koronarne angiografije.

Glikozilacija ukupnih proteina plazme važan je biološki proces koji modulira njihovu funkcionalnost, stabilnost i interakcije s receptorima. Ispitali smo utjecaj jedne doze od 10 mg empagliflozina na glikanske profile ukupnih proteina plazme (B, CF, G0, G1, G2, G3, G4,

HB, HM, LB, S0, S1, S2, S3, S4 i AF). Premda rezultati nisu statistički značajni nakon korekcije s višestrukim testiranjem, opaženi trendovi pružaju uvide u potencijalne biološke učinke empagliflozina na N-glikozilaciju. Visoko-razgranati glikani pokazuju trend blagog smanjenja (Hb: Efekt= -0,007; $p = 0,18506$; $p_{\text{pril.}} = 0,81575$) što može ukazivati na protuupalnu funkciju, jer višestruka grananja su povezana s progresijom tumora i metastaza preko modulacije transmembranskih proteina kao što su E-kadherin i integrina (164,165). Nadalje, obrnuti je učinak računajućeg N-acetilglukozamina koji su u ovom istraživanju pokazali trend blagog porasta (B: Efekt= 0,003, $p = 0,63470$, $p_{\text{pril.}} = 0,86695$) što je protuupalna modulacija (166). Trendovi koji su opaženi u galaktozilaciji N-glikana ukupnih proteina pokazuju blagi porast proupalnih agalaktoziliranih glikana (G0: Efekt= 0,007, $p = 0,39911$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$) što može biti odgovor na akutni stres zbog invazivne procedure. Slijedi porast monogalaktoziliranih glikana (G1: Efekt= 0,009, $p = 0,39788$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$) i smanjenje višestruko galaktoziliranih glikana (G2: Efekt= -0,005, $p = 0,64749$, $p_{\text{pril.}} = 0,86695$; G3: Efekt= -0,007, $p = 0,14190$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$; G4: Efekt= -0,001, $p = 0,95639$, $p_{\text{pril.}} = 0,99738$). Navedene promjene sugeriraju prijelaznu imunološku aktivaciju uslijed intervencije empagliflozinom, a slični trendovi su opaženi u upalnim i metaboličkim bolestima, uključujući šećernu bolest, ateroskleroza i sustavne upalne bolesti (167,168). Opažene promjene u trendu sijalinizacije N-glikana plazmatskih proteina uključuju porast asijaliniziranih (S0: Efekt= 0,010, $p = 0,35418$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$), smanjenje višestruko sijaliniziranih glikana (S1: Efekt= -0,002, $p = 0,66712$, $p_{\text{pril.}} = 0,86933$; S2: Efekt= -0,007, $p = 0,59213$, $p_{\text{pril.}} = 0,86451$; S3: Efekt= -0,005, $p = 0,27666$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$) od kojih na tetrasijalinizirane glikane nije bilo utjecaja (S4: Efekt= 0,000, $p = 0,99757$, $p_{\text{pril.}} = 0,99757$). Asijalinizirani glikani imaju veću imunogenost i mogu biti lakše prepoznati od strane stanica imunskog sustava te su takve promjene opisane kod bolesnika s nižim rizikom progresije metastaza (169). Višestruka sijalinizacija omogućava tumorskim stanicama da izbjegnu imunološko prepoznavanje moduliranjem adhezijskih interakcija između tumorskih stanica i endotela, čime olakšava invaziju i metastaziranje (84,165,170). Nadalje je vidljiv trend blagog porasta sržne fukoze (CF: Efekt=0,004, $p = 0,62670$, $p_{\text{pril.}} = 0,86695$) i antenarne fukoze (AF: Efekt= 0,006, $p = 0,26605$, $p_{\text{pril.}} = 0,81575$) ukupnih proteina plazme. Sržna fukoza modulira stabilnost i funkcionalnost proteina zbog čega ima važnu ulogu imunološkom odgovoru (171). Povećana ekspresija sržne fukoze povezuje se sa upalnim bolestima, tumorima i metaboličkim poremećajima (172). Fukozilacija E-kadherina potiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju koja je važna za tumorsku invaziju, dok fukozilacija integrina može povećati staničnu migraciju i interakcije s izvanstaničnim matriksom što je važno za metastaziranje tumora (173). Promjene u antenarnoj

fukozilaciji moduliraju imunološki odgovor te se mogu koristiti kao biomarkeri u dijagnostici i praćenju bolesti, posebno u autoimunim bolestima i onkologiji (174). Oligomanozni N-glikani ukupnih proteina plazme su nezrele glikanske strukture i pokazuju trend blagog porasta (HM: Efekt= 0,002, p= 0,77639, p_pril.= 0,92913) što može upućivati na poremećenu daljnu obradu glikana u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu. Takve promjene su prisutne u uvjetima povećanog metaboličkog stresa i upale (167). Nisko razgranati N-glikani ukupnih proteina plazme su u blagom porastu (Efekt= 0,005, p= 0,31348, p_pril.= 0,81575). Njihovo povećanje može značiti smanjenu aktivnost N-acetilglukozamintrasferaze u Golgijeveom aparatu što se viđa u upalnim i metaboličkim bolestima (175). Opaženi trendovi u N-glikozilaciji ukupnih proteina plazme ukazuju na metaboličke i imunološke prilagodbe, koje mogu odražavati upalne procese i potencijalne promjene u staničnoj signalizaciji.

6.6. Utjecaj kliničkih i laboratorijskih pokazatelja na ukupni antioksidacijski kapacitet

Trendovi koji su opaženi u analizi utjecaja pojedinih kliničkih i laboratorijskih pokazatelja na ukupni antioksidacijski kapacitet mogu ukazivati na potencijalni biološki značaj. Porast trenda ukupnog antioksidacijskog kapaciteta kod bolesnika s preboljelim infarktom miokarda i perkutanom koronarnom intervencijom u anamnezi bi moglo sugerirati metaboličku prilagodbu na oksidacijski stres, što je u skladu s prethodnim istraživanjima koja sugeriraju da kardiovaskularni pacijenti mogu razviti kompenzacijske mehanizme u antioksidacijskom sustavu (176). Negativan trend konzumacije alkohola upućuje na smanjeni antioksidacijski kapacitet kod konzumenata alkohola kao posljedicu alkoholom induciranog oksidacijskog stresa (177). Nadalje, negativan utjecaj menopauze na ukupni antioksidacijski kapacitet sugerira da hormonske promjene koje nastaju ulaskom u menopauzu dovode do narušavanja mehanizama redoks homeostaze. Estrogeni imaju poznatu zaštitnu ulogu u regulaciji antioksidacijskog odgovora, a njihov pad može rezultirati povećanom osjetljivošću na oksidacijski stres (178). Publicirana literatura sugerira kontroverzan učinak vitamina D na antioksidacijska svojstva, a u ovom istraživanju vitamin D je pokazao blago negativan trend u odnosu na ukupni antioksidacijski kapacitet. Iako su neka istraživanja pokazala da vitamin D može djelovati kao antioksidans, drugi radovi sugeriraju da visoke koncentracije mogu potaknuti oksidacijski stres u određenim metaboličkim stanjima (179).

6.7. Utjecaj proceduralnih karakteristika na oštećenje DNA, bubrežnu funkciju, N-glikozilaciju imunoglobulina G i ukupni antioksidacijski kapacitet

Promatrane karakteristike procedure koje uključuju dozu zračenja (DAP), vrijeme zračenja i volumen kontrastnog medija (CM) su dosljedno pokazale pozitivan trend oštećenja DNA, najizraženije u duljini repa (TL) kometa i zatim inteziteta repa (TI) kometa. Ovaj trend sugerira da veće izlaganje ionizirajućem zračenju može pridonijeti fragmentaciji DNA, što je ranije potvrđeno u studijama o utjecaju medicinskog zračenja na oksidacijski stres (47,180). Unatoč tome, doza zračenja (DAP), vrijeme zračenja (FT) i volumen kontrastnog medija (CM) su u ovom istraživanju bile manje u odnosu na ranije publicirane podatke za koronarnu angiografiju, što može objasniti odsutnost statistički značajnih razlika. Nadalje, sve tri karakteristike procedure su ukazale na blago pozitivan trend s kreatininom, što može sugerirati oksidacijsko oštećenje bubrega ili hemodinamskih promjena izazvanih kontrastnim sredstvom, jer je pokazano da više doze zračenja mogu izazvati stres i upalu u bubrežnom tkivu što doprinosi razvoju kontrastom inducirane nefropatije (181). N-glikozilacija imunoglobulina G u odnosu na karakteristike procedure je pokazala je blage trendove smanjenja galaktozilacije, što je proupalno te porasta sijalizacije koja je protupalna promjena, što može sugerirati imunološku adaptaciju, ali bez jasnog uzorka povezanosti sa zračenjem ili kontrastom (167). Porast trenda ukupnog antioksidacijskog kapaciteta opažen je za sve tri karakteristike procedure, najizrazitije za volumen kontrastnog medija, što su također utvrdili Tungjai i suradnici u svom istraživanju (182). Ova analiza sugerira potencijalne učinke ionizirajućeg zračenja i kontrastnog sredstva na oksidacijsko oštećenje DNA, antioksidacijski kapacitet i N-glikozilaciju IgG, iako nijedan rezultat nije dosegao statističku značajnost. Najizraženiji trendovi odnose se na povezanost doze zračenja (DAP) i vremena zračenja (FT) s oksidacijskim oštećenjem DNA te mogući adaptivni antioksidacijski odgovor na primjenu kontrasta. Nema jasnih dokaza o promjenama u bubrežnoj funkciji ili imunološkom odgovoru putem glikozilacije IgG. Daljnja istraživanja s većim uzorcima i dugoročnim praćenjem potrebna su kako bi se potvrdili i bolje razumjeli ovi potencijalni učinci.

6.8. Hipotetski mehanizam protuupalnog i citoprotektivnog učinka empagliflozina

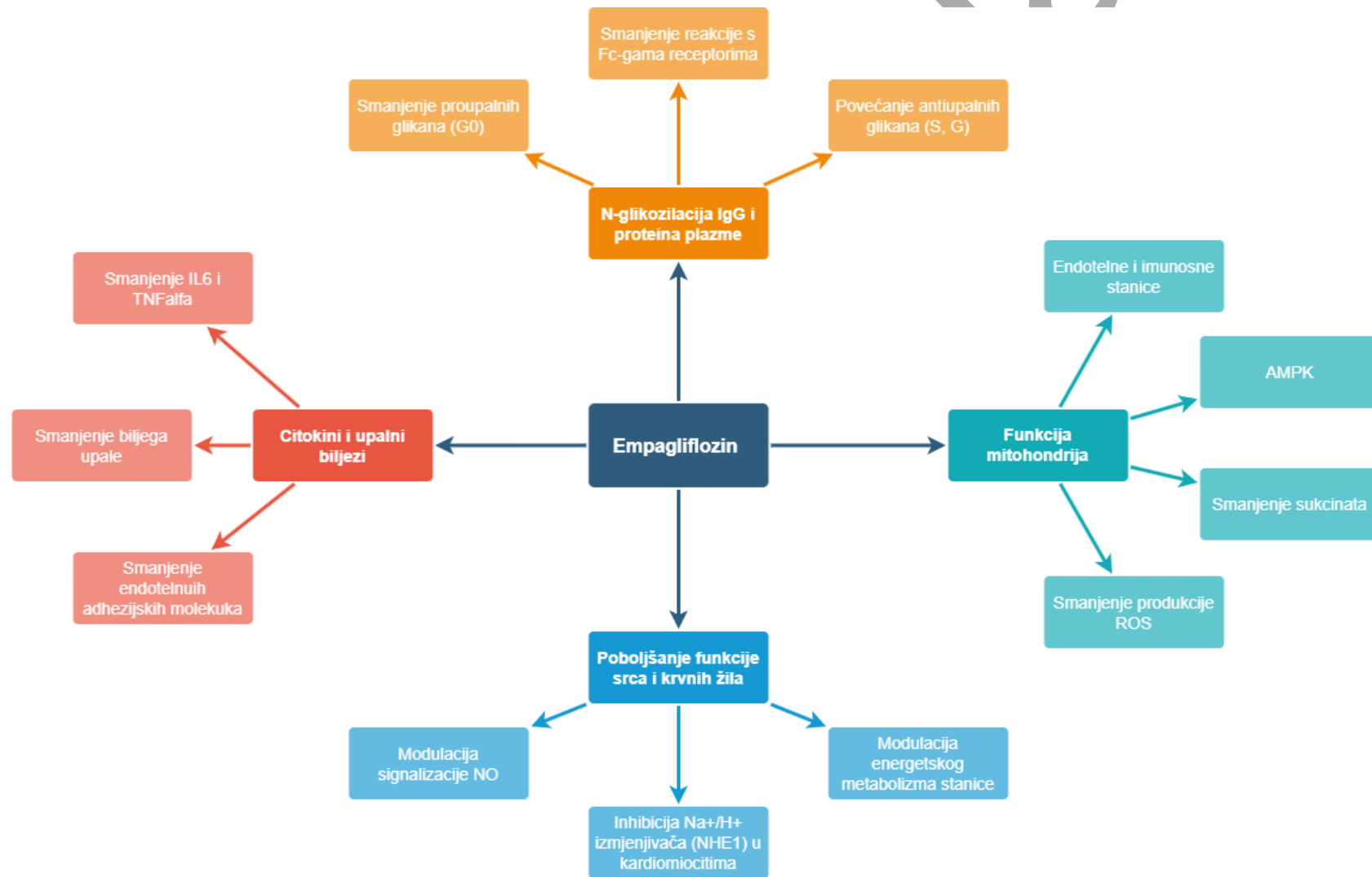
Empagliflozin smanjuje oksidacijski stres induciran invazivnim procedurama poput koronarne angiografije mehanizmima koji uključuju: smanjenje proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta

(ROS) inhibicijom mitohondrijske disfunkcije u endotelnim stanicama i stanicama imunskog sustava i poboljšanjem funkcije mitohondrija moduliranjem AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) i smanjenjem razine sukcinata, što je ključno za stvaranje ROS (183–185). Istraživanje koje su proveli Bayes-Genis i sur. je otkrilo da empagliflozin djeluje putem inhibicije Na^+/H^+ izmjenjivača 1 (NHE1) u kardiomiocitima, što dovodi do smanjenja oksidacijskog stresa i poboljšanja funkcije srca (186).

