



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Jasenka Grgurić

**EKSPRESIJSKI OBRAZAC I
BIOMARKERSKI POTENCIJAL
MOLEKULA lncRNA U PERIFERNOJ
KRVI PACIJENATA S
KALCIFICIRAJUĆOM STENOZOM
AORTNIH ZALISTAKA SRCA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Jasenka Grgurić

**EKSPRESIJSKI OBRAZAC I
BIOMARKERSKI POTENCIJAL
MOLEKULA IncRNA U PERIFERNOJ
KRVI PACIJENATA S
KALCIFICIRAJUĆOM STENOZOM
AORTNIH ZALISTAKA SRCA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Frane Paić

Zagreb, 2025



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Jasenka Grgurić

**EXPRESSION PATTERN AND
BIOMARKER POTENTIAL OF lncRNA
MOLECULES IN PERIPHERAL BLOOD
OF PATIENTS WITH CALCIFIC AORTIC
VALVE STENOSIS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Frane Paić, PhD, Associate Professor

Zagreb, 2025

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za medicinsku biologiju, Zavoda za medicinsku biologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Frane Paića, u okviru Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORU

Izv. prof. dr. sc. Frane Paić rođen je 27. kolovoza 1966. godine u Šibeniku. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završio je u Splitu. Diplomirao je 1999. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Diplomski rad pod nazivom „Citogenetička analiza nekih vrsta porodice Tenebrionidae (Coleoptera, Insecta)” izradio je pod vodstvom prof. dr. sc. Dražene Papeš (Zavod za molekularnu biologiju, PMF Zagreb) i prof. dr. sc. Đurđice Ugarković (Odjel za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb). Godine 2002. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu obranio je magistarski rad „Primjena novih metoda analize DNA u sudskoj medicini za identifikaciju posmrtnih ostataka” (mentor dr. sc. Dragan Primorac, dr. med.) te stekao akademski stupanj magistra znanosti u području biomedicine i zdravstva, polju temeljnih medicinskih znanosti, grani sudska medicina. Doktorsku disertaciju pod naslovom „Identification and bioinformatics analysis of differentially expressed genes in osteoblasts and osteocytes by genome-wide expression analysis of murine calvaria tissue” obranio je 2011. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ive Kalajžića (Department of Reconstructive Sciences, School of Dental Medicine, University of Connecticut Health Center, SAD) i komentorstvom prof. dr. sc. Floriane Bulić-Jakuš (Katedra za medicinsku biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Stručno se usavršavao na više međunarodnih institucija: University of Connecticut Health Center, School of Medicine, Department of Gastroenterology/Hepatology, SAD (2002.–2004.); Connecticut State Police Division of Scientific Services, Forensic Science Laboratory, Meriden, CT, SAD (2003.–2004.) te Department of Reconstructive Sciences, School of Dental Medicine, University of Connecticut Health Center, CT, SAD (2008.–2009.). Godinu dana (2023.–2024.) boravio je kao gostujući izvanredni profesor i istraživač na Department of Surgery (SMD), Division of Cardiac Surgery, Strong Memorial Hospital, The University of Rochester Medical Center (URMC), Rochester, NY, SAD. Znanstveni interes usmjeren mu je na istraživanje genetskih i epigenetskih mehanizama povezanih s tumorigenezom te razvojem kardiovaskularnih bolesti. Autor je ili koautor 46 znanstvenih radova, od kojih je 34 indeksirano u bazi Web of Science Core Collection (WoSCC), te 40 sažetaka u zbornicima domaćih i međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova. Djeluje i kao recenzent za brojne ugledne međunarodne znanstvene časopise.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

Biološki odsjek

**EKSPRESIJSKI OBRAZAC I BIOMARKERSKI POTENCIJAL MOLEKULA
lncRNA U PERIFERNOJ KRVI PACIJENATA S KALCIFICIRAJUĆOM
STENOZOM AORTNIH ZALISTAKA SRCA**

Jasenka Grgurić

Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za medicinsku biologiju,
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Šalat 3, 10 000 Zagreb

Kalcificirajuća aortalna stenoz (CAVS) najčešća je valvularna bolest u starijoj populaciji, obilježena progresivnim fibro-kalcifikacijskim remodeliranjem aortalnog zaliska. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ekspresiju dvadeset dugih nekodirajućih RNA (lncRNA) u tkivu aortalnih zalistaka i perifernoj plazmi bolesnika s CAVS-om te procijeniti njihov biomarkerski i patobiološki potencijal. U studiju je uključeno 75 bolesnika s teškim CAVS-om, 59 bolesnika s blagim ili umjerenim oblikom bolesti te 100 zdravih kontrola. Ekspresija lncRNA određena je qRT-PCR metodom, a lokalizacija H19 i TUG1 analizirana je metodom in situ hibridizacije. U tkivu kalcificiranih zalistaka utvrđena je široka deregulacija lncRNA, uz značajno povišenu ekspresiju MIAT, RUNX1-IT1, UCA1, H19, PACERR, AGAP2-AS1, CYTOR i HOTAIR te sniženu ekspresiju GAS5 i CASC15. Multivarijantna regresija i bootstrap analiza potvrđuju MIAT, RUNX1-IT1 i UCA1 kao najsnažnije tkivne prediktore prisutnosti CAVS-a, dok je GAS5 pokazala konzistentan protektivni učinak. Plazmatski profili lncRNA nisu korelirali sa stupnjem CAVS-a niti s tkivnom ekspresijom, što upućuje na ograničenu dijagnostičku vrijednost cirkulirajućih lncRNA u odnosu na one u valvularnom tkivu. (155 stranica, 40 slika, 27 tablica, 245 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: kalcificirajuća stenoz aortalnih zalistaka; lncRNA, biomarkeri, tkivo aortalnog zaliska, plazma.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Frane Paić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Inga Urlić, Prof. dr.s c. Petra Korać, Izv. Prof. dr.s c. Petar Ozretić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

**EXPRESSION PATTERN AND BIOMARKER POTENTIAL OF LNCRNA
MOLECULES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CALCIFIC
AORTIC VALVE STENOSIS (CAVS)**

Jasenka Grgurić

Laboratory for Epigenetics and Molecular Medicine, Department of Medical Biology,
University of Zagreb School of Medicine, Šalata 3, 10000 Zagreb, Croatia

Calcific aortic valve stenosis (CAVS) is the most common valvular disease in the elderly population, characterized by progressive fibro-calcific remodeling of the aortic valve. The aim of this study was to investigate the expression of twenty long non-coding RNAs (lncRNAs) in aortic valve tissue and peripheral plasma of patients with CAVS, and to evaluate their biomarker and pathobiological potential. The study included 75 patients with severe CAVS, 59 patients with mild or moderate disease, and 100 healthy controls. lncRNA expression was quantified using qRT-PCR, while the localization of H19 and TUG1 was assessed by in situ hybridization. A broad deregulation of lncRNA transcripts was identified in calcified aortic valve tissue, with significantly increased expression of MIAT, RUNX1-IT1, UCA1, H19, PACERR, AGAP2-AS1, CYTOR and HOTAIR, and decreased expression of GAS5 and CASC15. Multivariable regression and bootstrap analysis confirmed MIAT, RUNX1-IT1 and UCA1 as the strongest tissue predictors of CAVS, while GAS5 consistently demonstrated a protective effect. Plasma lncRNA profiles did not correlate with CAVS severity or with tissue expression, indicating limited diagnostic value of circulating lncRNAs compared with valve-derived transcripts.

(155 pages, 40 figures, 27 tables, 245 references; language of the original dissertation: Croatian)

Supervisor: Assoc. Prof. Frane Paić, MD, PhD

Reviewers: Prof. Inga Urlić, PhD; Prof. Petra Korać, PhD; Assist. Prof. Petar Ozretić, PhD

ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Frani Paiću, na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i kontinuiranoj podršci. Njegovo znanje, strpljenje i poticajan pristup bili su od izuzetne važnosti tijekom mog znanstvenog rada.

Duboku zahvalnost dugujem svojim roditeljima na razumijevanju, ohrabrenju i neiscrpnj podršci kroz sve godine školovanja.

Posebno zahvaljujem svom sinu, čija su ljubav, strpljenje i vedrina bili moj najveći izvor snage i motivacije.

Zahvaljujem i svim kolegama i kolegicama na suradnji, pomoći i ugodnom ozračju koje je pratilo moj rad.

Ovaj doktorski rad posvećen je mom sinu Karlu.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Ciljevi i svrha istraživanja.....	4
1.2. Hipoteza istraživanja.....	6
2. Literaturni pregled.....	7
2.1. Srčani zalisci.....	7
2.2. Aortalni zalistak	9
2.2.1. Anatomija i osnovna građa.....	9
2.2.2. Histološka građa aortalnog zaliska	10
2.2.3. Funkcionalna uloga histoloških slojeva aortalnog zaliska.....	12
2.2.4. Stanični sastav aortalnog zaliska	13
2.3. Bolesti aortalnog zaliska	21
2.3.2. Aortalna stenoza.....	23
2.3.3. Etiologija aortalne stenozе	25
2.3.4. Kalcificirajuća stenoza aortalnih zalistaka	26
2.3.4.1. Proaterogeni čimbenici rizika	27
2.3.4.2. Genetska predispozicija za razvoj CAVS-a.....	28
2.3.4.3. Epidemiologija CAVS-a.....	29
2.3.4.4. Epidemiološki pokazatelji u Hrvatskoj	31
2.3.4.5. Klinička prezentacija i prognoza CAVS-a	33
2.3.4.6. Dijagnostička klasifikacija i hemodinamska procjena aortalne stenozе.....	27
2.3.4.7. Hemodinamski podtipovi teške aortalne stenozе	34
2.3.4.8. Dijagnostika i kliničko liječenje kalcificirajuće aortalne stenozе (CAVS).....	35
2.4. Epigenetski mehanizmi.....	38
2.4.1. Regulatorne protein-nekodirajuće RNA molekule.....	39
2.4.2. Duge nekodirajuće RNA molekule	41
2.4.3. Epigenetski i translacijski potencijal lncRNA	45
2.4.4. Uloga lncRNA u kardiovaskularnim bolestima.....	46
4. MATERIJALI I METODE	54
4.1. Nacrt istraživanja	54

4.2. Prikupljanje i obrada tkiva	56
4.3. Demografski i klinički podaci	57
4.4. Izdvajanje plazme	57
4.5. Kvantifikacija CRP, troponina i NT-proBNP u plazmi (ELISA)	58
4.6. qRT-PCR analiza ekspresije ciljanih lncRNA molekula.....	59
4.6.1. Izolacija ukupne RNA iz tkiva aortalnih zalistaka srca	59
4.6.2. Izolacija ukupne RNA iz plazme	60
4.6.3. Reverzna transkripcija	62
4.6.4. qRT-PCR reakcija	62
4.6.5. Analiza qRT-PCR podataka	63
4.7. Analiza ekspresije lncRNA molekula TUG1 i H19 metodom in situ hibridizacije (ViewRNA™ ISH)..	65
4.8. Statistička obrada podataka	65
5. REZULTATI	66
5.1. Opće karakteristike ispitanika.....	66
5.1.1. Opće karakteristike bolesnika s kalcificirajućom aortalnom stenozom (CAVS; teški stadij bolesti)	66
5.1.2. Opće karakteristike transplantiranih pacijenata	70
5.1.3. Opće karakteristike kontrolnih, zdravih ispitanika	72
5.1.4. Usporedba demografskih, kliničkih, laboratorijskih i ehokardiografskih karakteristika CAVS bolesnika (teški stadij bolesti) i zdravih, kontrolnih ispitanika	75
5.1.5. Opće karakteristike ispitanika s blagim i umjerenim stadijem CAVS-a.....	81
5.1.6. Usporedba demografskih, kliničkih, laboratorijskih i ehokardiografskih karakteristika ispitanika s različitim stadijem CAVS-a.....	83
5.2. Razina CRP, troponina i NT-proBNP proteina u plazmi (ELISA) CAVS bolesnika i zdravih, kontrolnih ispitanika	87
5.3. Ekspresija ciljanih lncRNA molekula u tkivu aortalnih zalistaka CAVS bolesnika i kontrolnih uzoraka tkiva	91
5.4. Ekspresija ciljanih lncRNA molekula u perifernoj plazmi CAVS bolesnika i kontrolnih, zdravih ispitanika	94
5.5. Analiza povezanosti tkivne ekspresije ciljanih lncRNA s prisutnošću CAVS-a.....	96
5.6. Spearmanove korelacije (ρ) tkivne ekspresije lncRNA s kliničkim, laboratorijskim i ehokardiografskim karakteristikama CAVS ispitanika.....	98

5.6.1. Povezanost s prisutnošću CAVS-a	98
5.6.2. Demografski i antropometrijski pokazatelji	99
5.6.3. Laboratorijski parametri	99
5.6.4. Klinički komorbiditeti i terapija.....	100
5.6.5. Ehokardiografski pokazatelji	101
5.6.6. Integrirani sažetak nalaza korelacijske analize tkivne ekspresije lncRNA molekula	102
5.7. Korelacija tkivne ekspresije lncRNA s demografskim, laboratorijskim, kliničkim i ehokardiografskim pokazateljima u kontrolnim aortalnim zaliscima	104
5.8. Analiza povezanosti razine ciljanih lncRNA u perifernoj plazmi s prisutnošću CAVS-a	106
5.9. Spearmanove korelacije (ρ) plazmatske ekspresije lncRNA s kliničkim, laboratorijskim i ehokardiografskim karakteristikama CAVS ispitanika.....	107
5.9.1. Korelacije između plazmatske i tkivne ekspresije lncRNA u CAVS-u	107
5.9.2. Korelacija s demografskim karakteristikama CAVS ispitanika.....	107
5.9.3. Korelacije s laboratorijskim karakteristikama CAVS ispitanika	108
5.9.4. Korelacija s kliničkim karakteristikama CAVS ispitanika	108
5.9.5. Povezanost plazmatskih lncRNA s ehokardiografskim karakteristikama CAVS ispitanika	109
5.10. Spearmanove korelacije (ρ) plazmatske ekspresije lncRNA s kliničkim, laboratorijskim i ehokardiografskim karakteristikama zdravih, kontrolnih ispitanika	110
5.10.1. Demografske karakteristike	110
5.10.2. Laboratorijske karakteristike	110
5.10.3. Kliničke karakteristike	111
5.10.4. Ehokardiografske karakteristike.....	112
5.11. Ekspresija ciljanih lncRNA molekula u perifernoj plazmi CAVS bolesnika s blagim i umjerenim stadijem bolesti	114
5.11.1. Ekspresija lncRNA prema stupnju bolesti i u zdravim kontrolama.....	115
5.12. Tkivna lokalizacija lncRNA H19 i TUG1 u aortalnim zaliscima srca	117
6. RASPRAVA	119
6.1. Klinički i ehokardiografski profil CAVS-a u skladu je s poznatim obrascima progresije bolesti.....	119
6.2. Patobiologija CAVS-a: uloga endotela, intersticijskih stanica i mekanobiologije.....	120
6.3. Tkivni transkriptom lncRNA otkriva snažnu deregulaciju u CAVS-u	120

6.4. Plazmatske lncRNA ne odražavaju tkivnu ekspresiju niti stadij bolesti.....	121
6.5. Korelacijska analiza potvrđuje povezanost tkivnih lncRNA s hemodinamskom težinom CAVS-a..	121
6.6. Integracija nalaza: CAVS je epigenetski vođena bolest s lokalno specifičnim transkriptomom..	122
6.7. Kliničke implikacije i translacijski potencijal lncRNA profila.....	122
6.7.1. Potencijal tkivnih lncRNA kao biomarkera.....	122
6.7.2. Terapijski potencijal lncRNA.....	122
6.7.3. Plazma nije adekvatna zamjena za tkivo.....	122
6.8. Ograničenja studije.....	123
6.9. Opći zaključak	123
7. Zaključci	124
8. Literatura	127
9. Popis kratica.....	150
10. Životopis autora s popisom objavljenih djela	155

1. UVOD

Kalcificirajuća stenoza aortalnih zalistaka srca (CAVS; engl. *calcific aortic valve stenosis*) najčešća je bolest srčanih zalistaka u odrasloj populaciji zapadnih zemalja, a njezina pojavnost ubrzano raste paralelno sa starenjem stanovništva (1-4). U velikim epidemiološkim istraživanjima u Europi i Sjevernoj Americi procijenjeno je da u populaciji starijoj od 75 godina ukupna prevalencija CAVS-a iznosi približno 12,4 %, dok simptomatski teški oblici zahvaćaju oko 3,4 % osoba (5). Ako se trenutni demografski trendovi nastave, očekuje se da će do 2050. godine broj simptomatskih bolesnika s teškim CAVS-om doseći 2,1 milijun u Europi i 1,4 milijun u Sjevernoj Americi [4]. Dodatni rast broja oboljelih predviđa se u Africi, Aziji i Južnoj Americi, gdje ubrzano starenje populacije paralelno povećava opterećenje bolestima zalistaka (2, 5, 6).

Globalna analiza tereta kalcificirajuće bolesti aortalnih zalistaka tijekom tridesetogodišnjeg razdoblja, obuhvaćajući 204 zemlje svijeta, pokazala je izražen porast apsolutnog broja oboljelih i umrlih, unatoč relativno stabilnim dobno standardiziranim stopama. U istraživanju Yi i sur. (2021) izvješćeno je da je prevalencija CAVS-a porasla više od četiri puta, a ukupan mortalitet za približno 40 %, osobito u zemljama s visokim sociodemografskim indeksom (7). Prema istom izvoru, Hrvatska se svrstava među europske države sa srednje visokim opterećenjem: procijenjena incidencija iznosi približno 35/100 000, prevalencija 550/100 000, a mortalitet oko 3,8/100 000 stanovnika, što potvrđuje da je CAVS rastući javnozdravstveni problem i u našoj populaciji (7).

Etiološki gledano, kalcificirajuće zadebljanje i fibro-kalcifikacijsko preoblikovanje trikuspidnog (TAV) ili bikuspidnog (BAV) aortalnog zaliska čine osnovu većine slučajeva, dok reumatska valvularna bolest — nekoć dominantna etiologija i još uvijek vodeći uzrok u državama u razvoju — danas čini tek oko 10 % dijagnosticiranih oboljenja (2, 8, 9).