Modulacija upalnih putova N-glikozilacije proteina: Empagliflozin mijenja glikozilacijski profil imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme, smanjujući proupalne glikane poput agalaktoziranih glikana i povećavajući protuupalne glikane poput sijaliniziranih i galaktoziliranih glikana (187). To rezultira smanjenjem interakcija s Fc γ receptorima na imunološkim stanicama, što ublažava upalni odgovor. Istraživanje koje su proveli Plavša i sur. ukazuje na promjene u N-glikozilaciji imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme kod bolesnika s fibrilacijom atrijske prevlake što može imati utjecaj na upalne procese i funkciju imunološkog sustava (149,188). Citokinski profil se nakon primjene empagliflozina mijenja na način da se smanjuje ekspresija upalnih citokina poput IL-6 i TNF- α , djelomično preko inhibicije nuklearnog faktora κB (NF- κB), čime se ograničava sustavni i lokalni upalni odgovor (189,190). Zhang i sur. u svom recentnom preglednom članku ukazuju na mehanizme anti-upalnog djelovanja SGLT2 inhibitora smanjenjem otpuštanja biljega upale i ekspresije endotelnih adhezijskih molekula (191).

Primjena SGLT2 inhibitora povezana je sa smanjenjem endotelne disfunkcije poboljšanjem signalizacije dušikovog oksida, što doprinosi vazodilataciji i smanjenju upalnog oštećenja krvnih žila (185,192,193). Povećanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta smanjuje oštećenje DNA izazvano oksidacijskim stresom tijekom angiografskih postupaka.

Empagliflozin modulira energetske procese stanice poticanjem ketogeneze i održavanjem glukoze homeostaze čime se stvaraju metabolički uvjeti u kojima ketonska tijela, kao što je beta-hidroksibutirat, smanjuju upalne signale i povećavaju energetske učinkovitost stanica (194,195). Na taj način se smanjuje energetska ovisnost o glukozu, što dodatno modulira anti-upalne metaboličke putove. Dijagram na slici 14 prikazuje hipotetski mehanizam protuupalnog i citoprotektivnog učinka empagliflozina.



Slika 14. Hipotetski mehanizam protuupalnog i citooprotektivnog učinka empagliflozina. AMPK: AMP-aktivirana protein kinaza; ROS: reaktivne kisikove vrste; IL6: interleukin 6; TNF alfa: tumor nekrotizirajući faktor alfa; G0: agalktozilirani glikani; S: sijalinizirani glikani; G: galaktozilirani glikani; NO: dušikov oksid. Nacrtno pomoću alata draw.io.

6.9. Ograničenja istraživanja

Iako ovo istraživanje pruža nove spoznaje o učinku empagliflozina na oksidacijski stres tijekom invazivne angiografske procedure, određena metodološka i tehnička ograničenja mogla su utjecati na interpretaciju rezultata i njihovu primjenjivost u kliničkoj praksi.

Prvo i ključno ograničenje je relativno mali broj ispitanika, što smanjuje statističku snagu analize i mogućnost generalizacije rezultata na širu populaciju. Ovo istraživanje je prvo takve vrste provedeno s ciljem ispitivanja učinka jedne doze empagliflozina na oksidacijski stres tijekom invazivne procedure, a veličina uzorka određena je na temelju prethodnih istraživanja na animalnim modelima i farmakokinetičkih studija na zdravim osobama. Premda su dobiveni rezultati vrijedni, veći uzorak ispitanika mogao bi poboljšati robusnost podataka, omogućiti detekciju suptilnijih razlika među skupinama i pružiti pouzdanije zaključke o kliničkom učinku empagliflozina.

Jedno od ograničenja studije je isključenje bolesnika sa šećernom bolesti, iako je upravo ova populacija poznata po značajno narušenoj redoks homeostazi i kroničnom proupalnom stanju. S obzirom na veći oksidacijski stres i metaboličku disregulaciju kod dijabetičara, očekuje se da bi empagliflozin mogao imati još izraženiji antioksidacijski i citoprotektivni učinak u ovoj skupini. Buduća istraživanja trebala bi uključiti bolesnike s dijabetesom kako bi se procijenila potencijalna dodatna korist primjene empagliflozina u prevenciji oksidacijskog oštećenja povezanog s angiografijom.

U ovom istraživanju empagliflozin je primijenjen u jednoj dozi prije koronarne angiografije, što ograničava njegov potencijalni učinak na oksidacijski stres i upalne odgovore. Poznato je da se antioksidacijski, protuupalni i citoprotektivni učinci SGLT2 inhibitora razvijaju postupno kroz dulji vremenski period. Stoga bi studije koje uključuju vremenski dulju primjenu empagliflozina (npr. nekoliko dana do tjedana prije angiografije) mogle pokazati izraženiji i dugotrajniji učinak na oksidacijski stres, upalu i bubrežnu funkciju.

Za procjenu razine oksidacijskog stresa u istraživanju je bilo planirano određivanje ukupnog oksidacijskog kapaciteta, no rezultati mjerenja nisu bili interpretabilni za daljnju analizu. Direktno mjerenje endogenog H_2O_2 u biološkim uzorcima predstavlja tehnički izazov zbog kratkog poluživota i visoke reaktivnosti H_2O_2 , što dovodi do njegove brze razgradnje u prisutnosti katalaze i drugih redoks enzima, rezultirajući varijabilnim i nepouzdanim vrijednostima. Otežavajuća okolnost je i moguća interferencija s lijekovima koje su ispitanici uzimali u kroničnoj terapiji, kao i lijekovima primijenjenima tijekom same procedure (npr. heparin, nitroglicerol, kontrastno sredstvo). Također, utjecaj endogenih biomolekula (proteina,

lipida, malih metabolita) na reakciju H_2O_2 s peroksidazom, što može dovesti do artefaktnih rezultata i dodatno otežati interpretaciju ukupnog oksidacijskog kapaciteta uzoraka. U budućnosti bi trebalo razmotriti alternativne metode mjerenja razine oksidacijskog stresa, poput oksidiranih proteina i produkata lipidne peroksidacije, koji su stabilniji i manje podložni interferencijama.

Još jedno ograničenje istraživanja je izostanak uzorkovanja i mjerenja nakon 24 sata iza koronarne angiografije. Poznato je da oksidacijski stres i upalne reakcije mogu imati kasniji vrhunac, pa bi dodatna mjerenja u kasnoj fazi odgovora mogla razotkriti dugotrajne učinke empagliflozina, kao i potencijalne razlike između skupina koje nisu bile vidljive u neposrednom postproceduralnom periodu. Dugoročniji praćenje biomarkera oksidacijskog stresa, upalnih markera i bubrežne funkcije moglo bi pružiti precizniji uvid u zaštitni učinak empagliflozina, osobito u kontekstu prevencije kontrastom inducirane nefropatije (CIN). Iako je ovo istraživanje pružilo važne inicijalne podatke o učinku empagliflozina na oksidacijski stres tijekom koronarne angiografije, navedena ograničenja upućuju na potrebu za budućim studijama s većim brojem ispitanika, uključivanjem dijabetičara, kroničnom primjenom empagliflozina te poboljšanim metodama mjerenja oksidacijskog stresa i dugotrajnijim praćenjem bolesnika. Takav pristup omogućio bi potpuniju procjenu potencijalne protektivne uloge empagliflozina u ovom kliničkom kontekstu.

7. ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja sugeriraju da empagliflozin, inhibitor natrij-glukoznog kotransportera 2 (SGLT2i) smanjuje oksidacijsko oštećenje i upalne odgovore kod bolesnika koji se podvrgavaju koronarnoj angiografiji što proizlazi iz sljedećih zaključaka:

1.

Opažen je porast antioksidacijskog kapaciteta u ispitivanoj skupini, što može doprinijeti smanjenju oksidacijskog stresa i oštećenja tkiva.

2.

Ispitivana skupina pokazala je značajno manje oksidacijskog oštećenja DNA, što je potvrđeno alkalnim komet testom kroz značajno niže vrijednosti intenziteta repa i duljine repa kometa.

3.

Promjene u profilu N-glikozilacije imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme, kao i smanjenje porasta hs-CRP, sugeriraju da empagliflozin može modulirati upalne odgovore i potencijalno smanjiti sustavnu upalu nakon koronarne angiografije.

4.

Parametri bubrežne funkcije prije i nakon koronarne angiografije pratili su očekivane hemodinamske učinke empagliflozina, ukazujući na njegov potencijal u smanjenju bubrežnog stresa povezanog s invazivnim kardiološkim postupcima.

8. LITERATURA

1. Ryan TJ. The Coronary Angiogram and Its Seminal Contributions to Cardiovascular Medicine Over Five Decades. *Circulation*. 2002 Aug 6;106(6):752–6.
2. Seldinger SI. Catheter Replacement of the Needle in Percutaneous Arteriography: A new technique. *Acta Radiol*. 1953 May 1;39(5):368–76.
3. Judkins MP. Selective Coronary Arteriography: Part I: A Percutaneous Transfemoral Technic. *Radiology*. 1967 Nov;89(5):815–24.
4. Amplatz K, Formanek G, Stanger P, Wilson W. Mechanics of Selective Coronary Artery Catheterization via Femoral Approach. *Radiology*. 1967 Dec;89(6):1040–7.
5. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization | European Heart Journal | Oxford Academic [Internet]. [cited 2024 Jul 20]. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/40/2/87/5079120?login=false>
6. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes: Developed by the task force on the management of acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2023 Oct 7;44(38):3720–826.
7. Manda YR, Baradhi KM. Cardiac Catheterization Risks and Complications. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Jul 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531461/>
8. Hasnie AA, Parcha V, Leung S. Major complications suffered during diagnostic coronary angiogram 2013-2023. *J Am Coll Cardiol*. 2024 Apr 2;83(13_Supplement):808–808.
9. Vlastra W, Delewi R, Rohling WJ, Wagenaar TC, Hirsch A, Meesterman MG, et al. Premedication to reduce anxiety in patients undergoing coronary angiography and percutaneous coronary intervention. *Open Heart*. 2018 Sep 1;5(2):e000833.
10. Sara JDS, Ahmad A, Toya T, Suarez Pardo L, Lerman LO, Lerman A. Anxiety Disorders Are Associated With Coronary Endothelial Dysfunction in Women With Chest Pain and Nonobstructive Coronary Artery Disease. *J Am Heart Assoc*. 2021 Sep 7;10(17):e021722.
11. Koudouovoh-Tripp P, Hüfner K, Egeter J, Kandler C, Giesinger JM, Sopper S, et al. Stress Enhances Proinflammatory Platelet Activity: the Impact of Acute and Chronic Mental Stress. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2021;16(2):500–12.
12. Egloff B, Wilhelm FH, Neubauer DH, Mauss IB, Gross JJ. Implicit anxiety measure predicts cardiovascular reactivity to an evaluated speaking task. *Emotion*. 2002;2(1):3–11.
13. Uzun S, Vural H, Uzun M, Yokusoglu M. State and trait anxiety levels before coronary angiography. *J Clin Nurs*. 2008 Mar;17(5):602–7.