Bez obzira na početni uzrok, CAVS se razvija postupno, od inicijalnih subkliničkih lezija prema hemodinamski značajnom suženju aortnog ušća (10).

Glavni pokretači patološkog procesa uključuju mehanički stres, genetsku predispoziciju i aterogene čimbenike rizika, kao što su hiperhomocisteinemija, dislipidemija, poremećaji metabolizma kalcija, pušenje, metabolički sindrom, dijabetes, hipertenzija, kronično bubrežno zatajenje, muški spol i starija dob. Ovi čimbenici dovode do disfunkcije endotela, narušavanja

integriteta bazalne membrane i nakupljanja aterogenih lipoproteina, praćenih infiltracijom monocita–makrofaga, mastocita i T-limfocita (3, 11-16). Rezultat je oksidativni stres, stvaranje pjenastih stanica, pojačana produkcija profibrotičnih i proinflammatoryh medijatora te smanjena aktivnost anti-kalcifikacijskih proteina. Takvo mikrokruženje potiče remodeliranje izvanstaničnog matriksa te aktivaciju signalnih mreža koje promiču neoangiogenezu, upalu i biomineralizaciju (3, 11-16).

U središtu patobiologije CAVS-a nalaze se valvularne intersticijske stanice (VIC, engl. *valvular interstitial cells*), koje prelaze iz mirujućeg (qVIC, engl. *quiescent valvular interstitial cells*) u aktivirani miofibroblastični fenotip (aVIC, engl. *activated valvular interstitial cells*), a potom u osteoblastima slične stanice (obVIC, engl. *osteoblast-like valvular interstitial cells*), pod utjecajem proosteogenih signala (17). Dodatno, dio valvularnih endotelnih stanica prolazi endotelno-mezenhimalnu tranziciju (EndMT), dok cirkulirajuće osteoprogenitorne stanice mogu dodatno pridonijeti valvularnoj kalcifikaciji (18-20).

U skladu s progresijom promjena unutar aortalnog zalistka srca razlikuju se dva funkcionalna stadija bolesti: aortalna skleroza (Asc; engl. *aortic valve sclerosis*) – rani, uglavnom asimptomatski stadij s minimalnom opstrukcijom protoka i kalcificirajuća stenoza aortalnih zalistaka (CAVS) – uznapredovali stadij obilježen ograničenom pokretljivošću listića, povećanim gradijentima tlaka i progresivnom hipertrofijom lijeve klijetke, uz razvoj miokardne fibroze i rizik od sistoličke/dijastoličke disfunkcije (3, 10, 21, 22).

Iako je razumijevanje patogeneze CAVS-a značajno napredovalo, učinkovita farmakološka terapija koja bi zaustavila ili usporila napredovanje bolesti još uvijek ne postoji. Kirurška zamjena aortalnog zaliska (SAVR) ili transkateterska implantacija (TAVR) i dalje su jedine terapijske opcije s dokazanom kliničkom koristi (23-25). Stoga je prepoznavanje novih dijagnostičkih i terapijskih molekula iznimno važno.

Sve je jasnije da genetska predispozicija i diferencijalna ekspresija pojedinih gena ne mogu u potpunosti objasniti složeni spektar promjena u CAVS-u. Tradicionalni genetički modeli ne razjašnjavaju dovoljno dobro povezanost CAVS-a s aterosklerotskim čimbenicima rizika ni utjecajem okoliša, što snažno upućuje na važnu ulogu epigenetskih regulatornih mehanizama (13, 16).

Epigenetika obuhvaća nasljedne, ali reverzibilne promjene u strukturi DNA i kromatina koje ne mijenjaju nukleotidni slijed (4, 26). One određuju staničnu sudbinu, razvoj tkiva i homeostazu organizma moduliranjem pristupačnosti promotorskih i regulatornih regija DNA, čime upravljaju ekspresijom gena na stanično-specifičan, a nerijetko i alel-specifičan način (4, 27).

Četiri glavna epigenetska mehanizma uključuju: DNA metilaciju i hidrosimetilaciju, postranslacijsku modifikaciju histonskih proteina; ATP-ovisno remodeliranje kromatina, i regulaciju putem nekodirajućih RNA, uključujući mikroRNA i duge nekodirajuće RNA (lncRNA) (4, 28-33). Zajedno čine epigenom koji definira transkripcijski krajobraz stanice (4, 34, 35). Zbog svoje stabilnosti, prilagodljivosti i reverzibilnosti, epigenetski mehanizmi postaju ključni faktor u patogenezi CAVS-a – i privlačna meta za buduće terapijske intervencije.

Posebno mjesto među njima zauzimaju duge nekodirajuće RNA (lncRNA). One predstavljaju heterogenu skupinu RNA transkripata duljih od 200 nukleotida koji ne kodiraju proteine, ali imaju ključnu regulatornu ulogu u kontroli genske ekspresije, epigenetskom preuređenju kromatina i posredovanju staničnih signalnih puteva (36-39).

Transkribiraju se iz intronskih, egzonskih, intergenskih i antisense regija genoma, a njihova je ekspresija tkivno-specifična, razvojno regulirana i osjetljiva na promjene u staničnom mikrokruženju (39, 40).

lncRNA djeluju kroz više mehanizama: kao epigenetski vodiči (engl. *guides*) usmjeravajući modifikatore kromatina na specifične DNA lokuse, kao mamac (engl. *decoys*) za transkripcijske faktore ili mikroRNA, kao strukturne skela (engl. *scaffolds*) za stvaranje ribonukleoproteinskih kompleksa te kao posttranskripcijski regulatori stabilnosti i translacije mRNA (37-41). Zbog sposobnosti regulacije ključnih signalnih mreža – uključujući TGF- β /SMAD, WNT/ β -katenin i NOTCH – lncRNA imaju značajnu ulogu u staničnoj diferencijaciji, upalnim procesima i reakcijama na stres (38, 41).

Tijekom posljednjeg desetljeća sve je jasnije da lncRNA sudjeluju u patogenezi brojnih bolesti, uključujući tumore, metaboličke poremećaje i kardiovaskularne bolesti (42-47)

Uloga dugih nekodirajućih RNA (lncRNA) u patohistogenezi CAVS-a posljednjih je godina sve jasnije potvrđena te se danas smatra da ovi transkripti predstavljaju ključne regulatore fibro-kalcifikacijskog remodeliranja aortnog zaliska. lncRNA sudjeluju u ranim događajima disfunkcije valvularnog endotela (VEC) potičući ekspresiju adhezijskih molekula, regrutaciju monocita i aktivaciju NF- κ B signalizacije, čime započinju kroničnu upalu karakterističnu za inicijalni stadij CAVS-a (4, 48-56). Istodobno moduliraju fenotipsku tranziciju valvularnih intersticijskih stanica (VIC) iz mirujućeg u miofibroblastni i osteoblastni fenotip (4, 48-57).

Sve je više dokaza da se određene duge nekodirajuće RNA mogu detektirati u perifernoj krvi, gdje cirkuliraju slobodno ili unutar izvanstaničnih vezikula (eksosoma, mikrovezikula, apoptotskih tjelešaca) (58, 59). Zbog njihove stabilnosti i tkivne specifičnosti, lncRNA se smatraju mogućim neinvazivnim biomarkerima u kardiovaskularnim bolestima, uključujući kalcificirajuću stenozu aortalnih zalistaka (CAVS) (58, 59).

Unatoč sve većem broju istraživanja o ulozi lncRNA u patobiologiji kalcificirajuće stenozе aortalnih zalistaka, njihov ekspresijski i biomarkerski potencijal u perifernoj krvi (serumu/plazmi) bolesnika s CAVS-om još je uvijek gotovo u potpunosti nepoznat. Stoga je cilj ovog rada odrediti ekspresijski profil i biomarkerski potencijal odabrane podskupine dugih nekodirajućih RNA u perifernoj plazmi pacijenata s blagim, umjerenim i teškim stadijem CAVS-a te ih usporediti s njihovim razinama u plazmi zdravih kontrolnih ispitanika. Nadalje, analizom povezanosti plazmatskih i tkivnih razina navedenih lncRNA — u patološki promijenjenim (CAVS) i kontrolnim uzorcima aortalnih zalistaka — kao i njihovih odnosa s demografskim, kliničkim i ehokardiografskim parametrima bolesti, nastoji se procijeniti njihov potencijal kao neinvazivnih biomarkera progresije i kliničke pojavnosti CAVS-a.

1.1 . Ciljevi i svrha istraživanja

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je odrediti koncentraciju i biomarkerski potencijal podskupine dugih nekodirajućih RNA (lncRNA) molekula — JADE, MALAT1, ROR, ANRIL, OIP5-AS1, TUG1, GAS5, AGAP2-AS1, NEAT1, RUNX1-IT1, KLF3-AS1, MEG3, H19, PGM5-AS1, CYTOR, CASC15, PVT1, UCA1, Wisper i Chast — u perifernoj cirkulaciji (plazmi) pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortalnih zalistaka (CAVS).

Ciljevi istraživanja ostvareni su kroz sljedeće aktivnosti:

- Određivanjem ekspresijske razine ciljanih lncRNA u tkivu aortalnih zalistaka patološki promijenjenih (teški oblik CAVS-a; indicirana kirurška zamjena aortalnog zaliska) te kontrolnih uzoraka eksplantiranih srca pacijenata kod kojih je, zbog drugih oblika kardiomiopatija, bila indicirana transplantacija srca. Ukupna RNA izolirana je TRIzol postupkom, kvaliteta i koncentracija određene su spektrofotometrijski (NanoDrop™ ND-1000), a nakon reverzne transkripcije (sinteze cDNA) ekspresija lncRNA analizirana je metodom kvantitativne PCR analize u stvarnom vremenu (qRT-PCR).
- Određivanjem razine ciljanih lncRNA u perifernoj plazmi bolesnika s teškim, blagim i umjerenim oblikom CAVS-a te plazmi zdravih kontrolnih ispitanika. Postupak kvantifikacije bio je identičan kao u analizi tkiva, uz razliku da je izolacija ukupne RNA iz plazme provedena primjenom TRIzol LS reagensa i dodatnog pročišćavanja pomoću Ambion™ PureLink™ RNA Mini Kit-a.
- Analizom koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP), troponina i N-terminalnog proBrain Natriuretskog Peptida (NT-proBNP) u perifernoj krvi (plazmi) bolesnika s teškim, blagim i umjerenim CAVS-om, transplantiranih pacijenata i zdravih kontrolnih, ispitanika, primjenom standardne ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodologije uz komercijalno dostupna specifična protutijela i odgovarajući sustav vizualizacije.
- Analizom tkivne lokalizacije lncRNA TUG1 i H19 primjenom kromogene in situ hibridizacije (ViewRNA™ ISH), s ciljem određivanja stanične i prostorne distribucije navedenih transkripata unutar fibro-kalcificiranog valvularnog tkiva.
- Statističkom obradom dobivenih rezultata uključujući usporedbu ekspresije lncRNA u patološkom i kontrolnom tkivu aortalnih zalistaka srca, analizu razlika njihove razine u plazmi bolesnika s različitim stupnjevima CAVS-a i zdravih ispitanika, te procjenu odnosa između ekspresije lncRNA (u tkivu i plazmi) i demografskih, kliničkih i ehokardiografskih parametara te koncentracija CRP-a, troponina i NT-proBNP-a.

1.2. Hipoteze istraživanja

U skladu s ciljevima istraživanja, postavljene je sljedeće hipoteze istraživanja:

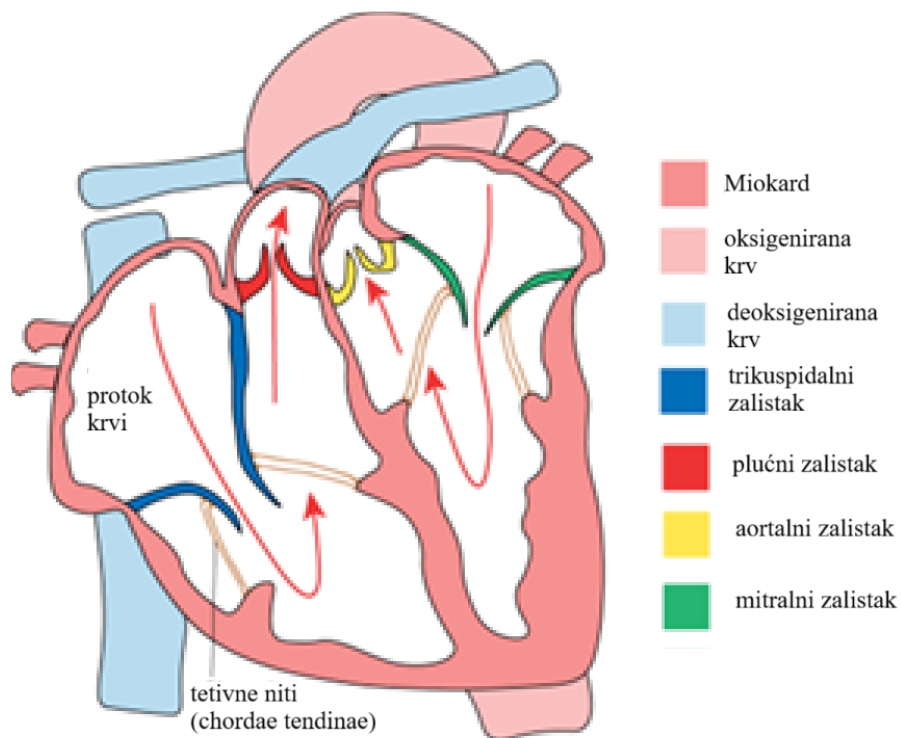
U perifernoj cirkulaciji (krvnoj plazmi) CAVS pacijenata s teškim oblikom aortne stenoze kod kojih je indicirana operativna zamjena aortnih zalistaka srca očekuje se povećana ekspresija dugih nekodirajućih RNA molekula lncRNA JADE, MALAT1, ROR, ANRIL, OIP5-AS1, TUG1, GAS5, AGAP2-AS1, NEAT1, RUNX1-IT1, KLF3-AS1, MEG3, H19, PGM5-AS1, CYTOR, CASC15, PVT1, UCA1, Wisper i Chast u odnosu na periferne uzorke krvi CAVS pacijenata s blagim i umjerenim stupnjem bolesti te perifernu krv kontrolnih, zdravih ispitanika.

Napomena: Lista analiziranih lncRNA molekula izmijenjena je u odnosu na izvorni plan istraživanja. Naime, detaljnijim pregledom literature utvrđeno je da WISPER, CHAST, NEAT1 i PGM5-AS1 iako početno planirane za analizu u ovoj studiji predstavljaju lncRNA molekule primarno uključene u fibrozu miokarda, hipertrofiju kardiomiocita i opće stanične stresne odgovore, ali ne sudjeluju izravno u procesima osteogene diferencijacije, upalne aktivacije valvularnih intersticijskih stanica (VIC), endotelno-mezenhimalne tranzicije (EndMT) niti u epigenetskom reprogramiranju, koji su ključni mehanizmi patogeneze kalcificirajuće aortalne stenoze. Stoga navedene lncRNA nisu obuhvaćene ovom studijom. Suprotno tome, lncRNA PACERR, MIAT, ZEB1-AS1 i HOTAIR koje su naknadno uključene u analizu izravno moduliraju signalne putove koji potiču upalu, osteogenezu, fibrozu zaliska, EndMT i epigenetske promjene unutar aortnog zaliska, te stoga znatno preciznije odražavaju molekularnu biologiju CAVS i predstavljaju biološki racionalniji izbor za ispitivanje njihove ekspresije u eksperimentalnom i kliničkom kontekstu.

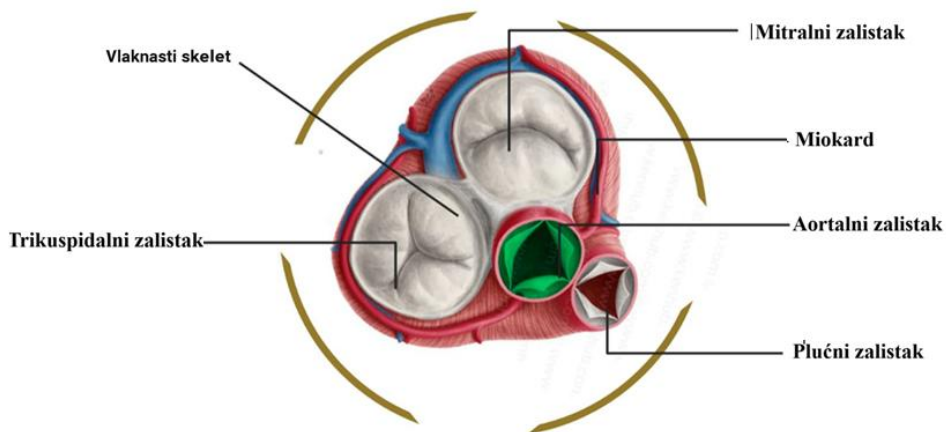
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Srčani zalisci

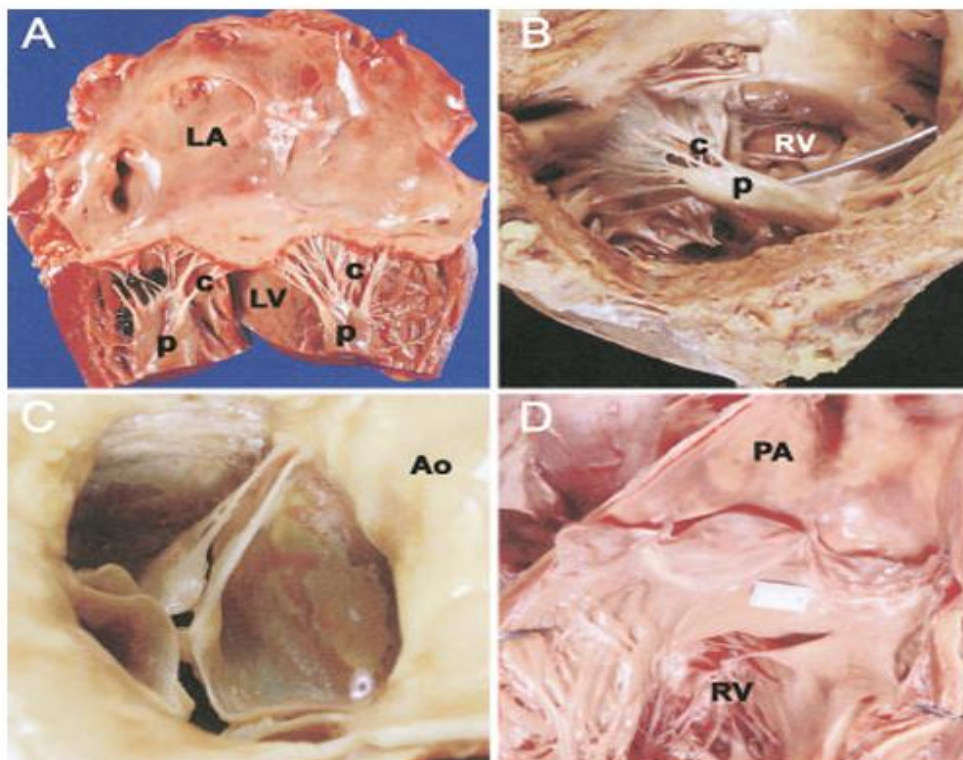
Prema anatomskom položaju i funkciji, srčani zalisci (valvule) dijele se na atrioventrikularne (ulazne) i semilunarne (izlazne). Atrioventrikularne valvule obuhvaćaju mitralni zalistak (MV), smješten između lijevog atrija i lijevog ventrikula, te trikuspidalni (TV), koja se nalazi između desnog atrija i desnog ventrikula. Semilunarne valvule uključuju aortalnu (AV) i plućnu (PV) valvulu, koje se nalaze na izlazima iz lijevog, odnosno desnog ventrikula. S obzirom na stranu srca, razlikujemo lijeve zaliske (MV i AV) te desne zaliske (TV i PV) (Slika 1, 2 i 3) (60). Desni srčani zalisci — trikuspidalni i plućni — omogućuju prolazak venske krvi siromašne kisikom (O_2) i bogate ugljikovim dioksidom (CO_2) iz sistemske cirkulacije prema plućima, gdje dolazi do oksigenacije. Nakon toga, oksigenirana krv vraća se u lijevo srce te se, prolaskom kroz mitralni i aortalni zalistak, usmjerava u aortu i dalje u arterijski sustav, kapilarnu mrežu i venski povrat prema srcu (Slika 1) (60).



Slika 1. Grada i tok krvi kroz srce sisavaca. Srce sisavca ima četiri šupljine – dva atrija i dva ventrikula – te četiri srčana zaliska koji omogućuju jednosmjerni tok krvi. Desna strana srca (plava) prima deoksigeniranu krv i pumpa je prema plućima kroz plućnu valvulu, dok lijeva strana (crvena) prima oksigeniranu krv iz pluća te je kroz aortalnu valvulu upućuje u sistemske cirkulaciju. Modificirano prema: O'Donnell A, Yutzey KE. *Mechanisms of heart valve development and disease. Development. 2020;147(13).*(60)



Slika 2. Građa srčanih zalistaka i njihova prostorna orijentacija u srcu. Prikaz anatomske organizacije četiri glavna srčana zaliska: mitralnog (lijevog atrioventrikularnog), trikuspidalnog (desnog atrioventrikularnog), aortalnog i plućnog zaliska, smještenih unutar vlaknastog skeleta srca koji ih međusobno povezuje i osigurava mehaničku potporu. Prikazan je prednji dio srca s uočljivim odnosom zalistaka prema okolnom miokardu i međusobnom rasporedu na bazi srca. Modificirano prema: Wal P, Rathore S, Aziz N, Singh YK, Gupta A. Aortic stenosis: a review on acquired pathogenesis and ominous combination with diabetes mellitus. *Egypt Heart J.* 2023;75(1):26. (61)

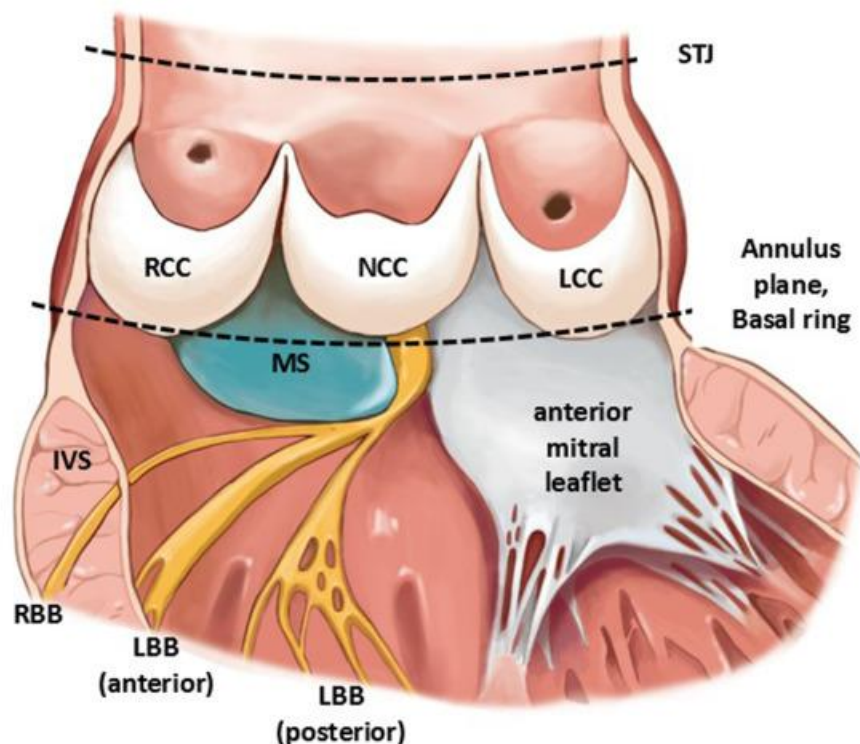


Slika 3. Makroskopski izgled normalnih srčanih zalistaka. (A) Mitralni zalistak prikazan u otvorenom položaju s očuvanim prednjim listićem i dvjema polovicama stražnjeg listića. (B) Intaktan trikuspidalni zalistak s vidljivim elektrostimulativnim kateterom u desnoj klijetki. (C) Cjelovit aortalni zalistak promatran s aortalne (izlazne) strane. (D) Otvoreni plućni zalistak s prikazane tri semilunarne kuspise. Kratice: Ao – aorta; LA – lijevi atrij; LV – lijeva klijetka; PA – plućna arterija; RV – desna klijetka; p – papilarni mišić; c – tetivne niti (chordae tendineae). Modificirano prema: Leask RL, Jain N, Butany J. Endothelium and valvular diseases of the heart. *Microsc Res Tech.* 2003;60(2):129–37. (62).

2.2. Aortalni zalistak

2.2.1. Anatomija i osnovna građa

Aortalni zalistak smješten je između lijeve klijetke (LV; engl. *left ventricle*) i uzlazne aorte (aorta ascendens) te ima ključnu ulogu u osiguravanju jednosmjernog protoka krvi iz srca prema sistemskej cirkulaciji. Građen je od četiri međusobno povezana sastavna dijela koji čine funkcionalnu jedinicu: aortni listići (kuspisi), aortni anulus, sinusi Valsalve i sinotubularni spoj (engl. *sinotubular junction*). Cijeli „aparat“ smješten između lijevog ventrikula i ascendentne aorte poznat je pod nazivom korijen aorte (engl. *aortic root*) aorte. Sastoji se od tri listića (kuspisa): lijevog koronarnog (LCC, engl. *left coronary cusps*), desnog koronarnog (RCC; engl. *right coronary cusps*) i nekoronarnog listića (NCC; engl. *non-coronary cusps*), koji su funkcionalno i anatomski povezani s odgovarajućim sinusima Valsalve (Slika 4) (63).



Slika 4. Shematski prikaz korijena aorte. Kratice: STJ – sinotubularni spoj (*sinotubular junction*); RCC – desni koronarni kuspis; LCC – lijevi koronarni kuspis; NCC – stražnji/nekoronarni kuspis; IVS – interventrikularni septum; LBB – lijeva grana snopa (npl. *eleft bundle branch*); RBB – desna grana snopa (engl. *right bundle branch*); MS – membranozni septum. Preuzeto iz: Verhemel S, Nuis RJ, van den Dorpel M, Adrichem R, de Sá Marchi MF, Hirsch A, i sur. *Computed tomography to predict pacemaker need after transcatheter aortic valve replacement.* *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2024;18(6):597–608 (63)

2.2.2. Histološka građa aortalnog zaliska

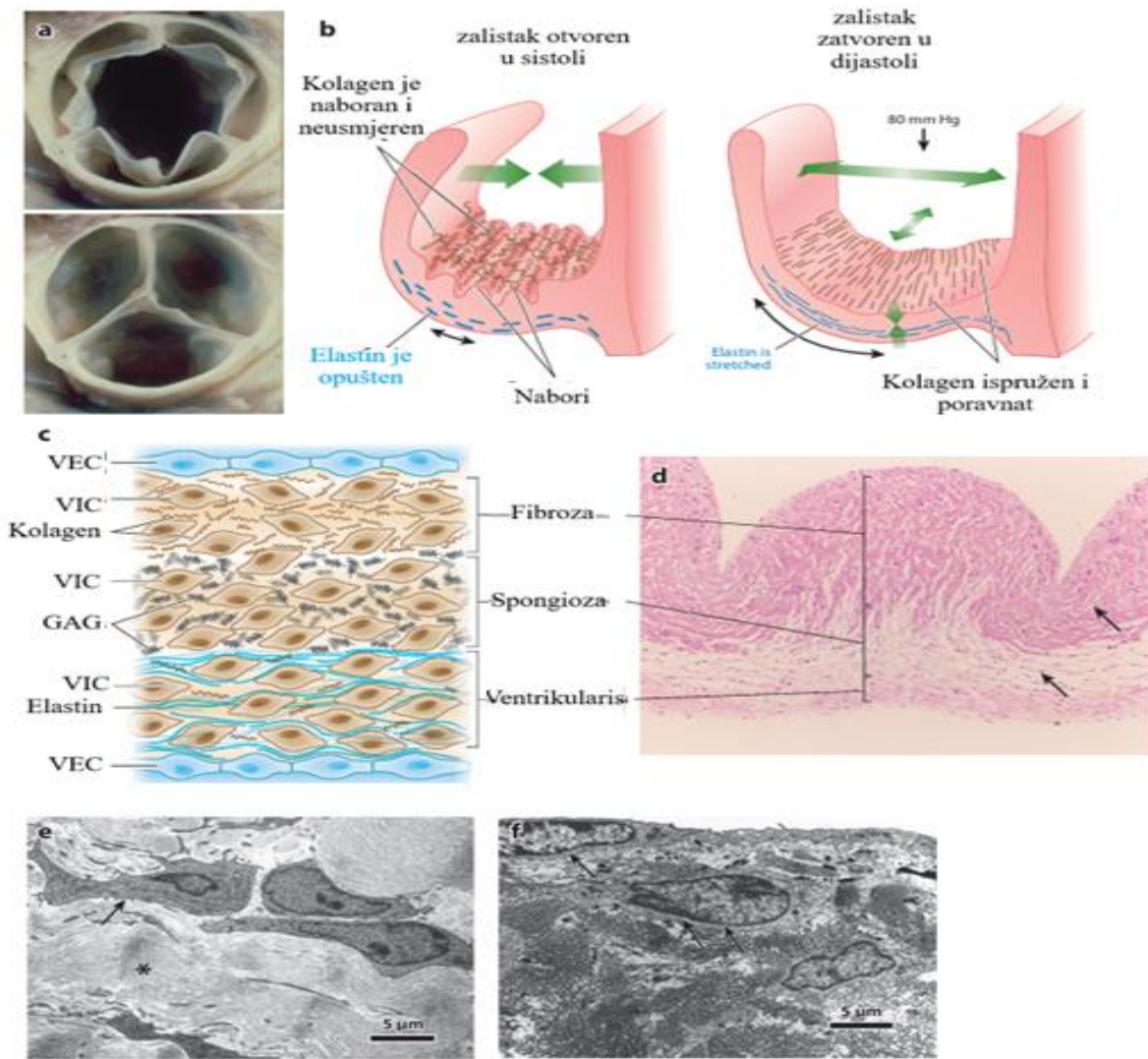
Histološki, listići aornog zaliska građeni su od tri osnovna sloja (Slika 5): fibroze (lamina fibroza), spongioze (lamina spongioza) i ventrikularisa (lamina ventrikularis) (16).

- Fibroza, koja se nalazi na izlaznoj, odnosno aortalnoj strani listića, sastoji se od gusto pakiranih, cirkumferentno orijentiranih kolagenskih vlakana (pretežito kolagen tipa I i III), organiziranih u paralelne listove i snopove, te u manjoj mjeri od radijalno orijentiranih vlakana elastina (16).
- Spongioza, središnji sloj listića, građen je pretežito od glikozaminoglikana (uglavnom hijaluronata) i proteoglikana, uz prisutnost rahlo raspoređenih kolagenskih vlakana. Ovaj sloj ima ulogu amortizacije mehaničkog opterećenja i omogućuje elastičnost listića (16).
- Ventrikularis, smješten na ulaznoj, odnosno ventrikularnoj strani listića, sastoji se uglavnom od radijalno orijentiranih snopova elastina isprepletenih s gustim kolagenskim vlaknima, čime se osigurava fleksibilnost i otpornost listića na ponavljano savijanje tijekom srčanog ciklusa (16).

Uz navedene slojeve, u strukturi listića mogu se naći i adhezivna vlakna fibrina i lamina, u različitom stupnju izraženosti.

Sva tri sloja aortalnih listića u pravilu su avaskularna, ali su inervirana adrenergičkim i kolinergičkim neuronskim mrežama, koje sudjeluju u finom neurohumoralnom nadzoru funkcije zalistaka (16).

Ova trostruka arhitektura omogućuje aortalnom zalistku da se ponaša kao visoko specijalizirana biomehanička membrana, koja kombinira fleksibilnost i stabilnost, što je ključno za njegovu dugotrajnu funkcionalnost (16).



Slika 5. Funkcionalna grada aortalnog zaliska na makroskopskoj i mikroskopskoj razini. (a) Makroskopski prikaz aortalnog zaliska s izlazne (aortalne) strane u fazi otvorenog položaja (sistola) i zatvorenog položaja (dijastola). (b) Shematski prikaz arhitekture i prostorne konfiguracije listića aortalnog zaliska u poprečnom presjeku, s prikazom orijentacije kolagenskih i elastičnih vlakana tijekom sistole i dijastole (modificirano prema referenci [11]). (c) Shematski prikaz detaljne stanične i izvanstanične organizacije (ECM) normalnog aortalnog zaliska, s označenim slojevima fibroze, spongioze i ventrikularisa te rasporedom valvularnih intersticijskih (VIC) i endotelnih stanica (VEC) (modificirano uz dopuštenje, prema referenci [12]). (d) Histološki prikaz tkivne arhitekture listića aortalnog zaliska (presjek kroz listić u relaksiranom, nesavijenom stanju, odgovarajućem sistoli), pri čemu su jasno vidljiva tri glavna sloja: ventrikularis, spongioza i fibroza. Valvularne intersticijske stanice (VIC) označene su strelicama. Gornji rub prikaza odgovara izlaznoj (aortalnoj) površini. Originalno povećanje: $\times 100$. Bojanje hematoksilin-eozinom. (e) Transmisijski elektronskomikroskopski prikaz relaksiranog (svježeg) svinjskog aortalnog zaliska koji prikazuje fibroblastni morfolit VIC stanica (strelica), gusto raspoređena kolagenska vlakna sa spiralnim savijanjem (zvjezdica) te mogućnost VIC–kolagen i VIC–VIC interakcija. (f) Transmisijski elektronskomikroskopski prikaz površine aortalnog zaliska s prikazom valvularne endotelne stanice (VEC; strelica) i dubljih slojeva VIC stanica (dvostruka strelica), čime se ilustrira potencijalna međustanična interakcija VEC–VIC (preuzeto uz dopuštenje, prema referenci [14]). Kratice: GAG – glikozaminoglikan; ECM – izvanstanični matriks; VIC – valvularne intersticijske stanice; VEC – valvularne endotelne stanice. Modificirano prema: Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:161–83. (64)

2.2.3. Funkcionalna uloga histoloških slojeva aortalnog zaliska

Navedene strukturne komponente imaju presudnu ulogu u održavanju pravilne funkcije aortalnih zalistaka.

Zahvaljujući njihovim kombiniranim mehaničkim i elastičnim svojstvima, normalni aortalni zalistak posjeduje snažnu, ali visoko prilagodljivu strukturu koja se lako prilagođava sistoličkim i dijastoličkim pokretima srca (Slika 5).

- Fibroza, kao najdeblji i mehanički najotporniji sloj, osigurava strukturnu čvrstoću listića i djeluje kao glavni nositelj mehaničkog stresa koji nastaje tijekom srčane kontrakcije i hemodinamskog protoka krvi. Njegova krutost smanjuje pretjerano savijanje središnjeg dijela listića te povećava snagu koaptacije, čime se učinkovito sprječava pojava regurgitacije.
- Spongioza, sa svojom karakterističnom „pjenastom“ i „polutekućom“ građom, bogatom glikozaminoglikanima i proteoglikanima koji vežu velike količine vode, ima ulogu amortizacijskog sloja. Ona povezuje i podmazuje susjedne slojeve tijekom njihovog međusobnog naprezanja i deformacija, djelujući poput jastuka koji apsorbira mehaničku energiju. Na taj način spongioza omogućuje reorganizaciju kolagenih vlakana u fibrozi i elastičnih vlakana u ventrikularisu, pridonoseći elastičnosti i plastičnosti listića tijekom ponavljanih srčanih ciklusa
- Lamina ventricularis odgovorna je za elastična svojstva listića koja omogućuju njihovo dinamično savijanje, istezanje i vraćanje u početni oblik tijekom otvaranja i zatvaranja aortalnog zalistka. Zahvaljujući toj elastičnosti, površina listića u fazi otvaranja smanjuje se na minimum, dok se u fazi zatvaranja — pod utjecajem povratnog tlaka — listići rastežu i postižu maksimalnu koaptaciju, osiguravajući nepropusnost aortalnog zaliska.