14. Delewi R, Vlastra W, Rohling WJ, Wagenaar TC, Zwemstra M, Meesterman MG, et al. Anxiety levels of patients undergoing coronary procedures in the catheterization laboratory. *Int J Cardiol.* 2017 Feb 1;228:926–30.
15. De Jong-Watt WJ, Arthur HM. Anxiety and health-related quality of life in patients awaiting elective coronary angiography. *Heart Lung.* 2004 Jul;33(4):237–48.
16. Shibeshi WA, Young -Xu Yinong, Blatt CM. Anxiety Worsens Prognosis in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007 May 22;49(20):2021–7.
17. DiMatteo MR, Lepper HS, Croghan TW. Depression Is a Risk Factor for Noncompliance With Medical Treatment: Meta-analysis of the Effects of Anxiety and Depression on Patient Adherence. *Arch Intern Med.* 2000 Jul 24;160(14):2101–7.
18. Keshvari M, Yeganeh MR, Paryad E, Roushan ZA, Pouralizadeh M. The effect of virtual reality distraction on reducing patients' anxiety before coronary angiography: a randomized clinical trial study. *Egypt Heart J.* 2021 Nov 4;73:98.
19. Jolly SS, Yusuf S, Cairns J, Niemelä K, Xavier D, Widimsky P, et al. Radial versus femoral access for coronary angiography and intervention in patients with acute coronary syndromes (RIVAL): a randomised, parallel group, multicentre trial. *The Lancet.* 2011 Apr;377(9775):1409–20.
20. Riangwiwat T, Blankenship JC. Vascular Complications of Transradial Access for Cardiac Catheterization. 2020 Dec 16 [cited 2024 Jul 22]; Available from: <https://www.uscjournal.com/articles/vascular-complications-transradial-access-cardiac-catheterization>
21. Hashmi KA, Iqbal Z, Hashmi AA, Shoaib M, Irfan M, Khan R, et al. The frequency of radial artery occlusion following cardiac catheterization with the use of transradial pneumatic compression band. *BMC Res Notes.* 2020 Oct 20;13:486.
22. Tavakol M, Ashraf S, Brener SJ. Risks and Complications of Coronary Angiography: A Comprehensive Review. *Glob J Health Sci.* 2011 Dec 29;4(1):p65.
23. Green DJ, Hopman MTE, Padilla J, Laughlin MH, Thijssen DHJ. Vascular Adaptation to Exercise in Humans: Role of Hemodynamic Stimuli. *Physiol Rev.* 2017 Apr;97(2):495–528.
24. Dawson EA, Alkarmi A, Thijssen DHJ, Rathore S, Marsman DE, Cable NT, et al. Low-Flow Mediated Constriction is Endothelium-Dependent: Effects of Exercise Training After Radial Artery Catheterization. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012 Oct;5(5):713–9.
25. Tryfonos A, Green DJ, Dawson EA. Effects of Catheterization on Artery Function and Health: When Should Patients Start Exercising Following Their Coronary Intervention? *Sports Med Auckl NZ.* 2019 Mar;49(3):397–416.
26. Mamoulakis C, Tsarouhas K, Fragkiadoulaki I, Heretis I, Wilks MF, Spandidos DA, et al. Contrast-induced nephropathy: Basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies. *Pharmacol Ther.* 2017 Dec 1;180:99–112.
27. Solomon R. Contrast Media: Are There Differences in Nephrotoxicity among Contrast Media? *BioMed Res Int.* 2014;2014(1):934947.

28. Do C. Intravenous Contrast: Friend or Foe? A Review on Contrast-Induced Nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2017 May;24(3):147–9.
29. Loh S, Bagheri S, Katzberg RW, Fung MA, Li CS. Delayed adverse reaction to contrast-enhanced CT: a prospective single-center study comparison to control group without enhancement. *Radiology*. 2010 Jun;255(3):764–71.
30. van der Molen AJ, Thomsen HS, Morcos SK, Members of Contrast Media Safety Committee of European Society of Urogenital Radiology (ESUR). Effect of iodinated contrast media on thyroid function in adults. *Eur Radiol*. 2004 May 1;14(5):902–7.
31. Mehran R, Nikolsky E. Contrast-induced nephropathy: Definition, epidemiology, and patients at risk. *Kidney Int*. 2006 Apr 1;69:S11–5.
32. Ramachandran P, Jayakumar D. Contrast-induced Acute Kidney Injury. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med*. 2020 Apr;24(Suppl 3):S122–5.
33. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2183–94.
34. Kusirisin P, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Contrast-induced nephropathy and oxidative stress: mechanistic insights for better interventional approaches. *J Transl Med*. 2020 Oct 20;18:400.
35. Li Y, Wang J. Contrast-induced acute kidney injury: a review of definition, pathogenesis, risk factors, prevention and treatment. *BMC Nephrol*. 2024 Apr 22;25(1):140.
36. Lameire NH, Levin A, Kellum JA, Cheung M, Jadoul M, Winkelmayr WC, et al. Harmonizing acute and chronic kidney disease definition and classification: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int*. 2021 Sep;100(3):516–26.
37. Jo SH, Youn TJ, Koo BK, Park JS, Kang HJ, Cho YS, et al. Renal Toxicity Evaluation and Comparison Between Visipaque (Iodixanol) and Hexabrix (Ioxaglate) in Patients With Renal Insufficiency Undergoing Coronary Angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Sep;48(5):924–30.
38. Lohani S, Rudnick MR. Contrast Media—Different Types of Contrast Media, Their History, Chemical Properties, and Relative Nephrotoxicity. *Interv Cardiol Clin*. 2020 Jul;9(3):279–92.
39. Correction to: 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes: Developed by the task force on the management of acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2024 May 28;13(5):455–455.
40. Bolognese L, Falsini G, Schwenke C, Grotti S, Limbruno U, Liistro F, et al. Impact of iso-osmolar versus low-osmolar contrast agents on contrast-induced nephropathy and tissue reperfusion in unselected patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention (from the Contrast Media and

Nephrotoxicity Following Primary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction [CONTRAST-AMI] Trial). *Am J Cardiol.* 2012 Jan 1;109(1):67–74.

41. Chen Z, Mao Q, Xiang L, Zhou D, Jiang Y, Zhao N, et al. Iodixanol-associated acute kidney injury and prognosis in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention: a prospective, multi-center study. *Eur Radiol.* 2023 Dec;33(12):9444–54.
42. Azzalini L, Vilca LM, Lombardo F, Poletti E, Laricchia A, Beneduce A, et al. Incidence of contrast-induced acute kidney injury in a large cohort of all-comers undergoing percutaneous coronary intervention: Comparison of five contrast media. *Int J Cardiol.* 2018 Dec 15;273:69–73.
43. Chen Z, Zhao N, Zhang Y, Zhao R, Zhao X. Dosing of iodixanol for predicting acute kidney injury in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Eur J Intern Med.* 2023 Dec 1;118:136–8.
44. Mehran R, Dangas GD, Weisbord SD. Contrast-Associated Acute Kidney Injury. *N Engl J Med.* 2019 May 30;380(22):2146–55.
45. Bangalore S, Briguori C. Preventive Strategies for Contrast-Induced Acute Kidney Injury: And the Winner Is.... *Circ Cardiovasc Interv.* 2017 May;10(5):e005262.
46. Ribichini F, Graziani M, Gambaro G, Pasoli P, Pighi M, Pesarini G, et al. Early creatinine shifts predict contrast-induced nephropathy and persistent renal damage after angiography. *Am J Med.* 2010 Aug;123(8):755–63.
47. Hwang J, Lee SY, Chon MK, Lee SH, Hwang KW, Kim JS, et al. Radiation Exposure in Coronary Angiography: A Comparison of Cineangiography and Fluorography. *Korean Circ J.* 2015 Nov;45(6):451–6.
48. Jiao Y, Cao F, Liu H. Radiation-induced Cell Death and Its Mechanisms. *Health Phys.* 2022 Nov;123(5):376–86.
49. Nuskiewicz J, Woźniak A, Szewczyk-Golec K. Ionizing Radiation as a Source of Oxidative Stress—The Protective Role of Melatonin and Vitamin D. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 13;21(16):5804.
50. Jailliet C, Morelle W, Slomianny MC, Paget V, Tarlet G, Buard V, et al. Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences. *Sci Rep.* 2017 Jul 13;7(1):5290.
51. Perez-Gelvez YNC, Unger S, Kurz S, Rosenbalm K, Wright WM, Rhodes Jr. OE, et al. Chronic exposure to low doses of ionizing radiation impacts the processing of glycoprotein N-linked glycans in Medaka (*Oryzias latipes*). *Int J Radiat Biol.* 2021 Mar 4;97(3):401–20.
52. Cousins C, Miller DL, Bernardi G, Rehani MM, Schofield P, Vañó E, et al. ICRP PUBLICATION 120: Radiological protection in cardiology. *Ann ICRP.* 2013 Feb;42(1):1–125.
53. Sun Z, AbAziz A, Khairuddin Md Yusof A. Radiation-Induced Noncancer Risks in Interventional Cardiology: Optimisation of Procedures and Staff and Patient Dose Reduction. *BioMed Res Int.* 2013;2013:976962.

54. Zielinski JM, Ashmore PJ, Band PR, Jiang H, Shilnikova NS, Tait VK, et al. Low dose ionizing radiation exposure and cardiovascular disease mortality: cohort study based on Canadian national dose registry of radiation workers. *Int J Occup Med Environ Health*. 2009;22(1):27–33.
55. Little MP, Azizova TV, Richardson DB, Tapio S, Bernier MO, Kreuzer M, et al. Ionising radiation and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *The BMJ*. 2023 Mar 8;380:e072924.
56. Kataria V, Yaduvanshi I, Singal G, Nair M. Establishing a diagnostic reference level of radiation dose in coronary angiography and intervention: A prospective evaluation. *Indian Heart J*. 2021 Nov 1;73(6):725–8.
57. Mensah GA. Healthy endothelium: The scientific basis for cardiovascular health promotion and chronic disease prevention. *Vascul Pharmacol*. 2007 May 1;46(5):310–4.
58. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2007 May;292(5):H2023–31.
59. Hu Z, Cano I, D'Amore PA. Update on the Role of the Endothelial Glycocalyx in Angiogenesis and Vascular Inflammation. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Aug 31;9:734276.
60. Kibel A, Lukinac AM, Dambic V, Juric I, Selthofer-Relatic K. Oxidative Stress in Ischemic Heart Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:6627144.
61. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jul;21(7):363–83.
62. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017 Feb 17;120(4):713–35.
63. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018 Jan 1;100:1–19.
64. Hazuková R, Řezáčová M, Köhlerová R, Tomek T, Čermáková E, Kočí J, et al. Comet assay in evaluating deoxyribonucleic acid damage after out-of-hospital cardiac arrest. *Anatol J Cardiol*. 2017 Jul;18(1):31–8.
65. Gunata M, Parlakpınar H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment. *Cell Biochem Funct*. 2021 Mar;39(2):190–217.
66. Vukajlovic JT, Simic I, Milosevic-Djordjevic O. DNA and chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes in patients with acute coronary syndrome undergoing a coronary angiography. *Anatol J Cardiol*. 2021 Apr;25(4):243–9.
67. Rodrigo R, Prieto JC, Aguayo R, Ramos C, Puentes Á, Gajardo A, et al. Joint Cardioprotective Effect of Vitamin C and Other Antioxidants against Reperfusion Injury in Patients with Acute Myocardial Infarction Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Molecules*. 2021 Sep 21;26(18):5702.

68. Szewczyk-Golec K, Grzelakowski P, Ługowski T, Kędziora J. The effects of percutaneous transluminal coronary intervention on biomarkers of oxidative stress in the erythrocytes of elderly male patients. *Redox Rep Commun Free Radic Res*. 2017 Nov;22(6):315–22.
69. Zhang S, Gan L, Cao F, Wang H, Gong P, Ma C, et al. The barrier and interface mechanisms of the brain barrier, and brain drug delivery. *Brain Res Bull*. 2022 Nov 1;190:69–83.
70. Danielli JF. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol*. 1940 Mar 14;98(1):109–29.
71. Chambers R, Zweifach BW. Intercellular cement and capillary permeability. *Physiol Rev*. 1947 Jul;27(3):436–63.
72. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc*. 1966;25(6):1773–83.
73. Machin DR, Phuong TT, Donato AJ. The role of the endothelial glycocalyx in advanced age and cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2019 Apr 1;45:66–71.
74. Vogel J, Sperandio M, Pries AR, Linderkamp O, Gaehtgens P, Kuschinsky W. Influence of the Endothelial Glycocalyx on Cerebral Blood Flow in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000 Nov 1;20(11):1571–8.
75. Vita SM, Smith AM, Ray TJ, Grayson BE. Chapter 11 - Blood–brain barrier damage following mild traumatic brain injury. In: Martin CR, Patel VB, Preedy VR, editors. *Handbook of Animal Models in Neurological Disorders* [Internet]. Academic Press; 2023 [cited 2024 Aug 16]. p. 133–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323898331000410>
76. Purcell SC, Godula K. Synthetic glycoscapes: addressing the structural and functional complexity of the glycocalyx. *Interface Focus*. 2019 Feb 15;9(2):20180080.
77. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007 Aug 15;9(1):121–67.
78. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 2000 Sep;440(5):653–66.
79. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 2007 Jun 1;454(3):345–59.
80. Flynn RA, Pedram K, Malaker SA, Batista PJ, Smith BAH, Johnson AG, et al. Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell*. 2021 Jun 10;184(12):3109–3124.e22.
81. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M, et al. Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell*. 2007 Apr 6;129(1):123–34.