Osnovne funkcije staničnih i izvanstaničnih (ECM) komponenti aortalnog zaliska srca prikazane su u Tablici 1, koja sažima njihovu lokalizaciju, fiziološku ulogu te potencijalni doprinos razvoju valvularne bolesti.

Tablica 1. Ključne stanične i izvanstanične komponente (ECM) aortalnog zaliska.

<i>Komponenta</i>	<i>Lokalizacija</i>	<i>Pretpostavljena funkcija</i>	<i>Napomene / Ključna pitanja</i>
<i>Endotelne stanice</i>	površina zaliska	Osiguravaju trombozestenciju i posreduju upalne procese	Uloga u prijenosu smičnih sila i modulaciji funkcije VIC stanica nije potpuno razjašnjena; pokazuju funkcionalne razlike u odnosu na endotelne stanice vaskulame stijenke; razlike između ulazne i izlazne strane zaliska još uvijek su nedovoljno poznate.
<i>Intersticijske stanice</i>	Od površine prema dubini, prisutne u svim slojevima	Sintetiziraju i remodeliraju elemente izvanstaničnog matriksa	Smatraju se glavnim modulatorom dugoročne održivosti zaliska i ključnim posrednikom bolesti; izražena regionalna heterogenost i nedovoljno razjašnjena uloga kontraktilnog potencijala i aktivacije.
<i>Elastin</i>	Koncentriran u sloju ventrikularisa	Pružuje elastičnost – rasteže se u dijasoli, vraća u sistoli	Potencijalna mehanistička uloga u bolesti nije definirana.
<i>Glikozaminoglikani</i>	Koncentrirani u sloju spongioze	Apsorbiraju smične sile i ublažavaju udar između slojeva ventrikularisa i fibroze tijekom cikličkog kretanja zaliska	Potencijalna mehanistička uloga u bolesti nije definirana.
<i>Kolagen</i>	Koncentriran u sloju fibroze	Osigurava čvrstoću i krutost te omogućuje koaptaciju listića tijekom dijasole	Vjerojatno najvažniji strukturni element; valovita građa i orijentacija vlakana omogućuju anizotropiju mehaničkih svojstava i prilagodbu cikličkim promjenama oblika listića.

Prikazane su ključne stanične i izvanstanične komponente (ECM) aortalnog zaliska, njihovu lokaciju unutar histoloških slojeva, pretpostavljene fiziološke funkcije te poznate i nepoznate mehanizme uključenosti u valvularnu patologiju. Modificirano prema: Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. Circulation. 2008;118(18):1864–80.(65)

2.2.4. Stanični sastav aortalnog zaliska

Površinu aortalnog zaliska prekriva jednoslojni endotel koji čine valvularne endotelne stanice (VEC; engl. *valvular endothelial cells*), dok se u unutrašnjosti listića nalazi populacija valvularnih intersticijskih stanica (VIC; engl. *valvular interstitial cells*) (16, 66). Ove dvije stanične skupine čine temeljnu funkcionalnu jedinicu aortalnog listića, odgovornu za održavanje strukturne stabilnosti, elastičnosti i homeostaze zaliska (16).

Endotelne stanice posjeduju brojne sintetske i metaboličke funkcije koje, između ostalog, reguliraju propusnost krvnih žila, vaskularni tonus, koagulaciju i fibrinolizu, kao i metabolizam hormona i lipoproteina, rast drugih staničnih tipova te upalne odgovore. Osim toga, pretpostavlja se da endotelne stanice imaju sposobnost transdiferencijacije, čime mogu doprinijeti obnovi intersticijskih stanica unutar valvularnog tkiva (62).

Valvularne endotelne stanice (VEC) imaju ključnu ulogu u održavanju strukturne i funkcionalne homeostaze aortalnog zaliska (67-71). One djeluju kao selektivna barijera između krvi i intersticijskog tkiva, omogućujući transport kisika i hranjivih tvari prema unutrašnjosti zaliska koji je avaskularan. VEC posjeduju i imunomodulacijska svojstva,

izražavaju MHC II molekule i citokine koji reguliraju upalne procese te omogućuju obnovu tkivne ravnoteže nakon oštećenja (67-69).

Jedna od najvažnijih homeostatskih funkcija VEC stanica jest signalizacija dušikom oksidom (NO), posredovana putem enzima eNOS (endotelna NO-sintaza) (69). Ova signalna mreža inhibira agregaciju trombocita, prijanjanje leukocita i aktivaciju VIC stanica, čime sprječava njihovu miofibroblastnu i osteogenu diferencijaciju te razvoj kalcifikacije. Viša ekspresija eNOS-a u sloju ventrikularisa u odnosu na fibrozu objašnjava veću otpornost ventrikularne strane zaliska na degenerativne promjene.

Eksperimentalna istraživanja pokazala su da ko-kultura VEC i VIC stanica smanjuje ekspresiju α -SMA i osteogenih markera u aktiviranim VIC stanicama te da parakrino djelovanje NO može vratiti aktivirane VIC stanice u mirovanje (qVIC) (69).

Osim toga, VEC stanice doprinose homeostazi povećanom ekspresijom inhibitora kalcifikacije kao što su noggin, CV-2/BMPER, SMAD-6 i C-tip natriuretski peptid (CNP), osobito u sloju ventrikularisa, čime dodatno štite zalistak od degenerativnih promjena (69).

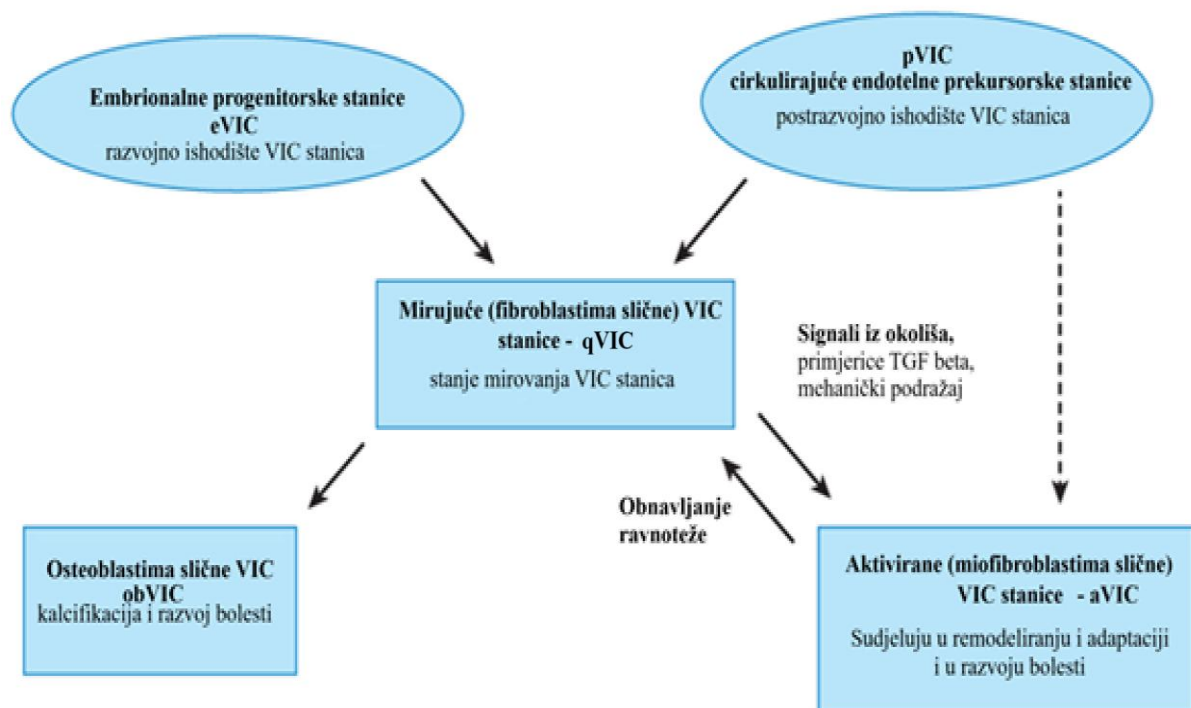
VIC stanice, smještene unutar sva tri histološka sloja (fibroza, spongioza i ventrikularis), predstavljaju glavnu staničnu komponentu valvularnog tkiva (16, 64, 66, 69). Sastavljene su pretežito od fibroblasta, uz manju zastupljenost miofibroblasta i glatkih mišićnih stanica (16, 64, 66, 69).

Njihova osnovna funkcija je sinteza, remodeliranje i obnova izvanstaničnog matriksa (ECM; engl. *extracellular matrix*), koji uključuje kolagen, elastin, fibronektin, laminin i proteoglikane. Time VIC stanice osiguravaju mehaničku čvrstoću, elastičnost i prilagodljivost listića tijekom ponavljanih ciklusa otvaranja i zatvaranja zaliska (16, 64, 66, 69).

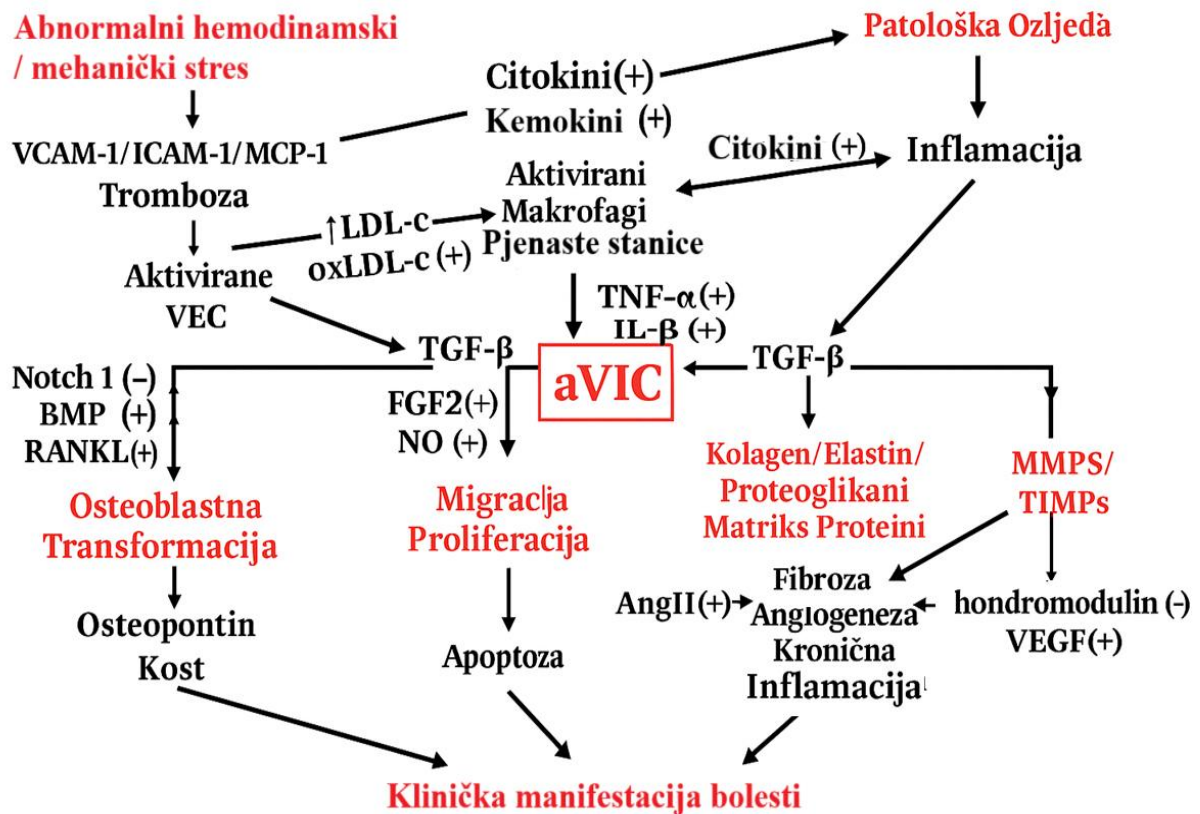
Zajedno, VEC i VIC stanice tvore dinamičan i međusobno povezan sustav koji održava biomehaničku i strukturnu ravnotežu aortalnog zaliska. Poremećaji u njihovoj komunikaciji, posredovani mehaničkim stresom, oksidativnim oštećenjem ili upalnim citokinima, dovode do aktivacije VIC stanica u miofibroblastni i osteoblastni fenotip, što predstavlja ranu fazu valvularne degeneracije i kalcifikacije (16, 69, 72).

Valvularne intersticijske stanice imaju sposobnost prijelaza iz mirujućeg fibroblastnog u aktivni miofibroblastni ili osteoblastni fenotip, što se odvija pod utjecajem mehaničkog stresa, oksidativnog oštećenja i protuupalnih citokina poput TNF- α , IL-6 i TGF- β (Slika 6 i Slika 7) (16, 64, 66, 69). Aktivirane stanice pokazuju povećanu ekspresiju α -glatkomišićnog aktina (α -SMA) i osteogenih markera kao što su Runx2, osteokalcin i osteopontin, što predstavlja ključni korak u nastanku valvularne kalcifikacije (16, 64, 66, 69, 73).

Karakteristike fenotipova VIC stanica prikazane su u Tablici 2.



Slika 6. Diferencijacija i funkcionalna stanja valvularnih intersticijskih stanica (VIC). Shema prikazuje razvojne i postrazvojne izvore valvularnih intersticijskih stanica (VIC) te njihovu diferencijaciju u različite fenotipske oblike. Embrionalne progenitorske stanice predstavljaju razvojno, a cirkulirajuće endotelne prekursorske stanice postrazvojno ishodište VIC stanica. U fiziološkim uvjetima, VIC stanice se nalaze u mirovanju (fibroblastima slične stanice; qVIC) i održavaju ravnotežu izvanstaničnog matriksa. Pod utjecajem signala iz okoliša (npr. TGF- β , mehanički stres), dolazi do njihove aktivacije i prijelaza u miofibroblastima sličan fenotip (aVIC), koji sudjeluje u remodeliranju, prilagodbi i razvoju bolesti. U patološkim uvjetima, daljnjom transformacijom nastaju osteoblastične VIC stanice (obVIC), koje posreduju u procesu kalcifikacije i razvoja valvularne bolesti. Proces obnavljanja ravnoteže omogućuje reverzibilnost između aktivnog i mirovanog fenotipa. Modificirano prema: Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:161–83. (64)



Slika 7. Signalni putevi i stanični mehanizmi aktivacije valvularnih intersticijskih stanica (aVIC) u razvoju bolesti aortalnog zaliska. Shema prikazuje međudjelovanje mehaničkih, upalnih i molekularnih mehanizama koji potiču aktivaciju valvularnih intersticijskih stanica (aVIC) i razvoj valvularne fibroze i kalcifikacije. Abnormalni hemodinamski i mehanički stres uzrokuje aktivaciju valvularnih endotelnih stanica (VEC) i pojačanu ekspresiju adhezijskih molekula (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1) te posljedičnu trombozu i upalu. Aktivirane VEC stanice povećavaju unos LDL i oksidiraniog LDL (oxLDL), čime stimuliraju makrofage i stvaranje pjenastih stanica, koje izlučuju citokine (TNF- α , IL- β) i TGF- β , potičući aktivaciju i proliferaciju aVIC stanica. Aktivirane aVIC stanice proizvode kolagen, elastin, proteoglikane i matriksne proteine, što dovodi do fibroze, angiogeneze i kronične upale, dok povećana aktivnost BMP i RANKL, uz smanjenu ekspresiju osteopontina, potiče osteoblastnu transformaciju i kalcifikaciju. Dugotrajna neravnoteža između metaloproteinaza matriksa (MMP) i njihovih inhibitora (TIMP) te aktivacija signalnih puteva AngII, VEGF i TGF- β rezultiraju strukturnim oštećenjem i kliničkom bolešću aortalnog zaliska. Kratice: VEC – valvularne endotelne stanice (valvular endothelial cells), VIC – valvularne intersticijske stanice (valvular interstitial cells), aVIC – aktivirane valvularne intersticijske stanice (activated valvular interstitial cells), VCAM-1 – vaskularna adhezijska molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1), MCP-1 – protein kemotaksije monocita 1 (monocyte chemoattractant protein 1), LDL-c – lipoprotein male gustoće, kolesterol (low-density lipoprotein cholesterol), oxLDL – oksidirani LDL (oxidized low-density lipoprotein), TGF- β – transformirajući čimbenik rasta beta (transforming growth factor beta), TNF- α – tumorski nekrotični čimbenik alfa (tumor necrosis factor alpha), IL- β – interleukin beta (interleukin beta), BMP – koštani morfogenetSKI protein (bone morphogenetic protein), FGF2 – fibroblastni čimbenik rasta 2 (fibroblast growth factor 2), NO – dušikov oksid (nitric oxide), RANKL – ligand receptora aktivatora nuklearnog faktora kappa-B (receptor activator of nuclear factor κ B ligand), MMPs – metaloproteinaze matriksa (matrix metalloproteinases), TIMPs – tkivni inhibitori metaloproteinaza (tissue inhibitors of metalloproteinases), VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (vascular endothelial growth factor), AngII – angiotenzin II (angiotensin II), ECM – izvanstanični matriks (extracellular matrix). Modificirano prema: Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1407–18. (17)

Tablica 2. Karakteristike fenotipova valvularnih intersticijskih stanica (VIC)

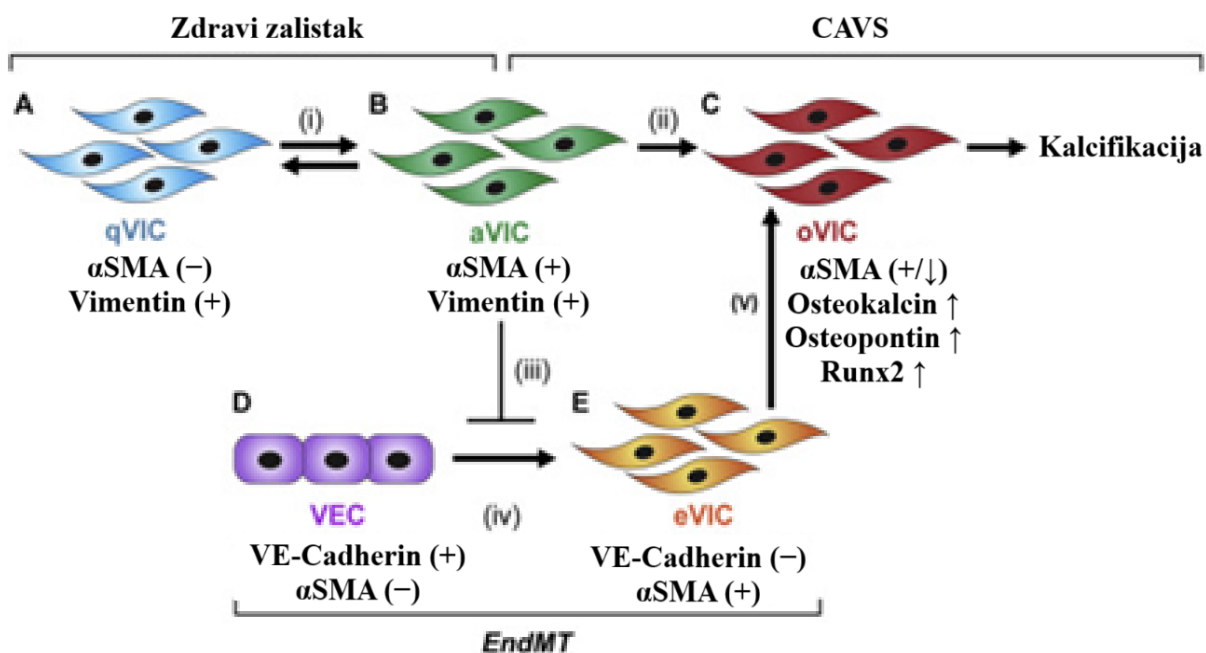
Tip stanice	Lokalizacija	Funkcija
eVIC	Embrionalni srčani jastučići	Predstavljaju razvojni izvor rezidentnih qVIC stanica, vjerojatno kroz fazu aktivacije; proces epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) može se detektirati gubitkom endotelnih i stjecanjem mezenhimalnih biljega.
qVIC	Listići srčanog zaliska	Održavaju fiziološku i normalnu strukturu te funkciju zaliska i sprječavaju angiogenezu unutar listića.
pVIC	Koštana srž, cirkulacija i/ili listići srčanog zaliska	Ulaze u zalistak ili su prisutne unutar njega kako bi osigurale aVIC stanice potrebne za popravak oštećenja; mogu iskazivati biljege CD34, CD133 i/ili S100 .
aVIC	Listići srčanog zaliska	Sadrže α-SMA i uključene su u aktivne stanične procese popravka, uključujući proliferaciju, migraciju i remodeliranje matriksa; reagiraju na oštećenje uzrokovano patološkim stanjima i poremećenim hemodinamskim ili mehaničkim silama.
obVIC	Listići srčanog zaliska	Posreduju u procesima kalcifikacije, hondrogeneze i osteogeneze unutar zaliska; izlučuju alkalnu fosfatazu, osteokalcin, osteopontin i koštani sialoprotein .

Napomena: CD34 i CD133 su biljezi matičnih stanica; S100 je intracelularni protein koji veže kalcij. Modificirano prema: Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. Circulation. 2008;118(18):1864–80.(65)

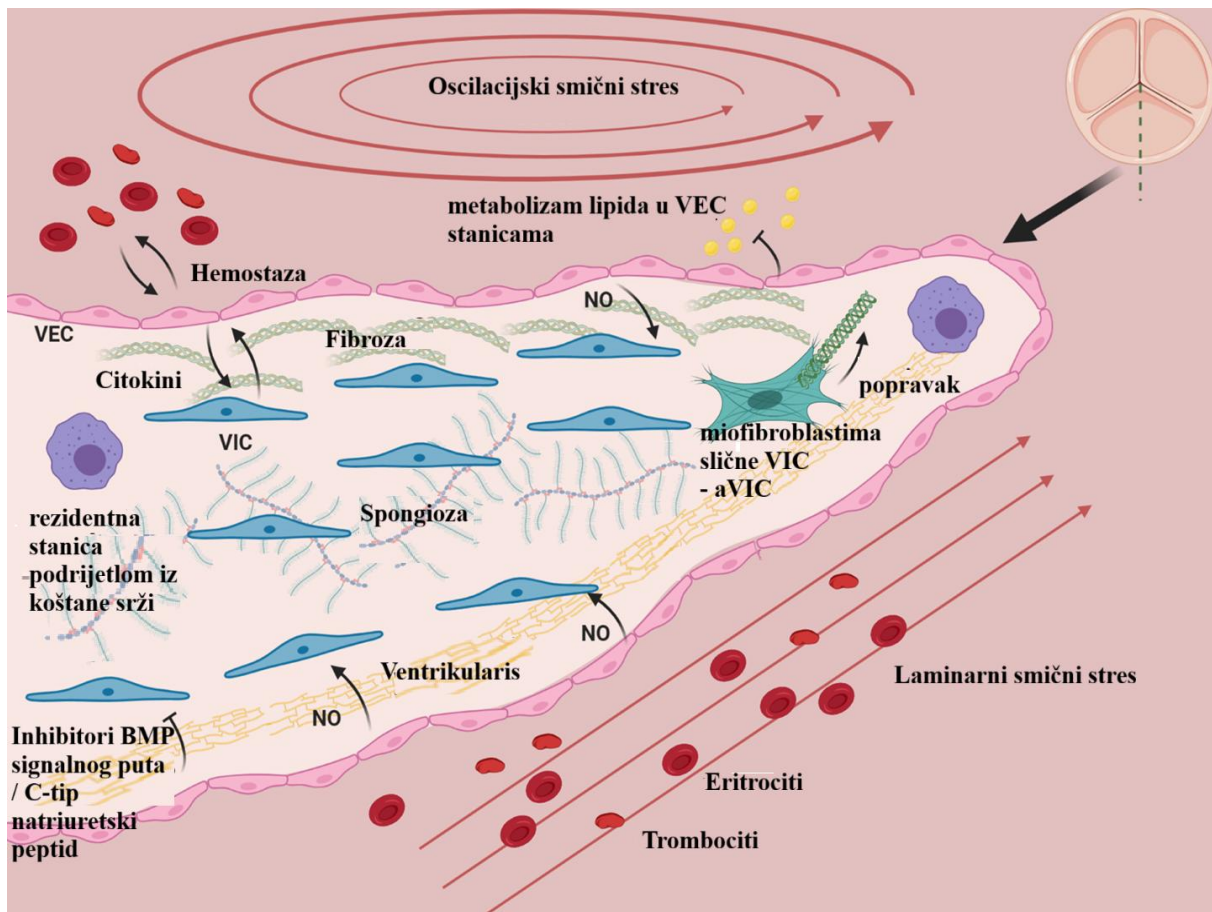
Osim promjena unutar samih VIC stanica, važnu ulogu ima i međustanična komunikacija s endotelom zaliska, gdje VEC stanice mogu prolaziti kroz endotelno-mezenhimalnu tranziciju (EndMT) te time doprinijeti povećanju broja aktivnih stanica unutar valvularnog tkiva (Slika 8) (72, 74).

Ti procesi povezani su s aktivacijom više signalnih mreža, među kojima su TGF- β /SMAD, BMP, Wnt/ β -katenin, i Notch signalni putovi, koji zajedno reguliraju diferencijaciju, remodeliranje ECM-a i razvoj kalcifikacijskih žarišta (16, 69, 74).

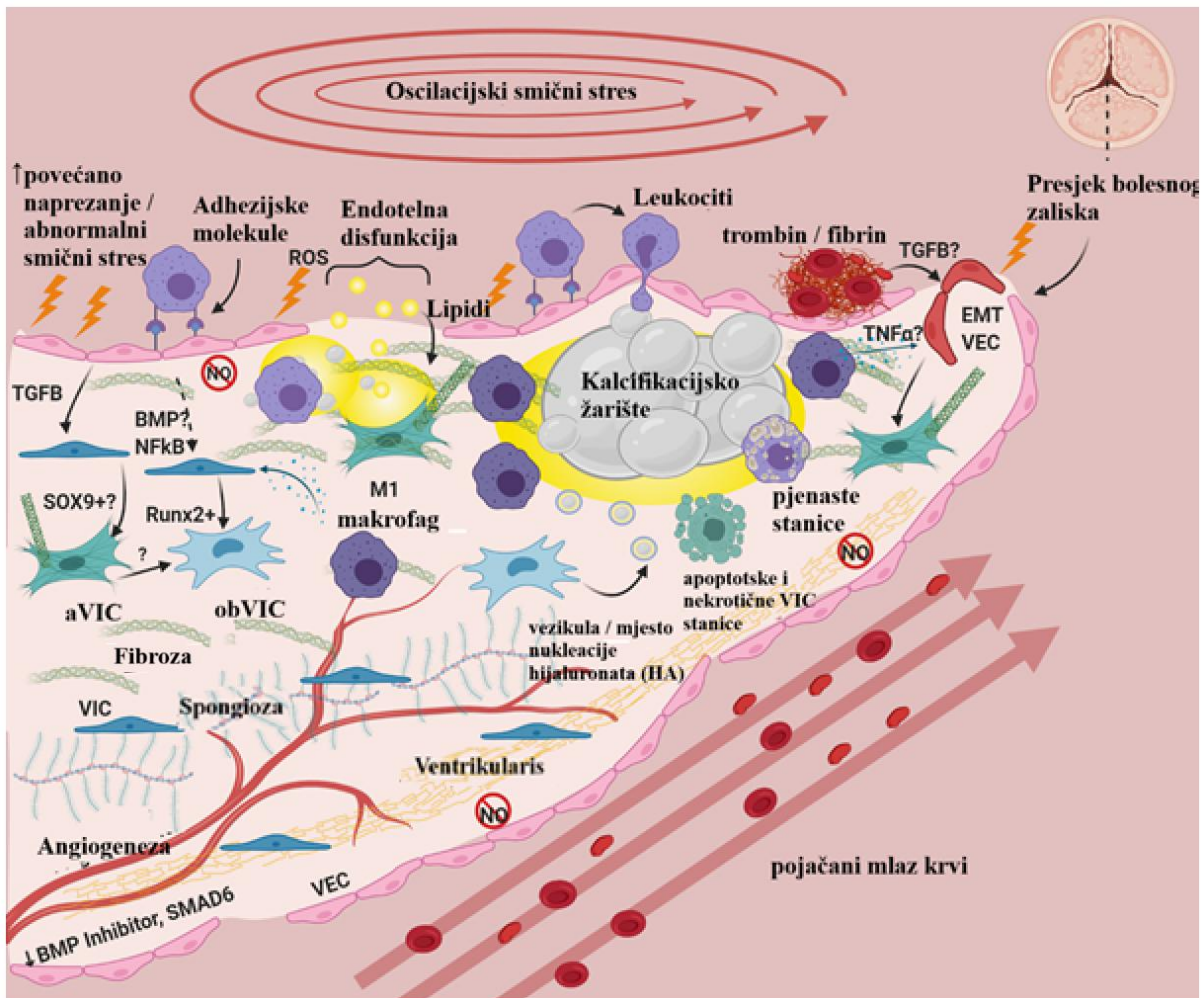
Neke od uloga VEC i VIC stanica u zdravom i patološki promijenjenom aortalnom zalistku uslijed kalcifikacije prikazane su na Slici 9 i Slici 10.



Slika 8. Fenotipska tranzicija valvularnih stanica tijekom fiziološke homeostaze i kalcificirajuće bolesti aortalnog zaliska (CAVS). Shema prikazuje različite fenotipove valvularnih intersticijskih (VIC) i valvularnih endotelnih stanica (VEC) te njihove prijelaze u fiziološkim i patološkim uvjetima. (A) U zdravom zalisku prevladavaju mirujuće VIC stanice (qVIC) koje eksprimiraju vimentin, održavaju homeostazu izvanstaničnog matriksa i strukturalni integritet zaliska. (B) Pod utjecajem mehaničkog stresa ili upalnih podražaja, qVIC se reverzibilno aktiviraju u miofibroblastne aVIC stanice, koje eksprimiraju α -SMA i sudjeluju u reparativnom remodeliranju. (C) Tijekom kalcificirajuće bolesti (CAVD), dio aVIC diferencira u osteoblastima slične stanice (oVIC) koje eksprimiraju osteogene markere (osteokalcin, osteopontin, Runx2) te potiču nastanak kalcifikata. (D) Zdrave VEC stanice eksprimiraju VE-kadherin i inhibiraju EndMT proces te aktivaciju VIC stanica, dok (E) pod utjecajem upalnih i mehaničkih čimbenika mogu proći endotelno-mezenhimsku tranziciju (EndMT) u eVIC stanice, koje gube VE-kadherin, stječu α -SMA i potiču osteogenu diferencijaciju okolnih VIC-eva. Strelice (i)–(v) prikazuju smjer mogućih prijelaza između fenotipova: (i) reverzibilna tranzicija qVIC \leftrightarrow aVIC; (ii) diferencijacija aVIC \rightarrow oVIC; (iii) inhibicijski učinak zdravih VEC na EndMT; (iv) transformacija VEC \rightarrow eVIC; (v) stimulacija osteogene diferencijacije djelovanjem eVIC. Kratice: AVS – aortalna stenoz; CAVS – kalcificirajuća aortalna stenoz; VIC – valvularne intersticijske stanice; qVIC – mirujuće VIC; aVIC – aktivirane VIC; oVIC – osteoblast-slične VIC; VEC – valvularne endotelne stanice; eVIC – endotelno-porijeklom VIC; α -SMA – alfa-aktin glatkih mišića; VE-kadherin – vaskularni endotelni kadherin; Runx2 – runt-srodni transkripcijski faktor 2; EndMT – endotelno-mezenhimalna tranzicija. Modificirano prema: Hjortnaes J, Shapero K, Goettsch C, Hutcheson JD, Keegan J, Kluin J, i sur. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2015;242(1):251–60. (72)



Slika 9. Uloga valvularnih endotelnih (VEC) i intersticijskih (VIC) stanica u održavanju strukture i homeostaze zdravog aortalnog zaliska. Shema prikazuje međudjelovanje VEC i VIC stanica unutar histoloških slojeva aortalnog listića (fibroze, spongioze i ventrikularisa) te mehaničke i biokemijske sile koje održavaju valvularnu homeostazu. Površine listića izložene su različitim oblicima smičnih sila – laminarnom stresu s ventrikularne strane i oscilacijskom stresu s aortalne strane – koji utječu na orijentaciju, funkciju i metabolizam VEC stanica. VEC stanice reguliraju hemostazu, propusnost endotela, metabolizam lipida te parakrinu signalizaciju prema dublje smještenim VIC stanicama putem citokina i dušikovog oksida (NO). NO ima ključnu ulogu u inhibiciji aktivacije VIC stanica, sprječavanju njihove miofibroblastne transformacije i kalcifikacije, osobito na ventrikularnoj strani zaliska, gdje je njegova ekspresija viša. Unutar matriksa, VIC stanice održavaju ravnotežu između sinteze i razgradnje komponenata izvanstaničnog matriksa (ECM), dok rezidentne stanice podrijetlom iz koštane srži i miofibroblastne VIC stanice sudjeluju u popravku tkiva nakon oštećenja. Inhibitori BMP signalnog puta i C-tip natriuretski peptid (CNP) dodatno doprinose zaštiti ventrikularne strane zaliska od fibrotičnih i kalcifikacijskih promjena. Ova kompleksna mreža mehaničkih sila, biokemijskih medijatora i staničnih interakcija održava strukturni integritet i funkcionalnu elastičnost aortalnog zaliska u fiziološkim uvjetima. Modificirano prema: Driscoll K, Cruz AD, Butcher JT. Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease. *Circ Res.* 2021;128(9):1344–70. (69)