82. Rini JM, Moremen KW, Davis BG, Esko JD. Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cited 2024 Aug 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579908/>
83. Barkeer S, Chugh S, Batra SK, Ponnusamy MP. Glycosylation of Cancer Stem Cells: Function in Stemness, Tumorigenesis, and Metastasis. *Neoplasia*. 2018 Aug 1;20(8):813–25.
84. Varki A, Kannagi R, Toole B, Stanley P. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015 [cited 2024 Aug 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453023/>
85. Colley KJ, Varki A, Haltiwanger RS, Kinoshita T. Cellular Organization of Glycosylation. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cited 2024 Aug 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579926/>
86. Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Essentials of Glycobiology 2nd edition [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009 [cited 2024 Aug 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1917/>
87. Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cited 2024 Aug 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/>
88. Shakin-Eshleman SH, Spitalnik SL, Kasturi L. The Amino Acid at the X Position of an Asn-X-Ser Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core-glycosylation Efficiency (*). *J Biol Chem*. 1996 Mar 15;271(11):6363–6.
89. Hülsmeyer AJ, Paesold-Burda P, Hennet T. N-Glycosylation Site Occupancy in Serum Glycoproteins Using Multiple Reaction Monitoring Liquid Chromatography-Mass Spectrometry *. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Dec 1;6(12):2132–8.
90. Chandler KB, Pompach P, Goldman R, Edwards N. Exploring Site-Specific N-Glycosylation Microheterogeneity of Haptoglobin using Glycopeptide CID Tandem Mass Spectra and Glycan Database Search. *J Proteome Res*. 2013 Aug 2;12(8):3652–66.
91. van der Burgt Y, Wührer M. The Role of Clinical Glyco(proteo)mics in Precision Medicine. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2023 May 9;22(6):100565.
92. Zhang Z, Westhrin M, Bondt A, Wührer M, Standal T, Holst S. Serum protein N-glycosylation changes in multiple myeloma. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2019 May 1;1863(5):960–70.

93. Garapati K, Jain A, Madden BJ, Mun DG, Sharma J, Budhரா R, et al. Defining albumin as a glycoprotein with multiple N-linked glycosylation sites. *J Transl Med*. 2024 May 13;22(1):454.
94. Gornik O, Wagner J, Pučić M, Knežević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*. 2009 Dec 1;19(12):1547–53.
95. Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MHJ, Vučković F, et al. Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2014 Jun;13(6):1598–610.
96. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beccheli I, et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jul;69(7):779–89.
97. Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, et al. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2018 Jun 1;1864(6, Part A):2034–9.
98. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science*. 2006 Aug 4;313(5787):670–3.
99. Läubli H, Borsig L. Altered Cell Adhesion and Glycosylation Promote Cancer Immune Suppression and Metastasis. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Sep 6 [cited 2024 Aug 19];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.02120/full>
100. Oliveira-Ferrer L, Legler K, Milde-Langosch K. Role of protein glycosylation in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2017 Jun 1;44:141–52.
101. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019 Jun;15(6):346–66.
102. Stadlmann J, Pabst M, Altmann F. Analytical and Functional Aspects of Antibody Sialylation. *J Clin Immunol*. 2010;30(Suppl 1):15–9.
103. Zauner G, Selman MHJ, Bondt A, Rombouts Y, Blank D, Deelder AM, et al. Glycoproteomic Analysis of Antibodies*. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Apr 1;12(4):856–65.
104. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*. 2016 Jun;33(3):309–43.
105. Cooper S, McDonald K, Burkat D, Leask RL. Stenosis Hemodynamics Disrupt the Endothelial Cell Glycocalyx by MMP Activity Creating a Proinflammatory Environment. *Ann Biomed Eng*. 2017 Sep 1;45(9):2234–43.
106. Xue XJ, Jiang Y, Chen L, Chen SL. Relationship between the endothelial glycocalyx and the extent of coronary atherosclerosis. *Microcirc N Y N 1994*. 2018 Nov;25(8):e12504.
107. Ikonomidis I, Voumvourakis A, Makavos G, Triantafyllidi H, Pavlidis G, Katogiannis K, et al. Association of impaired endothelial glycocalyx with arterial stiffness, coronary

microcirculatory dysfunction, and abnormal myocardial deformation in untreated hypertensives. *J Clin Hypertens Greenwich Conn.* 2018 Apr;20(4):672–9.

108. Menni C, Gudelj I, Macdonald-Dunlop E, Mangino M, Zierer J, Bešić E, et al. Glycosylation Profile of Immunoglobulin G Is Cross-Sectionally Associated With Cardiovascular Disease Risk Score and Subclinical Atherosclerosis in Two Independent Cohorts. *Circ Res.* 2018 May 25;122(11):1555–64.

109. Lim SY, Hendra C, Yeo XH, Tan XY, Ng BH, Laserna AKC, et al. N-glycan profiles of acute myocardial infarction patients reveal potential biomarkers for diagnosis, severity assessment and treatment monitoring. *Glycobiology.* 2022 Jun 1;32(6):469–82.

110. Birukov A, Plavša B, Eichelmann F, Kuxhaus O, Hoshi RA, Rudman N, et al. Immunoglobulin G N-Glycosylation Signatures in Incident Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *Diabetes Care.* 2022 Oct 25;45(11):2729–36.

111. Satchell SC, Braet F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2009 May;296(5):F947–56.

112. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. *Physiol Rev.* 2008 Apr;88(2):451–87.

113. Masola V, Zaza G, Secchi MF, Gambaro G, Lupo A, Onisto M. Heparanase is a key player in renal fibrosis by regulating TGF- β expression and activity. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2014 Sep 1;1843(9):2122–8.

114. Rabelink TJ, Van Den Berg BM, Garsen M, Wang G, Elkin M, Van Der Vlag J. Heparanase: roles in cell survival, extracellular matrix remodelling and the development of kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Apr;13(4):201–12.

115. Esposito T, De Stefano G, Reccia MG, Di Lorenzo I, Napolitano F, Scalabri F, et al. Dysregulation of the Expression of Asparagine-Linked Glycosylation 13 Short Isoform 2 Affects Nephron Function by Altering Its N-Linked Glycosylation. *Nephron.* 2017 Feb 9;136(2):143–50.

116. Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, Sun M, Ciccone C, Darvish D, et al. Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. *J Clin Invest.* 2007 Jun 1;117(6):1585–94.

117. Barrios C, Zierer J, Gudelj I, Štambuk J, Ugrina I, Rodríguez E, et al. Glycosylation Profile of IgG in Moderate Kidney Dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2016 Mar;27(3):933.

118. Tsai KF, Chen YL, Chiou TTY, Chu TH, Li LC, Ng HY, et al. Emergence of SGLT2 Inhibitors as Powerful Antioxidants in Human Diseases. *Antioxid Basel Switz.* 2021 Jul 22;10(8):1166.

119. Bakris GL, Fonseca VA, Sharma K, Wright EM. Renal sodium–glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney Int.* 2009 Jun 2;75(12):1272–7.

120. Fonseca-Correa JI, Correa-Rotter R. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Mechanisms of Action: A Review. *Front Med.* 2021 Dec 20;8:777861.

121. Chen J, Williams S, Ho S, Loraine H, Hagan D, Whaley JM, et al. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Ther.* 2010 Dec 1;1(2):57–92.
122. Klen J, Dolžan V. Treatment Response to SGLT2 Inhibitors: From Clinical Characteristics to Genetic Variations. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 10;22(18):9800.
123. O'Hara DV, Lam CSP, McMurray JJV, Yi TW, Hocking S, Dawson J, et al. Applications of SGLT2 inhibitors beyond glycaemic control. *Nat Rev Nephrol.* 2024 Aug;20(8):513–29.
124. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, et al. Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016 Jul 28;375(4):323–34.
125. Margonato D, Galati G, Mazzetti S, Cannistraci R, Perseghin G, Margonato A, et al. Renal protection: a leading mechanism for cardiovascular benefit in patients treated with SGLT2 inhibitors. *Heart Fail Rev.* 2021;26(2):337–45.
126. Cowie MR, Fisher M. SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control. *Nat Rev Cardiol.* 2020 Dec;17(12):761–72.
127. Yaribeygi H, Atkin SL, Butler AE, Sahebkar A. Sodium-glucose cotransporter inhibitors and oxidative stress: An update. *J Cell Physiol.* 2019 Apr;234(4):3231–7.
128. Yaribeygi H, Butler AE, Atkin SL, Katsiki N, Sahebkar A. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and inflammation in chronic kidney disease: Possible molecular pathways. *J Cell Physiol.* 2018 Jan;234(1):223–30.
129. Hoehlschen J, Hofreither D, Tomin T, Birner-Gruenberger R. Redox-driven cardioprotective effects of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: comparative review. *Cardiovasc Diabetol.* 2023 Apr 29;22(1):101.
130. El-Daly M, Pulakazhi Venu VK, Saifeddine M, Mihara K, Kang S, Fedak PWM, et al. Hyperglycaemic impairment of PAR2-mediated vasodilation: Prevention by inhibition of aortic endothelial sodium-glucose-co-Transporter-2 and minimizing oxidative stress. *Vasc Pharmacol.* 2018;56–71.
131. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol.* 2019 Feb 2;18(1):15.
132. Zhou H, Wang S, Zhu P, Hu S, Chen Y, Ren J. Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury via AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission. *Redox Biol.* 2018 May;15:335–46.
133. Kondo H, Akoumianakis I, Badi I, Akawi N, Kotanidis CP, Polkinghorne M, et al. Effects of canagliflozin on human myocardial redox signalling: clinical implications. *Eur Heart J.* 2021 Jul 19;42(48):4947–60.
134. Tatzber F, Griebenow S, Wonisch W, Winkler R. Dual method for the determination of peroxidase activity and total peroxides-iodide leads to a significant increase of peroxidase activity in human sera. *Anal Biochem.* 2003 May 15;316(2):147–53.

135. Antoncic-Svetina M, Sentija D, Cipak A, Milicic D, Meinitzer A, Tatzber F, et al. Ergometry induces systemic oxidative stress in healthy human subjects. *Tohoku J Exp Med*. 2010 May;221(1):43–8.
136. Møller P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*. 2018 Feb 24;33(1):1–7.
137. Milić M, Ožvald I, Vinković Vrček I, Vučić Lovrenčić M, Oreščanin V, Bonassi S, et al. Alkaline comet assay results on fresh and one-year frozen whole blood in small volume without cryo-protection in a group of people with different health status. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2019 Jul;843:3–10.
138. Milić M, Ceppi M, Bruzzone M, Azqueta A, Brunborg G, Godschalk R, et al. The hCOMET project: International database comparison of results with the comet assay in human biomonitoring. Baseline frequency of DNA damage and effect of main confounders. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2021;787:108371.
139. Bonassi S, Ceppi M, Møller P, Azqueta A, Milić M, Neri M, et al. DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Sci Rep*. 2021 Aug 18;11(1):16793.
140. Hailat M, Zakaraya Z, Al-Ani I, Meanazel OA, Al-Shdefat R, Anwer MK, et al. Pharmacokinetics and Bioequivalence of Two Empagliflozin, with Evaluation in Healthy Jordanian Subjects under Fasting and Fed Conditions. *Pharm Basel Switz*. 2022 Feb 3;15(2):193.
141. Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Kashani F, Roohani S, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol*. 2017 Jun 22;13:370–85.
142. Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Mar 12;2019:1279250.
143. Umemura A. Editorial: Impacts of drug-induced oxidative stress. *Front Med [Internet]*. 2023 May 3 [cited 2025 Jan 27];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2023.1191864/full>
144. Thomas C, Wurzer L, Malle E, Ristow M, Madreiter-Sokolowski CT. Modulation of Reactive Oxygen Species Homeostasis as a Pleiotropic Effect of Commonly Used Drugs. *Front Aging [Internet]*. 2022 Jun 14 [cited 2025 Jan 27];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/aging/articles/10.3389/fragi.2022.905261/full>
145. Aggarwal R, Ranganathan P. Study designs: Part 4 – Interventional studies. *Perspect Clin Res*. 2019;10(3):137–9.
146. Sherman KJ. The Trials and Tribulations of Selecting Comparison Groups in Randomized Trials of Nonpharmacological Complementary and Integrative Health Interventions. *J Altern Complement Med*. 2020 Jun 1;26(6):449–55.
147. Sharar HA, Wohlleben D, Vafaie M, Kristen AV, Volz CH, Bekerredjian R, et al. Coronary angiography-related myocardial injury as detected by high-sensitivity cardiac

troponin T assay [Internet]. [cited 2025 Jan 14]. Available from: <https://eurointervention.pcronline.com/article/coronary-angiography-related-myocardial-injury-as-detected-by-high-sensitivity-cardiac-troponin-t-assay>

148. Goldberg A, Zinder O, Zdoroviyak A, Diamond E, Lischinsky S, Gruberg L, et al. Diagnostic coronary angiography induces a systemic inflammatory response in patients with stable angina. *Am Heart J*. 2003 Nov;146(5):819–23.