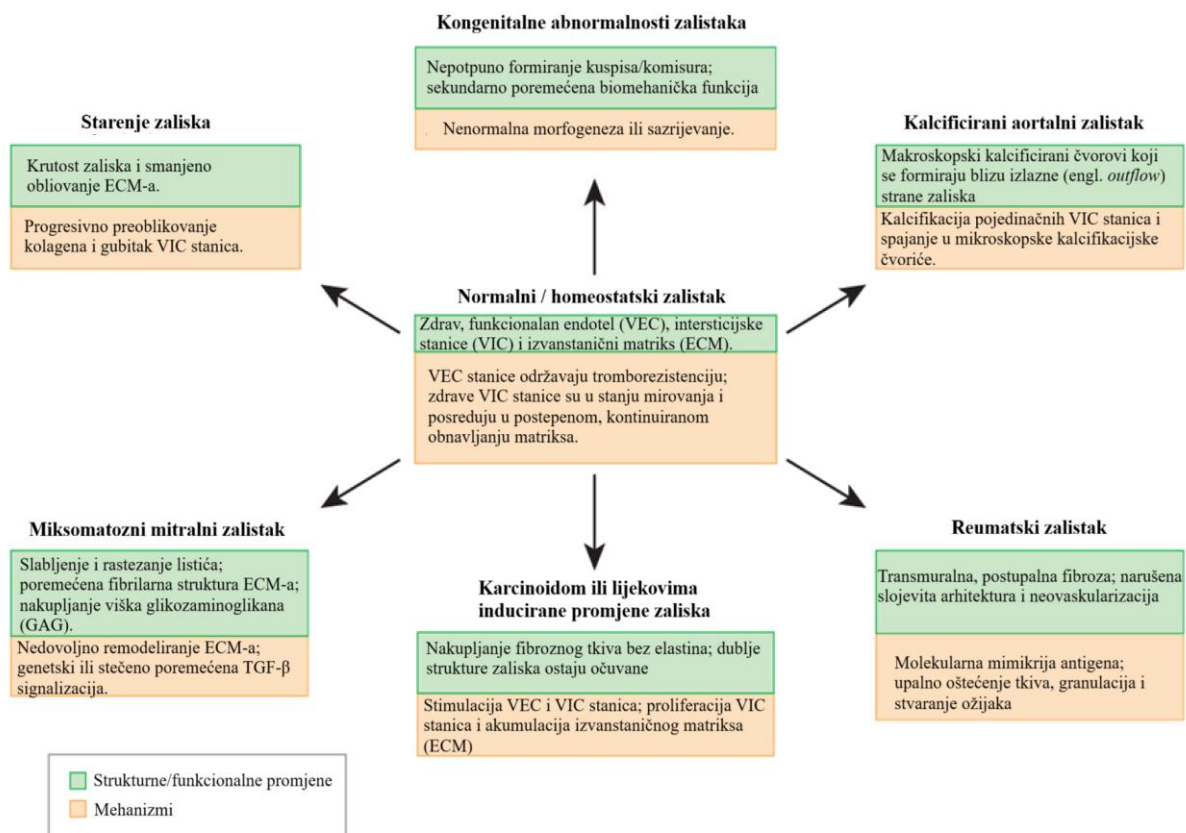


Slika 10. Patološki mehanizmi i stanične interakcije u razvoju kalcificirane aortalne stenozе (CAVS). Shema prikazuje ključne mehaničke, upalne i stanične procese uključene u nastanak i progresiju kalcifikacije aortalnog zaliska. Na površini zaliska, izloženoj oscilacijskim smičnim silama, dolazi do povećanog naprezanja, aktivacije adhezijskih molekula i disfunkcije endotela (VEC), što rezultira nakupljanjem lipida i stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Oštećene VEC stanice oslobađaju citokine te omogućuju infiltraciju leukocita i M1 makrofaga, koji potiču lokalnu upalu i stvaranje pjenastih stanica. Posljedično se aktiviraju valvularne intersticijske stanice (VIC), koje pod utjecajem signalnih puteva TGF- β , BMP i NF κ B te transkripcijskih čimbenika Runx2 i SOX9 prelaze u miofibroblastni (aVIC) i osteoblastni (obVIC) fenotip. Ove stanice potiču sintezu kolagena, mineralizaciju matriksa i formiranje kalcifikacijskih žarišta, što dovodi do zadebljanja i ukočenosti listića. U središtu lezije nalaze se apoptotske i nekrotične VIC stanice te vezikule s hijaluronatom (HA) koje djeluju kao mjesta nukleacije. Smanjena ekspresija inhibitora BMP puta i SMAD6 te smanjena proizvodnja dušikovog oksida (NO) narušavaju zaštitne mehanizme i ubrzavaju degeneraciju. Ventrikularna strana, izložena laminarnom smičnom stresu i pojačanom mlazu krvi, zadržava višu razinu NO signalizacije i anti-kalcifikacijskih medijatora, što objašnjava njezinu veću otpornost na oštećenje. Kratice: VEC – valvularne endotelne stanice (valvular endothelial cells); VIC – valvularne intersticijske stanice (valvular interstitial cells); aVIC – aktivirane miofibroblastne VIC stanice (activated myofibroblast VICs); obVIC – osteoblastima slične VIC stanice (osteoblastic VICs); NO – dušikov oksid (nitric oxide); ROS – reaktivne kisikove vrste (reactive oxygen species); TGF- β – transformirajući čimbenik rasta beta (transforming growth factor beta); BMP – kostni morfogenetski protein (bone morphogenetic protein); NF κ B – nuklearni čimbenik kapa B (nuclear factor kappa B); SOX9 – transkripcijski faktor SOX9 (SRY-box 9); Runx2 – runt-srodni transkripcijski faktor 2 (runt-related transcription factor 2); TNF- α – tumorski nekrotični čimbenik alfa (tumor necrosis factor alpha); EMT – epitelno-mezehimalna tranzicija (epithelial-to-mesenchymal transition); HA – hijaluronska kiselina (hyaluronic acid); SMAD6 – signalni posrednik SMAD6 (SMAD family member 6); CAVD – kalcificirana aortalna valvularna bolest (calcific aortic valve disease). Modificirano prema: Driscoll K, Cruz AD, Butcher JT. Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease. *Circ Res.* 2021;128(9):1344–70. (69)

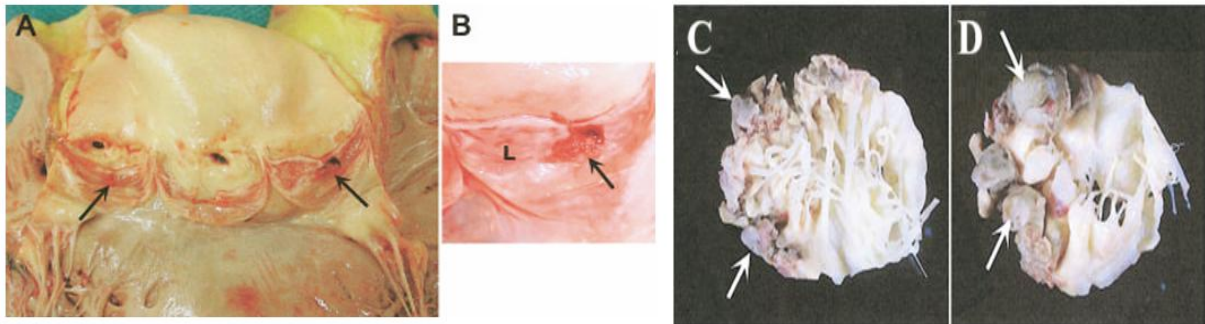
2.3. Bolesti aortalnog zaliska

Bolesti aortalnog zaliska predstavljaju heterogenu skupinu stečenih i kongenitalnih poremećaja koji narušavaju normalnu funkciju otvaranja i zatvaranja zaliska, uzrokujući hemodinamske promjene i opterećenje lijeve klijetke. Klinički se manifestiraju kao aortalna stenoza (AS), aortalna regurgitacija (AR) ili njihova kombinacija, dok u podlozi mogu biti degenerativni, upalni, reumatski, infektivni ili kongenitalni procesi.

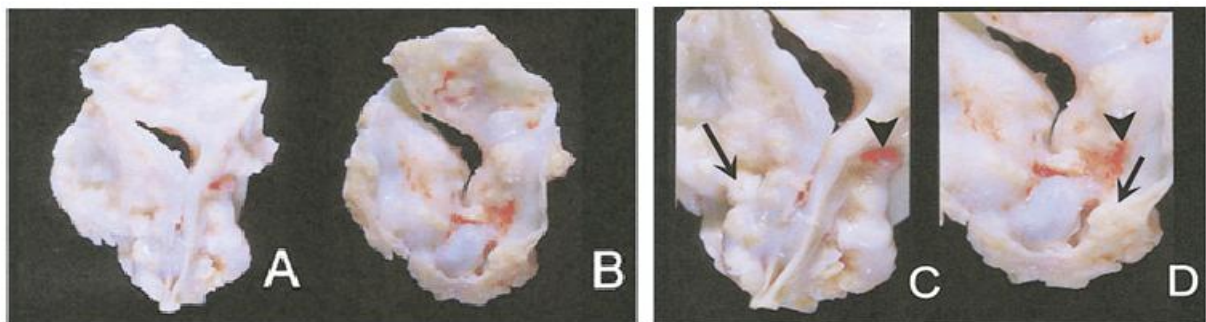
Najčešći mehanizmi koji stoje u pozadini bolesti srčanih zalistaka uključujući i aortalni zalistak srca i primjeri navedenih oboljenja prikazani su na Slicici 11, 12, 13 i 14.



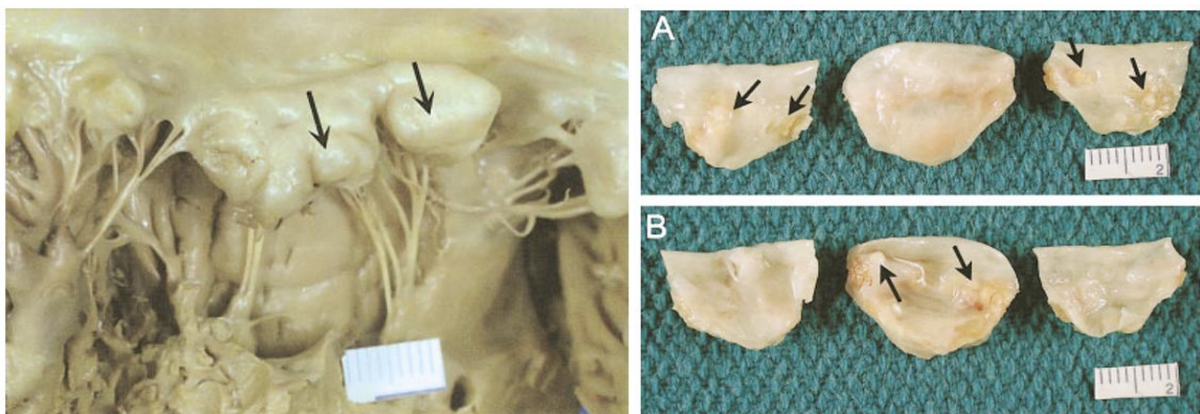
Slika 11. Strukturne i mehanističke promjene kod kongenitalnih, degenerativnih i stečenih bolesti srčanih zalistaka. Shema prikazuje osnovne strukturne i funkcionalne promjene te patofiziološke mehanizme u različitim oblicima bolesti srčanih zalistaka u usporedbi s normalnim (homeostatskim) zaliskom. U zdravom zalisku valvularne endotelne (VEC) i intersticijske stanice (VIC) održavaju tromborezistenciju, elastičnost i stabilnost izvanstaničnog matriksa (ECM). Kod kongenitalnih abnormalnosti, defektno formiranje kuspisa i komisura uzrokuje biomehaničku nestabilnost, dok kod kalcificiranog aortalnog zaliska dolazi do odlaganja kalcija u pojedinačne VIC stanice i stvaranja makroskopskih kalcifikacijskih čvorova. Reumatske promjene obilježene su transmurálnom fibrozom, disrupcijom slojevite arhitekture i upalnim ožiljkavanjem, dok miksomatozne promjene uključuju slabljenje i rastezanje listića s nakupljanjem glikozaminoglikana (GAG) i poremećenim remodeliranjem ECM-a. Kod starenja zaliska dominiraju ukočenje i gubitak VIC stanica, a karcinoidom ili lijekovima inducirane lezije uzrokuju nakupljanje fibroznog tkiva i proliferaciju VIC stanica bez oštećenja dubljih slojeva. Zajedno, ovi procesi odražavaju raznolike patološke puteve koji vode od homeostatskog zaliska prema degenerativnim, upalnim i fibrotičnim promjenama koje kompromitiraju njegovu funkciju. Modificirano prema: Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:161–83.(64)



Slika 12. Makroskopski izgled nebakterijskog trombotičkog endokarditisa (NBTE) pronađenog na obdukciji 58-godišnjeg muškarca (lijevo) i infektivnog endokarditisa mitralnog zaliska uklonjenog kirurškim zahvatom kod 63-godišnjeg muškarca (desno). (A) Trombotične mase lokalizirane su fokalno na sva tri listića aortalnog zaliska, na strani izložene protoku krvi (središnji listić djelomično je uklonjen radi histološke analize). (B) Uvećani prikaz tromba na nekronarnom listiću (L – listić). (C) Površina zaliska suprotna od protoka krvi (ne-flow strana). (D) Površina izložena protoku krvi (flow strana). Strelice označavaju trombotične naslage s adheriranim infektivnim materijalom na površini zaliska. Modificirano prema: Leask RL, Jain N, Butany J. *Endothelium and valvular diseases of the heart. Microsc Res Tech.* 2003;60(2):129–37. (62)



Slika 13. Makroskopski izgled reumatskog aortalnog zaliska uklonjenog kirurškim zahvatom kod 71-godišnjeg muškarca. (A) Površina zaliska suprotna od protoka krvi (ne-flow strana). (B) Površina izložena protoku krvi (flow strana). (C) Uvećani prikaz ne-flow površine. (D) Uvećani prikaz flow površine. Strelica označava kalcificiranu leziju, a vrh strelice trombotične naslage. Modificirano prema: Leask RL, Jain N, Butany J. *Endothelium and valvular diseases of the heart. Microsc Res Tech.* 2003;60(2):129–37. (62)



Slika 14. Makroskopski izgled labavog (miksomatozno promijenjenog) trikuspidalnog zaliska 62-godišnjeg muškarca (lijevo) i triju listića senilnog aortalnog zaliska uklonjenog kirurškim zahvatom. Zamjena sloja fibroze miksomatoznim tkivom uzrokuje uvećanje i „ispupčenje” (billowing, hooding) listića zaliska (označeno strelicama). (A) Površina listića zaliska s ventrikularne (protoku krvi izložene) strane. (B) Površina s aortalne (ne-flow) strane. Na obje površine vidljiva su nodularna kalcificirana zadebljanja (strelice) te nakupljanje lipida unutar tkiva. Modificirano prema: Leask RL, Jain N, Butany J. *Endothelium and valvular diseases of the heart. Microsc Res Tech.* 2003;60(2):129–37. (62)

2.3.2. Aortalna stenoza

Aortalna stenoza (AVS; engl. aortic valve stenosis) predstavlja najčešću stečenu bolest srčanih zalistaka u odrasloj populaciji razvijenih zemalja te vodeći uzrok kirurške (SAVR; engl. surgical aortic valve replacement) i transkateterske zamjene aortalnog zaliska (TAVR/TAVI; engl. transcatheter aortic valve replacement/implantation) (75, 76).

Učestalost bolesti značajno raste s dobi – blaži oblici aortalne stenozе prisutni su u približno 2–4 % osoba starijih od 65 godina, dok se teški oblici javljaju u 3–5 % populacije starije od 75 godina (5, 10, 24, 77).

Zbog produljenja životnog vijeka i starenja populacije, aortalna stenoza sve više pridonosi globalnom opterećenju kardiovaskularnih bolesti, čime poprima obilježja važnog javnozdravstvenog problema (4, 5).

Bolest se razvija kao kronični, progresivni fibro-kalcifikacijski proces, koji dovodi do postupnog suženja aortalnog ušća, povećanja transvalvularnog gradijenta i hemodinamskog preopterećenja lijeve klijetke.

Za razliku od ranijih shvaćanja prema kojima je riječ o pasivnom “istrošivanju” tkiva (engl. *wear and tear*), danas se zna da patogenezu obilježava aktivno reguliran, multifaktorijski proces u kojem sudjeluju:

- hemodinamske sile i mehanički stres,
- disfunkcija valvularnih endotelnih stanica i njihova endotelno-mezenhimska transformacija ,
- upalni i oksidativni mehanizmi,
- nakupljanje lipoproteina, osobito LDL i lipoproteina(a) [Lp(a)],
- remodeliranje izvanstaničnog matriksa ,
- te osteogena aktivacija valvularnih intersticijskih stanica (4, 15, 22, 78).

Patološke promjene dominantno zahvaćaju hemodinamski opterećenu (fibrotičnu) stranu listića, gdje dolazi do progresivne kalcifikacije, gubitka elastičnosti i smanjene pokretljivosti zaliska, što u konačnici dovodi do mehaničke rigidnosti i značajnog funkcionalnog suženja aortnog ušća.

U ranoj fazi bolesti pojavljuje se aortalna skleroza (AVSc; engl. *aortic valve sclerosis*), koju obilježavaju zadebljanje i početne degenerativne promjene listića aortalnog zaliska, pri čemu još nema značajnijeg hemodinamskog suženja ni povećanja gradijenata (3, 11, 15, 22, 24, 79, 80).

Kako proces napreduje, dolazi do postupnog razvoja aortalne stenoze, uz izraženiju kalcifikaciju, smanjenu pokretljivost listića i progresivno povećanje opstrukcije na izlazu iz lijeve klijetke (3, 11, 15, 22, 24, 79, 80).

Kao kompenzatorni odgovor na kronično tlačno opterećenje, u miokardu se razvija koncentrična hipertrofija lijeve klijetke, koja u kasnijim fazama prelazi u sistoličku i dijastoličku disfunkciju, s posljedičnim zatajenjem srca (HF; engl. *heart failure*) i smanjenjem ejekeijske frakcije.

Pojavnost aortalne skleroze usko je povezana s klasičnim čimbenicima kardiovaskularnog rizika, među kojima se ističu starija dob, muški spol, povećan indeks tjelesne mase, arterijska hipertenzija, dislipidemija — osobito povišene vrijednosti LDL i lipoproteina(a) — te pušenje i niži tjelesni rast.

Brojna prospektivna istraživanja i meta-analize potvrdila su da AVSc djeluje kao neovisan i progresivan marker kardiovaskularnog rizika, povezan s većom učestalošću koronarne bolesti, infarkta miokarda te povećanom kardiovaskularnom i ukupnom smrtnošću (21, 81-85).

2.3.3. Etiologija aortalne stenozе

U suvremenoj kliničkoj praksi najveći udio slučajeva aortalne stenozе čini degenerativna (senilna) kalcificirajuća aortalna stenozа (CAVS), koja nastaje kao posljedica postupnog fibro-kalcifikacijskog remodeliranja listića i gubitka njihove elastičnosti u starijoj životnoj dobi. Riječ je o aktivnom, biološki reguliranom procesu, koji dijelom odražava i kumulativni učinak mehaničkog stresa, oksidativnog oštećenja i metaboličkih poremećaja povezanih sa starenjem (3, 7, 11, 13, 15, 22, 24, 78, 80, 82, 86, 87).

Drugi po učestalosti uzrok jest kalcifikacija kongenitalno deformiranih zalistaka, osobito bikuspidalnog aortalnog zaliska (BAV; engl. *bicuspid aortic valve*) (6, 24, 79, 88-91). BAV je najčešća prirođena srčana anomalija, prisutna u oko 0,5–2 % populacije, a zbog abnormalnog protoka krvi i povezane valvularno-aortopatijske predispozicije uzrokuje raniji nastanak fibroze, upale i kalcifikacije u odnosu na osobe s trikuspidalnim zaliscima (6, 24, 79, 88-91). Kao posljedica toga, bikuspidalna aortalna stenozа (BAVS; engl. *bicuspid aortic valve stenosis*) često se klinički manifestira dvadesetak godina ranije od degenerativne CAVS (6, 24, 79, 88-94).