149. Wang D, Liu J, Zhong L, Li S, Zhou L, Zhang Q, et al. The effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on biomarkers of inflammation: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 Nov 11 [cited 2025 Jan 27];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2022.1045235/full>

150. Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Siasos G, Tsioufis K, et al. The impact of SGLT2 inhibitors on inflammation: A systematic review and meta-analysis of studies in rodents. *Int Immunopharmacol*. 2022 Oct 1;111:109080.

151. Iannantuoni F, M de Mara  n A, Diaz-Morales N, Falcon R, Ba  uls C, Abad-Jimenez Z, et al. The SGLT2 Inhibitor Empagliflozin Ameliorates the Inflammatory Profile in Type 2 Diabetic Patients and Promotes an Antioxidant Response in Leukocytes. *J Clin Med*. 2019 Nov 1;8(11):1814.

152. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015 Nov 26;373(22):2117–28.

153. Effects of Empagliflozin on Progression of Chronic Kidney Disease: A Pre-Specified Secondary Analysis from the Empa-Kidney Trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2024 Jan 1;12(1):39–50.

154. Yasui A, Lee G, Hirase T, Kaneko T, Kaspers S, von Eynatten M, et al. Empagliflozin Induces Transient Diuresis Without Changing Long-Term Overall Fluid Balance in Japanese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Ther*. 2018 Apr;9(2):863–71.

155. SGLT2 inhibitors | National Kidney Foundation [Internet]. [cited 2025 Jan 26]. Available from: <https://www.kidney.org/kidney-topics/sglt2-inhibitors>

156. Daniele AJ, Gregoriotti V, Costa D, López – Fernández T. Use of EMPagliflozin in the prevention of CARDiotoxicity: the EMPACARD – PILOT trial. *Cardio-Oncol*. 2024 Sep 5;10(1):58.

157. Das NA, Carpenter AJ, Belenchia A, Aroor AR, Noda M, Siebenlist U, et al. Empagliflozin reduces high glucose-induced oxidative stress and miR-21-dependent TRAF3IP2 induction and RECK suppression, and inhibits human renal proximal tubular epithelial cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Signal*. 2020 Apr;68:109506.

158. Eshraghi A, Khalesi S, Amini K, Salleh FH, Sharifikia M, Hajmiri MS, et al. Empagliflozin Ameliorates the Oxidative Stress Profile in Type 2 Diabetic Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction: Results of a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study. *Rev Recent Clin Trials*. 2025 Jan 6;

159. Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, Chertow GM, Greene T, Hou FF, et al. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2020 Oct 7;383(15):1436–46.
160. Chen Y, Peng D. New insights into the molecular mechanisms of SGLT2 inhibitors on ventricular remodeling. *Int Immunopharmacol*. 2023 May 1;118:110072.
161. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002 Jul 26;277(30):26733–40.
162. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):34–47.
163. Irvine EB, Alter G. Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. *Glycobiology*. 2020 Feb 26;30(4):241–53.
164. Carvalho S, Oliveira T, Bartels MF, Miyoshi E, Pierce M, Taniguchi N, et al. O -mannosylation and N -glycosylation: two coordinated mechanisms regulating the tumour suppressor functions of E-cadherin in cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 12;7(40):65231–46.
165. Rodrigues JG, Balmaña M, Macedo JA, Poças J, Fernandes Â, de-Freitas-Junior JCM, et al. Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. *Cell Immunol*. 2018 Nov;333:46–57.
166. Zhao Y, Nakagawa T, Itoh S, Inamori K ichiro, Isaji T, Kariya Y, et al. N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on α3β1 integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem*. 2006 Oct 27;281(43):32122–30.
167. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1860(8):1574–82.
168. Groux-Degroote S, Cavdarli S, Uchimura K, Allain F, Delannoy P. Glycosylation changes in inflammatory diseases. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2025 Jan 29]. p. 111–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876162319300628>
169. Büll C, Stoel MA, den Brok MH, Adema GJ. Sialic Acids Sweeten a Tumor's Life. *Cancer Res*. 2014 Jun 12;74(12):3199–204.
170. Zhou X, Yang G, Guan F. Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. *Cells*. 2020 Feb;9(2):273.
171. Zhang NZ, Zhao LF, Zhang Q, Fang H, Song WL, Li WZ, et al. Core fucosylation and its roles in gastrointestinal glycoimmunology. *World J Gastrointest Oncol*. 2023 Jul 15;15(7):1119.
172. Zhou Y, Fukuda T, Hang Q, Hou S, Isaji T, Kameyama A, et al. Inhibition of fucosylation by 2-fluorofucose suppresses human liver cancer HepG2 cell proliferation and migration as well as tumor formation. *Sci Rep*. 2017 Sep 14;7(1):11563.

173. Pan Q, Zhang XL. Roles of core fucosylation modification in immune system and diseases. *Cell Insight*. 2024 Oct 9;4(1):100211.
174. Jia L, Zhang J, Ma T, Guo Y, Yu Y, Cui J. The Function of Fucosylation in Progression of Lung Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Dec 7 [cited 2025 Jan 29];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2018.00565/full>
175. Kizuka Y. Regulation of intracellular activity of N-glycan branching enzymes in mammals. *J Biol Chem*. 2024 Jun 13;300(7):107471.
176. Duan D, Li H, Chai S, Zhang L, Fan T, Hu Z, et al. The relationship between cardiac oxidative stress, inflammatory cytokine response, cardiac pump function, and prognosis post-myocardial infarction. *Sci Rep*. 2024 Apr 18;14(1):8985.
177. Metro D, Corallo F, Fedele F, Buda M, Manasseri L, Buono VL, et al. Effects of Alcohol Consumption on Oxidative Stress in a Sample of Patients Recruited in a Dietary Center in a Southern University Hospital: A Retrospective Study. *Med Kaunas Lith*. 2022 Nov 18;58(11):1670.
178. Najar M, Khalili P, Ayoobi F, Rezaei Poor M, Vatankhah H, Pourmirzaei Olyaei H, et al. Dietary antioxidants and hypertension among menopausal women in Rafsanjan Cohort Study. *Sci Rep*. 2024 Jun 3;14(1):12703.
179. Tagliaferri S, Porri D, De Giuseppe R, Manuelli M, Alessio F, Cena H. The controversial role of vitamin D as an antioxidant: results from randomised controlled trials. *Nutr Res Rev*. 2019 Jun;32(1):99–105.
180. Wilson-Stewart K, Fontanarosa D, Malacova E, Gett S, Kruger A, Trapp JV. Occupational and Patient Radiation Dose and Quality Implications of Femoral Access Imaging During Coronary Angiography. *J Multidiscip Healthc*. 2021;14:1807–18.
181. McCullough PA, Choi JP, Feghali GA, Schussler JM, Stoler RM, Vallabahn RC, et al. Contrast-Induced Acute Kidney Injury. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Sep 27;68(13):1465–73.
182. Tungjai M, Sukantamala S, Malasaem P, Dechsupa N, Kothan S. An evaluation of the antioxidant properties of iodinated radiographic contrast media: An *in vitro* study. *Toxicol Rep*. 2018 Jan 1;5:840–5.
183. Koizumi T, Watanabe M, Yokota T, Tsuda M, Handa H, Koya J, et al. Empagliflozin suppresses mitochondrial reactive oxygen species generation and mitigates the inducibility of atrial fibrillation in diabetic rats. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1005408.
184. Bețiu AM, Noveanu L, Hâncu IM, Lascu A, Petrescu L, Maack C, et al. Mitochondrial Effects of Common Cardiovascular Medications: The Good, the Bad and the Mixed. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan;23(21):13653.
185. Hasan I, Rashid T, Jaikaransingh V, Heilig C, Abdel-Rahman EM, Awad AS. SGLT2 inhibitors: Beyond glycemic control. *J Clin Transl Endocrinol*. 2024 Mar 1;35:100335.
186. Bayes-Genis A, Iborra-Egea O, Spitaleri G, Domingo M, Revuelta-López E, Codina P, et al. Decoding empagliflozin's molecular mechanism of action in heart failure with preserved ejection fraction using artificial intelligence. *Sci Rep*. 2021 Jun 8;11:12025.

187. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Dis Markers*. 2008;25(4–5):493289.
188. Plavša B, Szavits-Nossan J, Blivajs A, Rapčan B, Radovani B, Šesto I, et al. The N-Glycosylation of Total Plasma Proteins and IgG in Atrial Fibrillation. *Biomolecules*. 2023 Mar 28;13(4):605.
189. Miceli G, Basso MG, Pennacchio AR, Cocciola E, Pintus C, Cuffaro M, et al. The Potential Impact of SGLT2-I in Diabetic Foot Prevention: Promising Pathophysiologic Implications, State of the Art, and Future Perspectives—A Narrative Review. *Medicina (Mex)*. 2024 Nov;60(11):1796.
190. Uthman L, Homayr A, Juni RP, Spin EL, Kerindongo R, Boomsma M, et al. Empagliflozin and Dapagliflozin Reduce ROS Generation and Restore NO Bioavailability in Tumor Necrosis Factor α -Stimulated Human Coronary Arterial Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2019;53(5):865–86.
191. Zhang R, Xie Q, Lu X, Fan R, Tong N. Research advances in the anti-inflammatory effects of SGLT inhibitors in type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2024 May 12;16(1):99.
192. Mone P, Varzideh F, Jankauskas SS, Pansini A, Lombardi A, Frullone S, et al. SGLT2 Inhibition via Empagliflozin Improves Endothelial Function and Reduces Mitochondrial Oxidative Stress: Insights From Frail Hypertensive and Diabetic Patients. *Hypertension*. 2022 Aug;79(8):1633–43.
193. Zhou Y, Tai S, Zhang N, Fu L, Wang Y. Dapagliflozin prevents oxidative stress-induced endothelial dysfunction via sirtuin 1 activation. *Biomed Pharmacother*. 2023 Sep 1;165:115213.
194. Tan Y, Yu K, Liang L, Liu Y, Song F, Ge Q, et al. Sodium–Glucose Co-Transporter 2 Inhibition With Empagliflozin Improves Cardiac Function After Cardiac Arrest in Rats by Enhancing Mitochondrial Energy Metabolism. *Front Pharmacol [Internet]*. 2021 Oct 12 [cited 2025 Jan 25];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.758080/full>
195. Lopaschuk GD, Verma S. Empagliflozin’s Fuel Hypothesis: Not so Soon. *Cell Metab*. 2016 Aug 9;24(2):200–2.

9. SAŽETAK

Uvod: Koronarna angiografija je invazivna kardiološka pretraga kojom se omogućava vizualizacija koronarnih arterija upotrebom jednog kontrastnog sredstva pod rendgenskim zračenjem. Oksidacijski stres, odnosno oksidacijsko oštećenje inducirano pretragom rezultat je neravnoteže između produkcije reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidacijskih elemenata. Posljedično proupalno stanje uslijed endotelne disfunkcije ima potencijal pogoršanja već postojeće kardiovaskularne bolesti i akutnog pogoršanja bubrežne funkcije. Inhibitori natrij-glukoza kotransportera 2 (SGLT2 inhibitori) imaju sposobnost redukcije oksidacijskog stresa, te kao potencijalni antioksidansi pružaju direktni renoprotektivni i kardioprotektivni učinak. Uz to, smanjuju produkciju slobodnih radikala i povećavaju ekspresiju antioksidacijskih sustava.

Ciljevi istraživanja: Glavni cilj istraživanja je utvrditi može li jedna doza SGLT2 inhibitora empagliflozina primijenjenog prije elektivne dijagnostičke koronarne angiografije smanjiti stres kod bolesnika putem određivanja promjena ukupnog oksidacijskog i antioksidacijskog kapaciteta plazme, oštećenja DNA i parametara bubrežne funkcije prije i poslije pretrage, te promjene glikozilacije ukupnih proteina plazme i imunoglobulina G (IgG).

Materijali i metode: Ovo randomizirano prospektivno istraživanje provelo se na 60 bolesnika (starosti 18 godina i više) upućenih na elektivnu koronarnu angiografiju u Opću bolnicu „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu, koji su bili podijeljeni u dvije skupine: ispitivana skupina (standardna skrb + primjena jedne doze empagliflozina od 10 mg peroralno u medicinski kontroliranim uvjetima 2 sata prije koronarografije) i kontrolna skupina (standardna skrb). Ispitanici su ispunili upitnik osmišljen za ovo istraživanje, nakon čega se uzorkovala venska krv natašte za bazalne (t0) vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara. Iz bazalnog venskog uzorka separirala se plazma za određivanje ukupnog oksidacijskog kapaciteta (TOC), ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) i N-glikana IgG i ukupnih proteina plazme te puna krv za alkalni komet test. Drugi uzorak venske krvi (t1) je uziman 4 sata (± 15 min) iza koronarne angiografije za TOC, TAC i komet test. Treći uzorak venske krvi (t2) je uziman 24 (± 15 min) nakon koronarne angiografije za određivanje kreatinina, TOC, TAC, N-glikana IgG i ukupnih proteina plazme te komet test.

Rezultati: U skupini ispitanika koji su povrh standardne skrbi dobili i empagliflozin 10 mg je pokazan rastući antioksidacijski trend mjeren ukupnim antioksidacijskim kapacitetom. U istoj je skupini izazvano značajno manje oštećenje DNA 24 sata nakon koronarne angiografije u odnosu na kontrolnu skupinu, mjereno intenzitetom repa kometa (Mann Whitney U test, $P=0,019$) i duljinom repa kometa u komet testu (Mann Whitney U test, $P<0,01$). Dodatno, zabilježene promjene N-glikozilacije imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme upućuje na potencijal moduliranja upalnog odgovora primjenom empagliflozina u ispitivanoj skupini.

Zaključak: Rezultati istraživanja sugeriraju da empagliflozin smanjuje oksidacijsko oštećenje i upalne odgovore kod bolesnika koji se podvrgavaju koronarnoj angiografiji, potvrđeno porastom antioksidacijskog kapaciteta, manjom razinom oksidacijskog oštećenja DNA i promjenama u profilu N-glikozilacije imunoglobulina G i ukupnih proteina plazme u ispitivanoj skupini. Parametri bubrežne funkcije prije i nakon koronarne angiografije pratili su očekivane hemodinamske učinke empagliflozina, ukazujući na njegov potencijal u smanjenju bubrežnog stresa povezanog s invazivnim kardiološkim postupcima.

Ključne riječi: koronarna angiografija, oksidacijski stres, antioksidacijski kapacitet, N-glikozilacija, SGLT2 inhibitori

10. SUMMARY

Introduction: Coronary angiography is an invasive cardiological procedure that enables the visualization of coronary arteries using iodine contrast under X-ray imaging. Oxidative stress, or oxidative damage induced by the procedure, results from an imbalance between the production of reactive oxygen species and antioxidant elements. Consequently, the resulting pro-inflammatory state due to endothelial dysfunction has the potential to worsen pre-existing cardiovascular disease and acutely impair kidney function. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2 inhibitors) have the ability to reduce oxidative stress and, as potential antioxidants, provide direct renoprotective and cardioprotective effects. Additionally, they reduce the production of free radicals and increase the expression of antioxidant systems.

Study Objectives: The main objective of this study is to determine whether a single dose of the SGLT2 inhibitor empagliflozin, administered before elective diagnostic coronary angiography, can reduce stress in patients by assessing changes in total oxidative and antioxidant plasma capacity, DNA damage, and kidney function parameters before and after the procedure, as well as changes in glycosylation of total plasma proteins and immunoglobulin G (IgG).

Materials and Methods: This randomized prospective study was conducted on 60 patients (aged 18 and older) referred for elective coronary angiography at the General Hospital "Dr. Josip Benčević" in Slavonski Brod. The patients were divided into two groups: the experimental group (standard care + a single oral dose of 10 mg empagliflozin under medical supervision 2 hours before coronary angiography), and the control group (standard care). Participants completed a questionnaire designed for this study, followed by fasting venous blood sampling to determine baseline (t0) values of hematological and biochemical parameters. Plasma was separated from the baseline venous sample for the determination of total oxidative capacity (TOC), total antioxidant capacity (TAC), N-glycans of IgG, total plasma proteins, and whole blood for the alkaline comet test. A second venous blood sample (t1) was collected 4 hours (± 15 min) after coronary angiography for TOC, TAC, and the comet test. A third venous blood sample (t2) was taken 24 hours (± 15 min) after coronary angiography to determine creatinine, TOC, TAC, N-glycans of IgG, total plasma proteins, and for the comet test.

Results: In the group of patients who received empagliflozin 10 mg in addition to standard care, an increasing antioxidant trend was observed, as measured by total antioxidant capacity. In the same group, significantly less DNA damage was induced 24 hours after coronary angiography compared to the control group, as measured by comet tail intensity (Mann-Whitney U test, $P=0.019$) and comet tail length in the comet test (Mann-Whitney U test, $P<0.01$). Additionally, recorded changes in N-glycosylation of immunoglobulin G and total plasma proteins suggest the potential modulation of the inflammatory response through the administration of empagliflozin in the experimental group.

Conclusion: The study results suggest that empagliflozin reduces oxidative damage and inflammatory responses in patients undergoing coronary angiography. This is confirmed by increased antioxidant capacity, lower levels of oxidative DNA damage, and changes in the N-glycosylation profile of immunoglobulin G and total plasma proteins in the experimental group. Kidney function parameters before and after coronary angiography followed the expected hemodynamic effects of empagliflozin, indicating its potential in reducing renal stress associated with invasive cardiological procedures.

Keywords: Coronary angiography, oxidative stress, antioxidant capacity, N-glycosylation, SGLT2 inhibitors

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 4. prosinca 1969. godine u Brčkom u Bosni i Hercegovini.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisujem 1988. godine koji završavam i diplomiram 29. travnja 1995. godine.

Nakon dvogodišnjeg stažiranja u Domu zdravlja Slavonski Brod polažem stručni ispit te se zapošljam u Općoj bolnici Dr. Josip Benčević u Slavonskom Brodu gdje sam zaposlena od 09. veljače 1998. godine do danas.

Specijalizaciju iz interne medicine započinjem 1998. godine i završavam položenim specijalističkim ispitom u Kliničkom bolničkom centru Zagreb 27. svibnja 2003. godine. Užu specijalizaciju iz kardiologije sam počela 2013. godine i završila položenim ispitom iz uže specijalizacije u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu 17. srpnja 2015. godine.

Voditeljem Odjela za kardiologiju sam imenovana 1. prosinca 2018. godine te sam 2019. godine započela prve elektrofiziološki procedure u Slavoniji i 2021. godine perkutano liječenje strukturne bolesti srca. Naziv primarijus mi je priznat 16. ožujka 2022. godine na 51. sjednici Povjerenstva za priznavanje naziva primarijus Ministarstva zdravstva.

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u suradnji sa Sveučilištem u Dubrovniku i u suradnji sa Institutom Ruđer Bošković u Zagrebu upisujem 2020. godine.

24. veljače 2022. izabrana sam u naslovno suradničko zvanje asistenta iz znanstvenog područja Biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti, znanstvene grane interna medicina, na Katedri za kliničku medicinu Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek.

Aktivno sudjelujem i organiziram znanstvene i stručne skupove i rad stručnih društava. Član sam Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ), Hrvatske liječničke komore (HLK), Hrvatskog kardiološkog društva (HKD), Europskog kardiološkog društva (ESC), Europskog udruženja za srčani ritam (EHRA), Radne skupine za aritmije i elektrostimulaciju srca HKD, Radne skupine za akutni koronarni sindrom HKD i Radne skupine za invazivnu i intervencijsku kardiologiju HKD.

12. POPIS PUBLIKACIJA

Popis radova objavljenih u znanstvenim časopisima:

1. Nadalin S, Vučić D, Vilibić M, Peitl V, Maršić L, Dunder I, Cvitkušić Lukenda K, Karlović D. Kardiovaskularni čimbenici rizika u bolesnika s teškim duševnim bolestima: pregled i uloga kardiopsihijatrije u strategijama prevencije. *Medicina Fluminensis* 2024; 60:255-271.
2. Gabaldo K, Knežević Praveček M, Vučić D, Mišković D, Bitunjac I, Dunder I, Vujeva B, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. Interventional Traps in Ectatic Coronary Arteries: A Case Report. *Acta Clin Croat (Suppl. 1)* 2024; 63: 70-74.
3. Zeljković I, Ferri J, Mioč P, Brusich S, Matasić R, Jurišić Z, Szavits Nossan J, Maričić L, Cvitkušić Lukenda K, Radeljić V, Pavlović N, Manola Š. COVID-19 pandemic: Impact on the cardiac implantable electronic devices' implantation rates in Croatia. *Plos One* 2023;18(4):e0284699.
4. Vučić D, Cvitkušić Lukenda K, Dunder I, Gabaldo K, Knežević-Praveček M, Miškić B. Diagnostic complexity of rifampicin-induced coagulopathy in a patient with spontaneous muscle bleeding: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2021;100(26):e26234.
5. Cvitkušić Lukenda K, Vučić D, Raguž A, Bitunjac I, Mišković D, Gabaldo K, Miškić B, Knežević Praveček M. Relationship Between Serum Ferritin Levels, Arterial Hypertension and Shift Work in Women. A Cross-sectional Analysis. *SEEMEDJ* 2021;5(2):27-37.
6. Miškić B, Ćosić V, Cvitkušić Lukenda K, Gabaldo K, Bitunjac I, Mišković D, Vučić D, Knežević Praveček M. Cardiovascular Disease Continuum - Peripheral Artery Disease Versus Coronary Heart Disease. *Coll Antropol* 2021;45:151-6.
7. Vučić D, Bosnić Z, Cvitkušić Lukenda K, Gabaldo K, Knežević Praveček M, Leko N, Miškić B. Pathophysiological association of catecholamine stress in a patient with Takotsubo cardiomyopathy and chronic kidney disease: a case report. *Medicina Fluminensis* 2021;57:209-14.
8. Gabaldo K, Vučić D, Bitunjac I, Knežević Praveček M, Cvitkušić Lukenda K, Krčmar T, Miškić B. Primjena integriranog algoritma u dijagnostici i liječenju periferne arterijske bolesti u bolesnika s dijabetesom. *Cardiol Croat* 2021;16:133-9.
9. Omerbašić M, Glavić J, Mišković A, Bardak B, Cvitkušić Lukenda K, Miškić B. Silent acute myocardial infarction in diabetic patients in emergency medicine. *Acta Med Croatica* 2020;74:15-9.
10. Gabaldo K, Sutlić Ž, Mišković D, Knežević Praveček M, Prvulović Đ, Vujeva B, Cvitkušić Lukenda K, Hadžibegović I. Postpericardiotomy syndrome incidence, diagnostic and treatment strategies: experience AT two collaborative centers. *Acta Clin Croat* 2019;58(1):57-62.
11. Stojkov Ž, Miškić B, Ćosić V, Stanić B, Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M. Razvoj Koronarne jedinice Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. *Cardiol Croat* 2019;14(11-12):311-4.
12. Kaijun Wang, Haiyan Li, Winghan J Kwong, Elliott M Antman, Christian T Ruff, Robert P Giugliano, David J Cohen, Elizabeth A Magnuson; ENGAGE AF-TIMI 48 Trial Investigators. Impact of Spontaneous Extracranial Bleeding Events on Health State Utility in Patients with Atrial Fibrillation: Results from the ENGAGE AF-TIMI 48 Trial. *J Am Heart Assoc* 2017; 11;6(8):e006703.
13. Carnicelli AP, De Caterina R, Halperin JL, Renda G, Ruff CT, Trevisan M, Nordio F, Mercuri MF, Antman E, Giugliano RP; ENGAGE AF-TIMI 48 Investigators. Edoxaban for the Prevention of Thromboembolism in Patients With Atrial Fibrillation and Bioprosthetic Valves. *Circulation*. 2017;135(13):1273-1275.
14. Link MS, Giugliano RP, Ruff CT, Scirica BM, Huikuri H, Oto A, Crompton AE, Murphy SA, Lanz H, Mercuri MF, Antman EM, Braunwald E; ENGAGE AF-TIMI 48 Investigators. Stroke and Mortality Risk in Patients With Various Patterns of Atrial Fibrillation: Results From the ENGAGE AF-TIMI 48 Trial (Effective Anticoagulation With Factor Xa Next Generation in Atrial

- Fibrillation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 48). *Circ Arrhythm Electrophysio* 2017;10(1):e004267.
15. Plitt A, Ezekowitz MD, De Caterina R, Nordio F, Peterson N, Giugliano RP; ENGAGE AF-TIMI 48 Investigators. Cardioversion of Atrial Fibrillation in ENGAGE AF-TIMI 48. *Clin Cardiol* 2016 ;39(6):345-6.
 16. Rost NS, Giugliano RP, Ruff CT, Murphy SA, Crompton AE, Norden AD, Silverman S, Singhal AB, Nicolau JC, SomaRaju B, Mercuri MF, Antman EM, Braunwald E; ENGAGE AF-TIMI 48 Investigators. Outcomes With Edoxaban Versus Warfarin in Patients With Previous Cerebrovascular Events: Findings From ENGAGE AF-TIMI 48 (Effective Anticoagulation With Factor Xa Next Generation in Atrial Fibrillation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 48). *Stroke* 2016;47(8):2075-82.
 17. Holik H, Sertić D, Cvitkušić-Lukenda K, Vučinić Ljubičić I, Cocha B. Kronična mijeloproliferativna bolest s eozinofilijom – prikaz slučaja. *Bilten KROHEMA* 2016;8(2):35-7.
 18. Giugliano RP, Ruff CT, Rost NS, Silverman S, Wiviott SD, Lowe C, Deenadayalu N, Murphy SA, Grip LT, Betcher JM, Duggal A, Dave J, Shi M, Mercuri M, Antman EM, Braunwald E; ENGAGE AF-TIMI 48 Investigators. Cerebrovascular events in 21 105 patients with atrial fibrillation randomized to edoxaban versus warfarin: Effective Anticoagulation with Factor Xa Next Generation in Atrial Fibrillation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 48. *Stroke* 2014;45(8):2372-8.
 19. Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, Murphy SA, Wiviott SD, Halperin JL, Waldo AL, Ezekowitz MD, Weitz JI, Špinar J, Ruzyllo W, Ruda M, Koretsune Y, Betcher J, Shi M, Grip LT, Patel SP, Patel I, Hanyok JJ, Mercuri M, Antman EM; ENGAGE AF-TIMI 48 Investigators. Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2013;369(22):2093-104.