Povijesno, reumatski valvulitis bio je dominantan uzrok aortalne stenozе, obilježen spajanjem komisura, zadebljanjem listića i sekundarnom kalcifikacijom.

Iako se u razvijenim zemljama takvi slučajevi danas javljaju rijetko, u zemljama s nižim prihodima i ograničenim pristupom zdravstvenoj skrbi reumatska etiologija i dalje predstavlja značajan javnozdravstveni problem (2, 5, 6).

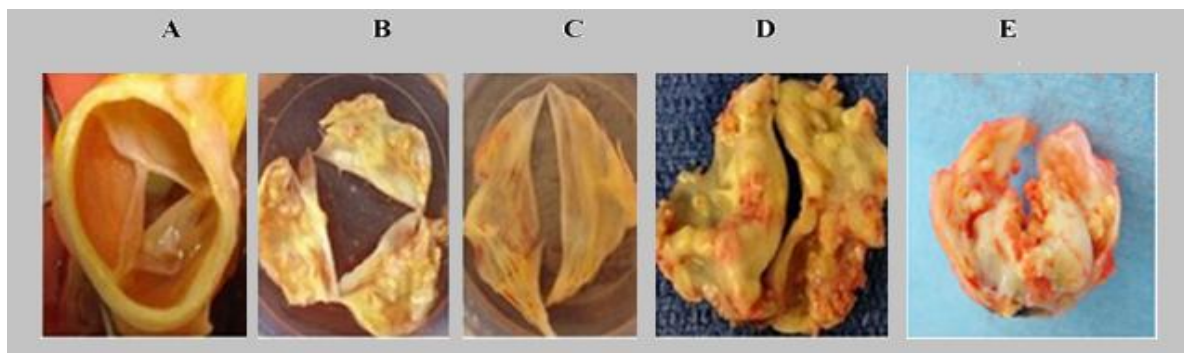
Bez obzira na uzrok, sve tri glavne etiološke skupine – degenerativna (CAVS), bikuspidalna (BAVS) i postreumatska bolest – konvergiraju prema zajedničkim patobiološkim mehanizmima: endotelnoj disfunkciji, upalnoj aktivaciji, nakupljanju lipida i osteogenoj diferencijaciji valvularnih intersticijskih stanica.

Krajnji rezultat tih procesa jest nakupljanje kalcifikata, zadebljanje i ukočenost listića te smanjena pokretljivost zaliska, što dovodi do klinički značajne hemodinamske opstrukcije.

Rjeđi oblici aortalne stenozе (<1 %) uzrokovani su rijetkim kongenitalnim malformacijama građe zaliska, uključujući unikuspidalni (≈0,02 % odrasle populacije) i kvadrikuspidalni zalistak (0,008–0,033 % opće populacije) (Slika 15) (95-99).

Zaključno, degenerativna CAVS najčešće se javlja u starijoj populaciji i povezana je s metaboličkim i aterosklerotskim čimbenicima rizika, dok je bikuspidalna stenozа (BAVS) tipično prisutna u mlađih bolesnika, kod kojih anatomska deformacija i promijenjena hemodinamika ubrzavaju tijekom bolesti (100).

Reumatski i kongenitalni oblici, iako rjeđi u razvijenom svijetu, i dalje imaju važan udio u globalnom opterećenju valvularnim bolestima te zahtijevaju diferenciran klinički pristup.



Slika 15. Etiološki oblici aortalne stenozе (AVS). (A) Prikaz normalnog trikuspidalnog aortalnog zaliska s očuvanom arhitekturom listića i pravilnom koaptacijom. (B) Degenerativno promijenjen trikuspidalni zalistak s izraženim kalcifikacijskim naslagama karakterističnim za kalcificirajuću aortalnu stenozu (CAVS; engl. calcific aortic valve stenosis). (C) Kongenitalni bikuspidalni zalistak (BAV) s fuzijom komisura i nepravilnim odnosom listića. (D) Uznapredovali oblik kalcificirane bikuspidalne aortalne stenozе (BAVS; engl. bicuspid aortic valve stenosis) s masivnim kalcifikacijama duž linije spajanja listića. (E) Kalcifikacija unikuspidalnog aortalnog zaliska, rijetke kongenitalne anomalije koja može imitirati bikuspidalni morfotip na slikovnim prikazima. Prilagođeno prema izvorima: Aggarwal A, Ferrari G, Joyce E, Daniels MJ, Sainger R, Gorman JH 3rd, i sur. Architectural trends in the human normal and bicuspid aortic valve leaflet and its relevance to valve disease. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(5):986–98 (87); Saito Y, Takaoka H, Funabashi N, Ozawa K, Tamura Y, Saito M, i sur. A case of very severe aortic stenosis due to unicuspid aortic valve mimicking bicuspid aortic valve with calcification on cardiac computed tomography. *Int J Cardiol.* 2016;215:516–8 (98); Konstantinov IE, Moscoco B, Ishigami S, Zubritskiy A, Marliau R. Aortic valve repair in a low-birth-weight neonate with poor ventricular function: staged tricuspization of the unicuspid valve. *Multimed Man Cardiothorac Surg.* 2023;2023 (99)

2.3.4. Kalcificirajuća stenoza aortalnih zalistaka

Kalcificirajuća stenoza aortalnog zaliska (CAVS) predstavlja kroničnu, progresivnu i biološki aktivnu bolest koja dovodi do odlaganja kalcijevih soli, fibroze i zadebljanja valvularnih listića, čime se postupno ograničava njihova pokretljivost i stvara mehanička opstrukcija izlaznog trakta lijeve klijetke (3, 7, 11, 13, 15, 22, 24, 78, 80, 82, 86).

Iako se nekoć smatrala pasivnom degenerativnom posljedicom starenja tkiva, danas je jasno da se radi o aktivno reguliranom patološkom procesu, u kojem ključnu ulogu imaju upalni, oksidativni i mezenhimalni mehanizmi, kao i osteogena diferencijacija valvularnih intersticijskih stanica. Ti su procesi u velikoj mjeri analogni aterosklerotskom remodeliranju krvnih žila, sličnog upalno-lipidnog karaktera (3, 7, 11, 13, 15, 22, 24, 78, 80, 82, 86).

S progresijom bolesti dolazi do postupnog nakupljanja kalcija i fibrozne zadebljanosti listića, što uzrokuje teškoće u otvaranju zaliska, povećava transvalvularni gradijent i rezultira značajnim hemodinamskim poremećajima. U završnim stadijima razvija se teška kalcificirana aortalna stenoza, koja danas predstavlja najčešću valvularnu bolest u starijoj populaciji (3, 7, 11, 13, 15, 22, 24, 78, 80, 82, 86).

2.3.4.1. Proaterogeni čimbenici rizika

Kao što je već istaknuto, napredovanje aortalne skleroze (AVSc) i aortalne stenoze (AVS) u velikoj je mjeri povezano s prisutnošću aterogenih čimbenika rizika. Najznačajniji među njima uključuju stariju životnu dob, muški spol, niži rast, arterijsku hipertenziju, povišene razine lipoproteina(a) i lipoproteina niske gustoće (LDL, *low-density lipoprotein*), povišeni kolesterol te pušenje (82, 83, 101).

Uz navedene, u razvoj AVS-a mogu biti uključeni i drugi metabolički i sustavni poremećaji, poput šećerne bolesti, pretilosti (visok indeks tjelesne mase – BMI, *body mass index*), koronarne ateroskleroze (CAD, *coronary artery disease*), metaboličkog sindroma i hiperuricemije.

Dodatni čimbenici rizika uključuju povećani omjer apoB/apoA-I, kroničnu bubrežnu insuficijenciju, sekundarnu hiperparatireozu, Pagetovu bolest, poremećaje remodeliranja kostiju i smanjenu mineralnu gustoću, kao i neravnotežu kalcija i fosfata te promjene koncentracije serumskog kreatinina (9, 82, 83, 102-122).

Ukupni rizik za razvoj i napredovanje AVS-a rezultat je kompleksne interakcije između genetske predispozicije, upalnih i hemodinamskih podražaja te prisutnih komorbiditeta (82).

2.3.4.2. Genetska predispozicija za razvoj CAVS-a

Sve veći broj istraživanja potvrđuje da genetski čimbenici imaju važnu ulogu u razvoju kalcificirajuće stenozе aortalnih zalistaka. U pacijenata s AVS-om opisani su brojni polimorfizmi i mutacije koji mogu utjecati na regulaciju upale, metabolizam lipida, mineralizaciju i proliferaciju stanica.

Među njima se ističu:

- polimorfizmi VDR gena za receptor vitamina D (BsmI B/b),
- promjene u promotorskoj regiji gena za interleukin 10 (IL10) (-1082, -819, -592),
- polimorfizam u promotorskoj regiji gena CTGF/CCN2 (faktor rasta vezivnog tkiva, *connective tissue growth factor / cellular communication network factor 2*),
- PvuII polimorfizam gena ER α /ESR1 (estrogenski receptor alfa),
- AocI polimorfizam u genu TGF β 1 (transformirajući čimbenik rasta beta 1),
- XbaI polimorfizam u genu APOB (apolipoprotein B),
- polimorfizmi gena APOAI i APOE (posebno varijante *apoE2* i *apoE4*),
- prevalencija AA genotipa u genu za paratiroidni hormon (PTH),
- mutacije u genu NOTCH1 (R1108X, H1505del, p.T596M, p.P1797H),
- 32-bp delecija u genu CCR5 (*C-C motif chemokine receptor 5*),
- rs1205 C>T polimorfizam u genu CRP (*C-reactive protein*),
- te smanjena ekspresija regulatornih gena staničnog ciklusa p21WAF1/CIP1 i 14-3-3 σ (110, 123-146).

Od navedenih promjena, najdosljednije su potvrđene asocijacije između AVS-a i polimorfizama u genima apoB (XbaI, rs1042031, rs6725189), ACE (rs4340), IL10 (rs1800896, rs1800872) te LPA (rs10455872) – za koje postoji snažna razina dokaza.

Umjerena povezanost s bolešću utvrđena je za PvuII polimorfizam ER α /ESR1 gena, rs1042636 polimorfizam CaSR gena, nekoliko polimorfizama unutar IL10 gena (rs3024491, rs3021094, rs1554286, rs3024498), rs662 polimorfizam PON1 gena, rs2276288 u genu MYO7A, rs5194 u genu AGTR1, rs2071307 u genu ELN, te rs17659543 i rs13415097 unutar IL1F9 gena (128).

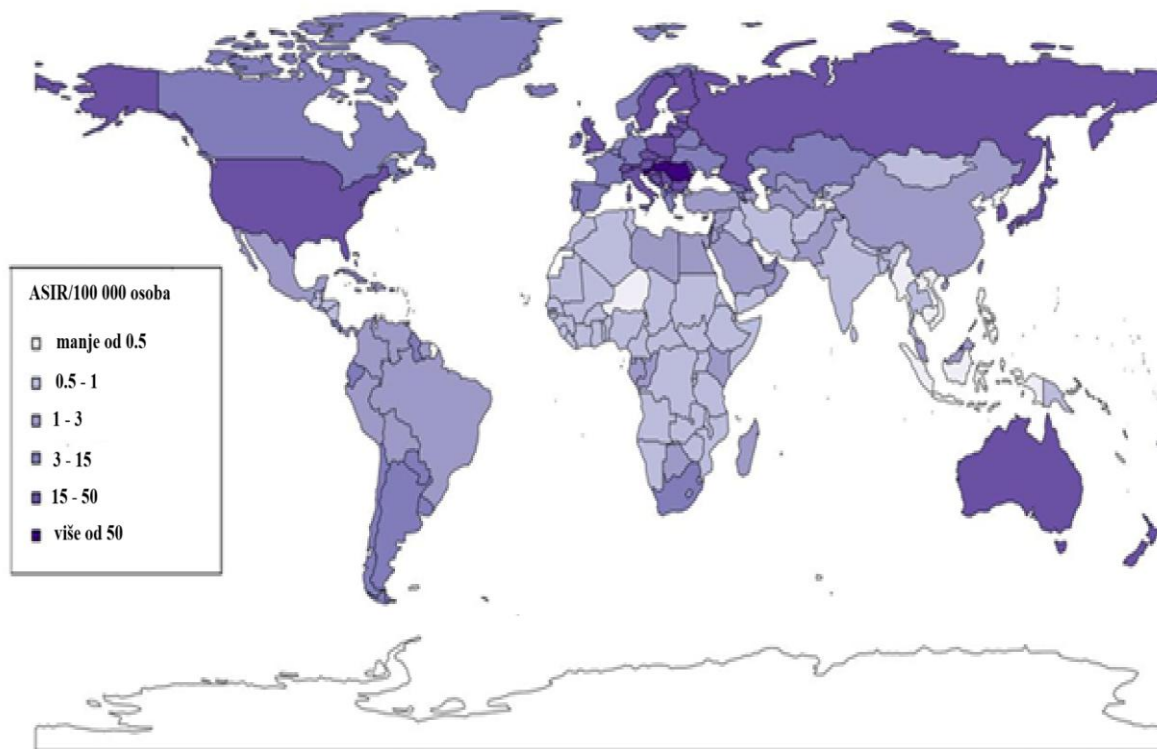
Suprotno tome, za rs1544410 polimorfizam u genu VDR, E2/E4 alele APOE gena, rs6254 polimorfizam PTH gena i rs1800871 polimorfizam IL10 gena, dosadašnji su dokazi ograničeni i zahtijevaju dodatne potvrde u većim, populacijski različitim kohortama (128).

Ovi nalazi upućuju na to da genetska predispozicija – osobito ona povezana s metabolizmom lipida, upalnim odgovorom i signalnim putevima TGF- β /NOTCH – ima važnu ulogu u osjetljivosti pojedinaca na razvoj i napredovanje kalcificirajuće bolesti aortnog zaliska.

2.3.4.3. Epidemiologija CAVS-a

Prema opsežnoj analizi Yi i suradnika (2021.), koja je obuhvatila razdoblje od 1990. do 2019. godine u 204 zemlje, broj osoba oboljelih i umrlih od kalcificirajuće bolesti aortnog zaliska (CAVD) pokazao je značajan porast tijekom posljednja tri desetljeća (Slika 16) (7). Taj porast uglavnom odražava starenje stanovništva i produljenje životnog vijeka .

Iako su dobno standardizirane stope incidencije i smrtnosti ostale relativno stabilne, apsolutno opterećenje bolešću znatno je poraslo, osobito u zemljama s visokim dohotkom. Podaci iz 2019. godine pokazali su da je Slovenija imala najviše stope incidencije (62,2/100 000) i prevalencije (1 080/100 000) u svijetu, dok je Cipar prednjačio po stopi smrtnosti (8,2/100 000) (7).



Slika 16. Dobno standardizirana stopa incidencije kalcificirajuće stenozе aortalnih zalistaka u 204 zemlje i teritorija tijekom 2019. godine. Kratice: ASIR – dobnо standardizirana stopa incidencije (engl. age-standardized incidence rate). Preuzeto iz: Yi B, Zeng W, Lv L, Hua P. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(9):12710–12732. doi:10.18632/aging.202942. (7)

Najveći apsolutni broj smrtnih ishoda povezanih s CAVS-om zabilježen je u Sjedinjenim Američkim Državama (~25 000 godišnje), zatim u Njemačkoj i Japanu (~13 000), Francuskoj (~8 000) i Indiji (~7 000), čineći zajedno više od polovice globalnog mortaliteta od ove bolesti (7).

Posebno visok godišnji porast smrtnosti (≥ 1 %) zabilježen je u srednjo- i istočnoeuropskim zemljama, među kojima prednjače Poljska (6,9 %), Estonija (6,0 %), Gruzija (5,9 %), Češka (5,8 %) i Slovačka (5,5 %) (7).

Analiza prema socio-demografskom indeksu (SDI) pokazala je da su zemlje s visokim SDI-jem imale više od četiri puta veću dobnо standardiziranu stopu smrtnosti od zemalja s niskim SDI-jem, što jasno povezuje CAVD s produljenjem životnog vijeka i starenjem populacije.

U Kini je mortalitet od CAVD-a najizraženiji u dobnim skupinama iznad 70 godina, dok je u mlađim dobnim skupinama zabilježen pad smrtnosti od oko 15 % u usporedbi s 1990. godinom. Sveukupno, rezultati ukazuju na to da je CAVD postao značajan globalni uzrok kardiovaskularne smrtnosti, osobito u zemljama s višim dohotkom i duljim očekivanim životnim vijekom (7).

2.3.4.4. Epidemiološki pokazatelji u Hrvatskoj

Prema istom izvoru, Hrvatska spada među europske zemlje sa srednje visokim opterećenjem kalcificirajuće bolesti aortnog zaliska (CAVD).

Procijenjena dobno standardizirana stopa incidencije u 2019. godini iznosila je oko 35/100 000 stanovnika, dok je prevalencija bila približno 550/100 000, što je iznad svjetskog prosjeka, ali niže od vrijednosti u zapadnoeuropskim zemljama poput Slovenije i Njemačke (7).

Stopa smrtnosti procijenjena je na oko 3,8/100 000 stanovnika, uz blagi porast u odnosu na 1990. godinu, što se prvenstveno pripisuje starenju populacije i produljenju životnog vijeka (7).