Popis radova prezentiranih na znanstvenim skupovima i publiciranih proširenih sažetaka:

1. Cvitkusic Lukenda K, Cipak Gasparovic A, Milic M, Radovani B, Jakab J, Knezevic Pravecek M, Gabaldo K, Gudelj I. Pre-angiographic empagliflozin: effects on oxidative stress and glycan profiles. *EuroPCR2025, Paris, May 20-23, 2025. EUROPCR 2025 Abstract Book.*
2. Cvitkušić Lukenda K, Cipak Gasparovic A, Milic M, Radovani B, Jakab J, Kovacevic A, Gudelj I. TCT-304 SGLT2 Inhibitor Empagliflozin Before Coronary Angiography: Can We Reduce Patient Stress? *JACC* 2024; 84(18):B70-B71.
3. Gabaldo K, Mišković D, Cvitkušić Lukenda K, Dunder I, Bitunjac I, Vučić D, Silović J, Knežević Praveček M. Percutaneous coronary intervention in patients with a history of coronary artery bypass grafting – „where do we stand?“. 11th Congress of Invasive and Interventional Cardiology with International Participation – CROINTERVENT 2025, Zagreb, March 6-9, 2025. *Cardiol Croat.* 2025;20(1-2):16
4. Cvitkušić Lukenda K. Pretilost i aortna stenoza: nasljedni i/ili stečeni čimbenici rizika? 28. Dani internista Slavonije i Baranje. *Osijek*, 6. – 8.12.2024.
5. Tuličić Mihelčić A, Bitunjac I, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K, Stojkov Ž, Stanić B, Vučić D. Left bundle branch-optimized cardiac resynchronization therapy in a patient with ischemic cardiomyopathy: a case report. 15th Congress of the Croatian Cardiac Society, Zagreb. *Cardiol Croat.* 2024;19(11-12):644
6. Cvitkušić Lukenda K, Vorkapić K. Identifying Cardiovascular Risk Factors in Women: Strategies for Assessment. III Euro Anesthesiology & Critical Care Congress, London, UK October 28-29, 2024.
7. Cvitkušić Lukenda K. Prevencija kardiovaskularnih bolesti kod žena: Specifični čimbenici rizika. 5. Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem Kardiovaskularni rizici i šećerna bolest, prevencija i liječenje za liječnike interniste i liječnike obiteljske medicine. Slavonski Brod, 11.-12.listopada 2024.

8. Cvitkušić Lukenda K. 20 godina invazivne kardiologije u OB „Dr Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. 6. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije „Sport i srce“. Orahovica, 5.-7.lipnja 2024.
9. Cvitkušić Lukenda K. Editorial. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):96.
10. Cvitkušić Lukenda K. Razvoj invazivne kardiologije u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Simpozij invazivne kardiologije. Slavonski Brod, 01.-03.12.2023.
11. Nadalin S, Vučić D, Vilibić M, Peitl V, Maršić L, Cvitkušić Lukenda K, Karlović D. Cardiovascular risk factors among patients with severe mental disorders: an overview and the role of cardio-psychiatry in prevention strategies. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):152.
12. Kovačević A, Kovačević S, Dumančić I, Franić M, Meter J, Bukal N, Leko N, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. A retrospective study on chronic obstructive pulmonary disease severity and cardiovascular comorbidities. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):114-5.
13. Špoljarić M, Cvitkušić Lukenda K, Mišković D, Vorkapić K, Vučić D, Gabaldo K. Acute coronary syndrome accompanied with flaccid paraplegia: a case report in a 70-year-old patient. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):108.
14. Silović J, Ereiz J, Kovačević A, Cvitkušić Lukenda K. Atrial fibrillation and electrocardioversion: a single-center retrospective analysis. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):127-8.
15. Lukenda A, Cvitkušić Lukenda K, Gašić Bulajić O, Krnić M, Samardžić J. Blunt thoracic aortic injury - two case reports. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):117.
16. Knežević Praveček M, Pitlović H, Vučić D, Jakab J, Kizivat T, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. A multidisciplinary approach in the search for transthyretin amyloid cardiomyopathy. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):133.
17. Grgić I, Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Mišković D, Didović E, Gabaldo K. Clinical significance of radial artery occlusion after coronary angiography. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):103.
18. Grljušić F, Knežević Praveček M, Gabaldo K, Dunder I, Cvitkušić Lukenda K, Mišković D, Bitunjac I, Raguž A. Dehiscence of a mechanical aortic valve due to endocarditis complicated with cardiogenic shock and an embolic event: a case report. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):137.
19. Gabaldo K, Krčmar T, Knežević Praveček M, Mišković D, Bitunjac I, Dunder I, Raguž A, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. Endovascular treatment in critical limb ischemia - “When inflow is enough”. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):147.
20. Ereiz J, Cvitkušić Lukenda K, Vučić D, Bitunjac I, Silović J, Miškić B. Familial long QT syndrome: a case report. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):126.
21. Cvitkušić Lukenda K, Jakab J, Knežević Praveček M, Gabaldo K, Lukenda A, Čosić V. Ferritin in the prediction of cardiovascular risk in women - preliminary results. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):150.
22. Vučić D, Nadalin S, Bosnić Z, Kovačević A, Cvitkušić Lukenda K. Intrahospital mortality of patients presenting with cardiac tamponade: retrospective analysis. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):135-6.
23. Mišković D, Gabaldo K, Cvitkušić Lukenda K, Miškić B, Krčmar T. Is the ankle brachial index a useful tool for assessing appropriateness? The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):148.

24. Galić M, Jordan A, Blivajs A, Cvitkušić Lukenda K. Left ventricular pseudoaneurysm as a mechanical complication of acute myocardial infarction: a case report. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):102.
25. Didović E, Mišković D, Bitunjac I, Vučić D, Cvitkušić Lukenda K. Multivessel coronary artery disease in a patient with situs viscerum inversus totalis: a case report. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):99-100.
26. Čičak I, Cvitkušić Lukenda K, Mišković D. Paget-Schroetter syndrome in a young female patient: a case report. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):109.
27. Pešut Z, Cvitkušić Lukenda K, Miškić B, Crljenko K, Babić Z. Primary pericardial tumor presenting with cardiac tamponade: a case report. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):143-4.
28. Silović J, Cvitkušić Lukenda K, Vučković M. Religious beliefs in choosing the best treatment modality for coronary artery disease. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):107.
29. Vorkapić K, Špojarić M, Dunder I, Vujeva B, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. Sepsis as the first presentation of penetrating aortic ulcer: a case report. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):119.
30. Mišković D, Gabaldo K, Cvitkušić Lukenda K, Dunder I, Knežević Praveček M, Bitunjac I, Raguž A, Vujeva B, Gudelj I, Hadžibegović I. Statin-naïve patients with acute coronary syndrome in Slavonski Brod. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):106.
31. Valenčak R, Tuličić-Mihelčić A, Stanković M, Presežnik S, Čizmić M, Cvitkušić Lukenda K. The significance and development of the Invasive Cardiac Laboratory at the General Hospital "Dr. Josip Benčević" in Slavonski Brod. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):97-8.
32. Cvitkušić Lukenda K, Bitunjac I, Premužić Meštrović I, Manola Š, Velagić V. Treatment of arrhythmias with catheter ablation at the General "Dr. Josip Benčević" in Slavonski Brod - retrospective analysis. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):123-5.
33. Gabaldo K, Knežević Praveček M, Mišković D, Bitunjac I, Dunder I, Raguž A, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. Treatment of ectatic coronary arteries in acute coronary syndrome. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):101.
34. Dunder I, Knežević Praveček M, Bitunjac I, Raguž A, Cvitkušić Lukenda K. Two decades of cardiac implantology: a single-center experience. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):121-2.
35. Jakab J, Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Miškić B, Včev A. Ventricular free wall rupture after myocardial infarction - a single-center retrospective analysis. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):104.
36. Moser N, Zukanović S, Jurić Samardžić M, Cvitkušić Lukenda K. Impact of SGLT2 inhibitors on contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary interventions. The Invasive Cardiology Symposium in Slavonski Brod, December 1-3, 2023. *Cardiol Croat* 2024;19(3-4):118.
37. Cvitkušić Lukenda K. Organizacija mreže primarne PCI u zapadnoj Slavoniji: kako smo skratili vrijeme? Simpozij invazivne kardiologije. Slavonski Brod, 01.-03.12.2023.
38. Cvitkušić Lukenda K, Lukenda A. Is there a link between shift work and prediabetes in women? Cross sectional trial. II Diabetes, Obesity and Cholesterol Metabolism Conference. December 11, 2023.
39. Cvitkušić Lukenda K, Mreža primarnog zbrinjavanja bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u zapadnoj Slavoniji. Simpozij hitne medicine, Slavonski Brod, 26. listopada 2023.

40. Cvitkušić Lukenda K, Jakab J, Knežević Praveček M, Gabaldo K, Lukenda A, Ćosić V. Cardiovascular risk assessment in woman: Do we need a new risk prediction model? International Conference on Prehypertension, Hypertension and the Cardio Metabolic Syndrome. Zagreb, 18-22 October 2023. Book of Abstracts: 41-42.
41. Cvitkušić Lukenda K. Uloga DPP4 IH i PPAR gama agonista u liječenju kalcificirane aortne stenoze kod bolesnika sa šećernom bolesti. 4. Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem Kardiovaskularni rizici i šećerna bolest, prevencija i liječenje. Slavonski Brod, 6. i 7.10. 2023.
42. Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Gabaldo K, Miškić B, Udovičić M, Livun A. Present and future of calcific aortic valve disease – multiomics approach. 6th Congress of the Working Group on Valvular Diseases of the Croatian Cardiac Society with international participation September 7-9, 2023, Zagreb, Croatia. *Cardiol Croat* 2023;18(9-10):251.
43. Knežević Praveček M, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. Cancer and Acute coronary syndrome. ESC Preventive Cardiology 2023, Malaga, April 13-15 2023. *European Journal of Preventive Cardiology* 2023, 30, Suppl 1, i370.
44. Cvitkušić Lukenda K. Izolacija plućnih vena upotrebom kriobalona kao prva metoda za centre malog volumena – retrospektivna analiza. 20. Simpozij Radne skupine za aritmije i elektrostimulaciju Hrvatskog kardiološkog društva, Opatija 31 ožujka – 1 travnja 2023.
45. Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Dunder I, Raguž A, Bitunjac I, Mišković D, Jakab J, Grgić I, Miškić B, Bardak B, Lukenda A, Gabaldo K. How to avoid system delay in the managing of patients with ST-segment elevation myocardial infarction – experience from Western Slavonia. 10th Croatian Conference on Interventional Cardiology – CROINTERVENT 2023 Zagreb, March 9-12, 2023. *Cardiol Croat* 2023;(3-4):84.
46. Gabaldo K, Bitunjac I, Mišković D, Knežević Praveček M, Raguž A, Miškić I, Dunder I, Cvitkušić Lukenda K. Do we believe in drug-coated balloons – a single-center retrospective analysis. 10th Croatian Conference on Interventional Cardiology – CROINTERVENT 2023 Zagreb, March 9-12, 2023. *Cardiol Croat* 2023;(3-4):69.
47. Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Gabaldo K, Ćosić V. Cardiovascular risk factors and circadian rhythm dysregulation. 10th Croatian Conference on Interventional Cardiology – CROINTERVENT 2023 Zagreb, March 9-12, 2023. *Cardiol Croat* 2023;(3-4):83.
48. Knežević Praveček M, Gabaldo K, Mišković D, Bitunjac I, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. The incidence of cancer and acute coronary syndrome in the same patient is increasing significantly. 10th Croatian Conference on Interventional Cardiology – CROINTERVENT 2023 Zagreb, March 9-12, 2023. *Cardiol Croat* 2023;(3-4):56.
49. Jakab J, Mišković D, Cvitkušić Lukenda K, Gabaldo K, Knežević Praveček M, Miškić B, Hadžibegović I. Recurrent in-stent restenosis and refractory postpericardiotomy syndrome. 14th Congress of the Croatian Cardiac Society with International Participation Zagreb, November 24-27, 2022. *Cardiol Croat* 2022;17(9-10):170.
50. Cvitkušić Lukenda K, Bitunjac I, Jakab J, Miškić B, Velagić V. Efficacy and safety of cryoisolation of pulmonary veins – a single-center retrospective analysis. 14th Congress of the Croatian Cardiac Society with International Participation. Zagreb, November 24-27, 2022. *Cardiol Croat* 2022;17(9-10):173.
51. Cvitkušić Lukenda K, Jakab J, Vučić D, Gabaldo K, Ćosić V, Knežević Praveček M. The influence of circadian rhythm disorders on metabolic factors. 14th Congress of the Croatian Cardiac Society with International Participation. Zagreb, November 24-27, 2022. *Cardiol Croat* 2022;17(9-10):244.
52. Udovičić M, Livun A, Sutlić Ž, Kušec R, Grizelj D, Žigman T, Cvitkušić Lukenda K, Rudan D, Manola Š. Results of the clinical genetic testing pilot study for cardiomyopathies conducted in Dubrava University Hospital. 14th Congress of the Croatian Cardiac Society with International Participation Zagreb, November 24-27, 2022. *Cardiol Croat* 2022;17(9-10):265.
53. Gabaldo K, Mišković D, Cvitkušić Lukenda K, Dunder I, Knežević Praveček M. Critical limb ischemia – diagnosis and treatment from a cardiologist perspective. 14th Congress of the Croatian

- Cardiac Society with International Participation Zagreb, November 24-27, 2022. *Cardiol Croat* 2022;17(9-10):280.
54. Knežević Praveček M, Gabaldo K, Mišković D, Bitunjac I, Grgić I, Jakab J, Vučić D, Dunder I, Miškić B, Cvitkušić Lukenda K. Acute coronary syndrome and cancer. 14th Congress of the Croatian Cardiac Society with International Participation Zagreb, November 24-27, 2022. *Cardiol Croat* 2022;17(9-10):295.
 55. Miškić B, Ćosić V, Miškić K, Jakab J, Včev A, Moser N, Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Pipić-Kitter A, Smaić F. Early Prediabetes Detection for Reducing Macrovascular Complications of Diabetes. Stevo Julius Zagreb Conference on Prehypertension, Hypertension and Cardiovascular Protection - Book of Abstracts :69.
 56. Cvitkušić Lukenda K, Jakab J, Vučić D, Mišković D, Gabaldo K, Miškić B, Knežević Praveček M. Cardiometabolic Profile in Female Shift Workers. Stevo Julius Zagreb Conference on Prehypertension, Hypertension and Cardiovascular Protection. Zagreb, 3-6.11.2022. Book of Abstracts :46.
 57. Cvitkušić Lukenda K. Iznenadna srčana smrt. 26. Dani internista Slavonije i Baranje. Osijek, 4.-5.3.2022.
 58. Cvitkušić Lukenda K. STEMI i šećerna bolest (naša iskustva). Tečaj "Suvremeni pristup prevenciji i liječenju kardiovaskularnog rizika osoba sa i bez šećerne bolesti". Slavonski Brod, 02.10.2021.
 59. Cvitkušić Lukenda K, Vučić D, Knežević Praveček M, Gabaldo K, Mišković D, Miškić B, Livun A. Genetic and personalized approach to valvular heart disease. 5th Congress of the Working Group on Valvular Diseases of the Croatian Cardiac Society with international participation. Zagreb, Croatia, 02.-04.09.2021. *Cardiol Croat* 2021;16(9-10):307.
 60. Cvitkušić Lukenda K. Invazivno liječenje aritmija u OŽB Slavonski Brod. 25. Dani internista Slavonije i Baranje. Osijek, 05.-06.03.2021.
 61. Gabaldo K, Vujeva B, Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Vučić D. Treatment of a true CXA-OM bifurcation lesion using a one stent drug-coated balloons provisional technique. 9th Croatian Conference on Interventional Cardiology – CROINTERVENT 2020 March 19-22, 2020 | Zagreb, Croatia. *Cardiol Croat* 2020;15(3-4):51.
 62. Knežević Praveček M, Gabaldo K, Cvitkušić Lukenda K, Vujeva B, Dunder I, Raguž A, Krčmar T, Starčević B. Successfully opening an in-stent chronic total occlusion lesion of the right coronary artery in a patient with peripheral artery disease. 9th Croatian Conference on Interventional Cardiology – CROINTERVENT 2020 March 19-22, 2020 | Zagreb, Croatia. *Cardiol Croat* 2020;15(3-4):48.
 63. Cvitkušić Lukenda K. Idealna kombinacija antihipertenzivnih lijekova u liječenju arterijske hipertenzije u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti. Radionica "Noga glavu čuva". Slavonski Brod, 07.12.2019.
 64. Cvitkušić Lukenda K, Stanić B. Kardiologija "Povratak u budućnost". Znanstveno stručni skup "Medicina za život - život za medicinu". Slavonski Brod, 20.09.2019.
 65. Knežević Praveček M, Cvitkušić Lukenda K, Raguž A, Dunder I, Bitunjac I, Gabaldo K, Pevac D, Prvulović Đ, Vujeva B, Miškić B. Kasna antraciklinska kardiotoksičnost: prikaz mladića s osteosarkomom. 12. kongres Hrvatskoga kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem i 7. kongres Hrvatske udruge kardioloških medicinskih sestara, Zagreb, Hrvatska, 29.11.-02.12.2018. *Cardiol Croat* 2018;13(11-12):465.
 66. Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Gabaldo K, Dunder I, Vujeva B, Prvulović Đ, Raguž A, Bitunjac I, Miškić B, Lukenda A. Otapanje tromba u aurikuli lijevog atrija dabigatranom nakon neuspjelog liječenja rivaroksabanom. 12. kongres Hrvatskoga kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem i 7. kongres Hrvatske udruge kardioloških medicinskih sestara, Zagreb, Hrvatska, 29.11.-02.12.2018. *Cardiol Croat* 2018;13(11-12):323.
 67. Gabaldo K, Vujeva B, Dunder I, Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Hadžibegović I, Menegoni M, Mišković D, Palenkić AM, Prvulović Đ. Standardized protocol for Acute Coronary

- Syndrome Network in Western Slavonia Region. 8th Conference On Interventional Cardiology with International Participation. Zagreb, Hrvatska. 08.-10.03.2018. *Cardiol Croat* 2018;13(1-2):57.
68. Gabaldo K, Hadžibegović I, Mišković D, Sutlić Ž, Prvulović Đ, Vujeva B, Knežević Praveček M, Cvitkušić Lukenda K. Postperikardiotomni sindrom kod bolesnika sa zamjenom aortne valvule – učestalost, dijagnoza i liječenje. 3. simpozij Radne skupine za bolesti srčanih zalistaka Hrvatskog kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska, 02.-03.12.2016. *Cardiol Croat* 2016;11(12):626.
 69. Vujeva B, Cvitkušić Lukenda K, Mišković D. Eozinofilna kardiomiopatija s trombom u lijevoj klijetci: ima li mjesta za nove oralne antikoagulanse u liječenju? 11. kongres Hrvatskoga kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska 03.-06.11.2016. *Cardiol Croat* 2016;11(10-11):530-1.
 70. Menegoni M, Vujeva B, Mišković D, Hadžibegović I, Cvitkušić Lukenda K, Prvulović Đ, Gabaldo K. Akutni inferiorni infarkt miokarda kao prva manifestacija miksoma lijevog atrija. 11. kongres Hrvatskoga kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska 03.-06.11.2016. *Cardiol Croat* 2016;11(10-11):449.
 71. Hadžibegović I, Prvulović Đ, Gabaldo K, Knežević Praveček M, Cvitkušić Lukenda K, Dunder I, Menegoni M, Mišković D, Vujeva B. Rezultati primjene Protokola za zbrinjavanje akutnog koronarnog sindroma u zapadnoj Slavoniji. 11. kongres Hrvatskoga kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska 03.-06.11.2016. *Cardiol Croat* 2016;11(10-11):447.
 72. Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Dunder I, Lukenda A, Vujeva B. Trendovi u implantaciji kardioverter-defibrilatora: jesu li se ranije uočene razlike po spolu tijekom vremena mijenjale? 11. kongres Hrvatskoga kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska 03.-06.11.2016. *Cardiol Croat* 2016;11(10-11):421.
 73. Knežević Praveček M, Hadžibegović I, Cvitkušić Lukenda K, Raguž A, Dunder I, Gabaldo K, Prvulović I, Vujeva B. Vitamin D deficiency in patients with acute coronary syndrome: clinically relevant or just a bystander? 4th Dubrovnik Cardiology Highlights an ESC Update Programme in Cardiology with International Participation, Dubrovnik 10.-13.10.2015. *Cardiol Croat* 2015;10(9-10):204.
 74. Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Dunder I, Lukenda A, Prvulović Đ, Vujeva B, Gabaldo K, Hadžibegović I. Identifikacija bolesnika kojima liječenje implantabilnim kardioverter-defibrilatorom donosi dobrobit. 10. Kongres Hrvatskog kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 06.-09.11.2014. *Cardiol Croat* 2014;9(9-10):359.
 75. Knežević Praveček M, Hadžibegović I, Prvulović Đ, Cvitkušić Lukenda K, Dunder I, Vujeva B, Gabaldo K, Samardžić P, Miškić B. Povezanost serumske koncentracije vitamina D i akutnog koronarnog sindroma. 10. Kongres Hrvatskog kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 06.-09.11.2014. *Cardiol Croat* 2014;9(9-10):341.
 76. Hadžibegović I, Prvulović Đ, Vujeva B, Gabaldo K, Knežević Praveček M, Cvitkušić Lukenda K, Dunder I, Samardžić P. Usporedba učinkovitosti i sigurnosti između tikagrelora s heparinom i klopidoigrela s heparinom ili enoksaparinom prije primarne perkutane koronarne intervencije u akutnom infarktu miokarda – prva iskustva iz mreže zapadne Slavonije. 10. Kongres Hrvatskog kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 06.-09.11.2014. *Cardiol Croat* 2014;9(9-10):336.
 77. Knežević Praveček M, Cvitkušić Lukenda K, Dunder I, Hadžibegović I, Gabaldo K, Prvulović Đ, Vujeva B, Samardžić P. Kongenitalni kompletni atrioventrikularni blok – prikaz dva slučaja. 9. kongres Hrvatskoga kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska, 13.-16.10.2012. *Cardiol Croat* 2012;7(suppl.1):56.
 78. Hadžibegović I, Prvulović Đ, Vujeva B, Gabaldo K, Knežević Praveček M, Dunder I, Cvitkušić Lukenda K, Samardžić P. Routine urgent PCI after fibrinolysis versus primary PCI in STEMI

patients. Book of Abstracts of 2nd Dubrovnik Cardiology Highlights, Dubrovnik, 29.09.-02.10.2011:35.

Poglavlja u knjigama:

1. Knežević Praveček M, Kljaić Bukvić B, Miškić B, Gabaldo K, Dunder I, Raguž A, Vučić D, Mišković D, Cvitkušić Lukenda K. COVID-19 i renin-angiotenzin-aldosteronski sustav. U: Miškić B, Ćosić V (ur.) Priručnik za liječenje internističkih bolesti u COVID-19 jedinicama. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera; Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo; 2021:16-24.
2. Cvitkušić Lukenda K, Gabaldo K, Knežević Praveček M, Dunder I, Vučić D, Raguž A, Bitunjac I, Ćosić V. Dijagnostika i liječenje kardiovaskularnih bolesti kod oboljelih od COVID-19. U: Miškić B, Ćosić V (ur.) Priručnik za liječenje internističkih bolesti u COVID-19 jedinicama. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera; Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo; 2021:39-51.
3. Knežević Praveček M, Cvitkušić Lukenda K, Kljaić Bukvić B, Ćosić V, Miškić B. Cjepiva i procijepljenje populacije ključni u borbi protiv pandemije COVID-19. U: Miškić B, Ćosić V (ur.) Priručnik za liječenje internističkih bolesti u COVID-19 jedinicama. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera; Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo; 2021:117-25.
4. Cvitkušić Lukenda K, Knežević Praveček M, Ćosić V, Miškić B. Cjepivom-inducirana imunološka trombotska trombocitopenija. U: Miškić B, Ćosić V (ur.) Priručnik za liječenje internističkih bolesti u COVID-19 jedinicama. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera; Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo; 2021:127-37.
5. Cvitkušić Lukenda K. Akutni koronarni sindrom - STEMI (eng.ST - elevation MI (myocardial infarction)) i šećerna bolest. U: Miškić B, Ćosić V, Stojkov Ž. (ur.) Kardiovaskularni rizici i šećerna bolest, prevencija i liječenje. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera; Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo; 2021:61-7.