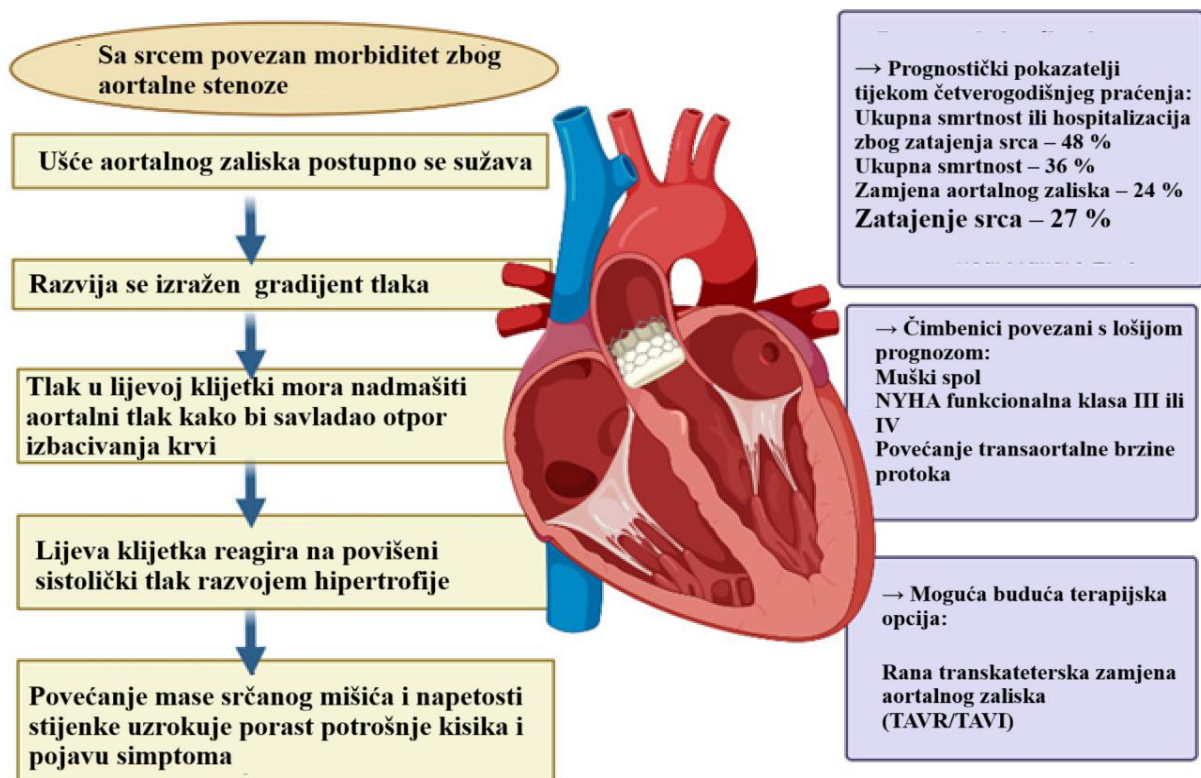
U posljednja tri desetljeća zabilježen je značajan porast apsolutnog broja oboljelih i umrlih osoba, dok su dobno standardizirane stope ostale relativno nepromijenjene, što odražava širi europski obrazac – rast ukupnog tereta bolesti uz stabilne relativne pokazatelje. Ti podaci naglašavaju potrebu za sustavnim preventivnim kardiovaskularnim nadzorom i ranim otkrivanjem bolesti u starijoj populaciji (7).

2.3.4.5. Klinička prezentacija i prognoza CAVS-a

Pojava simptoma predstavlja ključni prijelazni trenutak u tijeku bolesti, jer označava kraj kompenzacijskog razdoblja i zahtijeva pravovremenu dijagnostičku i terapijsku intervenciju.

Nakon dugog asimptomatskog stadija, progresivno povećanje opstrukcije izlaznog trakta lijeve klijetke dovodi do pojave tipičnih simptoma teške CAVS: pektoralne angine, sinkope i kongestivnog zatajenja srca (HF; engl. *heart failure*) (Slika 17) (147).

Prognoza se nakon pojave simptoma naglo pogoršava – bez kirurške intervencije polovica bolesnika sa zatajenjem srca umire unutar dvije godine, bolesnici sa sinkopom unutar tri godine, a oni s anginom unutar pet godina od pojave simptoma (24, 148).



Slika 17. Hemodinamske i kliničke posljedice aortalne stenozе (AVS). Postupno sužavanje ušća aortalnog zaliska dovodi do razvoja izraženog transvalvularnog tlakovnog gradijenta te potrebe da lijeva klijetka generira viši sistolički tlak kako bi savladala otpor pri izbacivanju krvi. Kao kompenzatorni odgovor nastaje koncentrična hipertrofija miokarda, koja u početku omogućuje održavanje srčanog minutnog volumena, ali uz cijenu povećane potrošnje kisika i smanjene koronarne rezerve. S napredovanjem bolesti, rastuća napetost stijenke i zadebljanje miokarda uzrokuju razvoj dijastoličke disfunkcije, pojavu simptoma angine, sinkope i zatajenja srca, te naposljetku tešku kliničku dekompenzaciju. U prognozi bolesti ključnu ulogu imaju spol (muški), NYHA funkcionalna klasa III–IV te povećane transaortalne brzine protoka. Tijekom četverogodišnjeg praćenja zabilježene su visoke stope nepovoljnih ishoda: ukupna smrtnost ili hospitalizacija zbog zatajenja srca (48 %), ukupna smrtnost (36 %), potreba za kirurškom ili transkateterskom zamjenom zaliska (24 %), te razvoj srčanog zatajenja (27 %). Kao perspektivna terapijska mogućnost ističe se rana transkateterska zamjena aortalnog zaliska (TAVR/TAVI), osobito kod starijih bolesnika i onih s visokim operativnim rizikom. Modificirano prema: Wal P, Rathore S, Aziz N, Singh YK, Gupta A. Aortic stenosis: a review on acquired pathogenesis and ominous combination with diabetes mellitus. *Egypt Heart J.* 2023;75(1):26.(61)

2.3.4.6. Dijagnostička klasifikacija i hemodinamska procjena aortalne stenozе

Prema najnovijim smjernicama Europskog kardiološkog društva (ESC) i Europske udruge za kardiotorakalnu kirurgiju (EACTS) iz 2021. godine te Američkog kardiološkog kolegija (ACC) i Američke udruge za srce (AHA) iz 2020. godine, aortalna stenozа (AVS) se procjenjuje prema stupnju suženja ušća zaliska i s njim povezanih hemodinamskih parametara (79, 149-153).

Ključni kriteriji koji se pritom koriste su:

- površina aortalnog ušća (AVA, engl. *aortic valve area*),
- indeksirana površina zaliska (AVAi, engl. *aortic valve area index*),
- maksimalna brzina transvalvularnog protoka (V_{max} , engl. *peak transvalvular velocity*),
- i srednji transvalvularni gradijent tlaka (MGP, engl. *mean gradient pressure*).

Na temelju tih parametara, AVS se razvrstava na blagi, umjereni i teški oblik bolesti (Tablica 3 i 4) (79, 149, 151-154).

Tablica 3. Ehokardiografska klasifikacija aortalne stenozе prema ESC/EACTS i ACC/AHA smjernicama

Hemodinamski parametar	Aortalna (AVSc)	skleroza	Blaga AVS	Umjereni AVS	Teška AVS
<i>Brzina protoka (m/s)</i>	< 2,5		2,6–2,9	3,0–4,0	> 4,0
<i>Srednji gradijent (mmHg)</i>	< 20		20–40	> 40	–
<i>Površina aortalnog zaliska (AVA, cm²)</i>	> 1,5		1,5–1,0	< 1,0	–
<i>Indeksirana površina (AVAi, cm²/m²)</i>	> 0,85		0,60–0,85	< 0,6	–
<i>Omjer brzine LVOT/V_{max}</i>	> 0,50		0,25–0,50	< 0,25	–

Kratice: AVA – površina aortalnog ušća; AVAi – indeksirana površina aortalnog ušća; AVSc – aortalna skleroza; AVS – aortalna stenozа. Modificirano prema: Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Edvardsen T, Goldstein S, i sur. Recommendations on the Echocardiographic Assessment of Aortic Valve Stenosis: A Focused Update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. J Am Soc Echocardiogr. 2017;30(4):372–92. i Baumgartner HC, Hung JC-C, Bermejo J, Chambers JB, Edvardsen T, Goldstein S, i sur. Recommendations on the echocardiographic assessment of aortic valve stenosis: a focused update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2017;18(3):254–75.(152, 153)

Smjernice AHA/ACC dodatno definiraju stupnjeve bolesti (A–D3) prema anatomskoj slici zaliska, hemodinamskim posljedicama i simptomima (Tablica 4).

Tablica 4. Kliničko-funkcionalna klasifikacija AVS prema AHA/ACC (2020)

Stupanj	Opis	Morfologija zaliska	Hemodinamika	Funkcionalne promjene	Simptomi
A	Rizik za razvoj AVS-a	Kongenitalni BAV ili AVSc	$V_{max} < 2$ m/s	Nema	Nema
B	Progresivna AVS	Blaga–umjerena kalcifikacija uz djelomično ograničeno otvaranje	Blaga: V_{max} 2,0–2,9 m/s; Umjerena: 3,0–3,9 m/s; $\Delta P < 40$ mmHg	Rana dijastolička disfunkcija, LVEF normalna	Nema
C1	Asimptomatska teška AVS	Jaka kalcifikacija s teškim ograničenjem otvaranja	$V_{max} \geq 4$ m/s; $\Delta P \geq 40$ mmHg; $AVA \leq 1,0$ cm ² ($AVA_i \leq 0,6$ cm ² /m ²)	Dijastolička disfunkcija, blaga hipertrofija LV	Asimptomatski, preporučuje se test opterećenja
C2	Asimptomatska teška AVS s disfunkcijom LV	Teška kalcifikacija	Kao gore	LVEF < 50 %	Nema
D1	Simptomatska visokogradijentna AVS	Teška kalcifikacija, smanjena pokretljivost	$V_{max} \geq 4$ m/s; $\Delta P \geq 40$ mmHg	Hipertrofija LV, moguća pulmonalna hipertenzija	Dispneja, angina, sinkopa
D2	Simptomatska niskogradijentna AVS uz sniženu EF	Teška kalcifikacija	$AVA \leq 1,0$ cm ² ; $V_{max} < 4$ m/s; $\Delta P < 40$ mmHg; LVEF < 50 %	Dijastolička disfunkcija, HF	Angina, sinkopa, HF
D3	Paradoksalna niskogradijentna AVS uz očuvanu EF	Teška kalcifikacija	$AVA_i \leq 0,6$ cm ² /m ² ; $\Delta P < 40$ mmHg; $SV_i < 35$ mL/m ²	Restriktivna dijastolička funkcija, LVEF ≥ 50 %	HF, sinkopa, angina

Kratice: AVS – aortalna stenoza; AVA – površina aortalnog ušća; AVAi – indeksirana površina aortalnog ušća; LV – lijeva klijetka; LVEF – ejekcijska frakcija lijeve klijetke; ΔP – srednji gradijent tlaka; SVi – indeks udarnog volumena. Modificirano prema: Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Gentile F, i sur. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2021;77(4):e25–e197. (79); Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, i sur. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2022;75(6):524. (154); Inanc IH, Cilingeroglu M, Iliescu C, VNI, Matar F, Ates I, i sur. Comparison of American and European Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. Cardiovasc Revasc Med. 2023;47:76–85. (151).

2.3.4.7. Hemodinamski podtipovi teške aortalne stenoze

Procjena težine AVS-a temelji se na integraciji mjerenja transvalvularnog protoka (SVi), srednjeg gradijenta tlaka (MPG), maksimalne brzine protoka (Vmax) i površine aortalnog ušća (AVA).

Na osnovi tih pokazatelja razlikuju se četiri glavna hemodinamska obrasca bolesti (Tablica 5):

1. Visokogradijentna AVS – $MPG \geq 40$ mmHg, $V_{max} \geq 4,0$ m/s, $AVA \leq 1,0$ cm² (ili $\leq 0,6$ cm²/m²).
2. Niskogradijentna AVS s niskim protokom i smanjenom LVEF – $MPG < 40$ mmHg, $AVA \leq 1,0$ cm², $LVEF < 50$ %, $SVi \leq 35$ mL/m².
3. Niskogradijentna AVS s očuvanom LVEF (paradoksalna forma) – $MPG < 40$ mmHg, $AVA \leq 1,0$ cm², $LVEF \geq 50$ %, $SVi \leq 35$ mL/m².
4. Normalno protočna niskogradijentna AVS – $MPG < 40$ mmHg, $AVA \leq 1,0$ cm², $LVEF \geq 50$ %, $SVi > 35$ mL/m² (155, 156).

Tablica 5. Hemodinamski podtipovi teške aortalne stenoze

Podtip AVS	MPG (mmHg)	V _{max} (m/s)	AVA (cm ²)	LVEF	SVi (mL/m ²)
Visokogradijentna	≥ 40	$\geq 4,0$	$\leq 1,0$ (ili $\leq 0,6$ cm ² /m ²)	bilo koja	> 35
Niskogradijentna s niskim protokom i sniženom EF	< 40	$< 4,0$	$\leq 1,0$	< 50 %	≤ 35
Niskogradijentna s očuvanom EF (paradoksalna)	< 40	$< 4,0$	$\leq 1,0$	≥ 50 %	≤ 35
Niskogradijentna s normalnim protokom i očuvanom EF	< 40	$< 4,0$	$\leq 1,0$	≥ 50 %	> 35

Kratice: AVS – aortalna stenoza; AVA – površina aortalnog ušća; LVEF – e젝cijska frakcija lijeve klijetke; MPG – srednji transvalvularni gradijent; SVi – indeks udarnog volumena; V_{max} – vršna brzina transvalvularnog protoka. Modificirano prema: Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, i sur. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. Eur Heart J. 2022;43(7):561–632. (79); Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, i sur. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. Eur Heart J. 2022;43(7):561–632.(156)

2.3.4.8. Dijagnostika i kliničko liječenje kalcificirajuće aortalne stenoze (CAVS)

Ehokardiografija je temeljna dijagnostička metoda i smatra se „zlatnim standardom“ u procjeni CAVS-a (Tablica 6) (157-160). Ova metoda omogućuje izravno mjerenje površine aortalnog ušća, brzine protoka kroz zalistak, gradijenata tlaka te morfološku procjenu listića, uključujući stupanj fibroze i kalcifikacije (157). Dodatno, ehokardiografijom se može procijeniti veličina lijevog ventrikula (LV) i lijevog atrija (LA), funkcionalno stanje lijevog i desnog srca, kao i sistolička te dijastolička funkcija ventrikula. Doplerski način rada omogućava precizno određivanje gradijenta tlaka i izračun efektivne površine aortalnog ušća (EOA, engl. *effective orifice area*).

U slučajevima kada je ultrazvučni prikaz loše kvalitete ili su rezultati međusobno neusklađeni, može se primijeniti kardijalna magnetska rezonancija (CMR) koja pruža pouzdane podatke o morfologiji i funkciji srca (160).

Kardijalna kompjutorizirana tomografija (CCT) također ima važnu ulogu, osobito za kvantifikaciju i prostornu procjenu kalcifikacija, što je klinički koristan pokazatelj težine i napredovanja bolesti te pomaže u planiranju zahvata transkateterske implantacije zaliska (TAVR) (156, 157, 161, 162).

Kod bolesnika s teškim, ali asimptomatskim oblikom CAVS-a, preporučuje se test opterećenja (exercise testing) radi potvrde odsutnosti simptoma, procjene hemodinamskog odgovora i otkrivanja aritmija, čime se olakšava procjena rizika i donošenje odluke o intervenciji.

Trenutačno ne postoji učinkovita farmakološka terapija koja može zaustaviti napredovanje ili potaknuti regresiju CAVS-a. Stoga su kirurška zamjena aortalnog zaliska (SAVR) te transkateterska implantacija aortalnog zaliska (TAVR/TAVI) jedine terapijske opcije koje dokazano poboljšavaju preživljenje i kvalitetu života bolesnika.

Prema najnovijim ESC/EACTS smjernicama, indikacija za intervenciju temelji se na simptomima, funkciji lijevog ventrikula (LVEF) i rezultatima dodatnih testova (156). Intervencija je preporučena kod simptomatskih bolesnika te onih s LVEF < 50 %, dok se u asimptomatskih bolesnika odluka donosi individualno prema rezultatima testa opterećenja i prognostičkim parametrima. Procjenu i odabir terapije donosi multidisciplinarni „Heart Team“.

Kod bolesnika mlađih od 75 godina i niskog kirurškog rizika prednost ima kirurška zamjena zaliska (SAVR), dok se u starijih ili visokorizičnih bolesnika preferira TAVR pristup. U bolesnika srednjeg rizika odluka se temelji na individualnim anatomskim i kliničkim karakteristikama.

Obje metode nose određene rizike, poput infektivnog endokarditisa, tromboze proteze i ograničenog vijeka trajanja bioloških zaliska, zbog čega se kod dijela bolesnika javlja potreba za ponovnim zahvatom.

Unatoč ranijim očekivanjima da bi statini mogli usporiti napredovanje bolesti zbog učinka na smanjenje lipoproteina, randomizirane studije nisu pokazale terapijsku korist ni u kombiniranim visokodoznim režimima (163-166).

Tablica 6. Dijagnostičke metode i terapijske mogućnosti u liječenju kalcificirajuće aortalne stenozе

Metoda / Terapija	Što prikazuje / omogućuje	Uloga u CAVS-u
Ehokardiografija (transtorakalna / transezofagealna)	Površina aortalnog zaliska (AVA), EOA, gradijent tlaka, brzina protoka (Vmax), morfologija i stupanj fibroze/kalcifikacije, funkcija LV i RA	Temeljna metoda dijagnoze i praćenja CAVS-a
Doplerska ehokardiografija	Određivanje gradijenta tlaka i EOA	Detaljna hemodinamska procjena aortalne stenozе
Kardijalna magnetska rezonancija (CMR)	Detaljna procjena strukture i funkcije srca	Korisna kod nejasnih ili nepouzdanih ehokardiografskih nalaza
Kardijalna kompjutorizirana tomografija (CCT)	Kvantifikacija kalcifikacija i analiza anatomije korijena aorte	Prediktor napredovanja bolesti i planiranja TAVR zahvata
Test opterećenja	Tolerancija na fizički napor, arterijski tlak i aritmije	Procjena rizika i potvrda asimptomatskog statusa kod teške stenozе
Farmakološka terapija (npr. statini)	Smanjenje LDL i lipoproteina	Klinička istraživanja nisu dokazala terapijski učinak
Kirurška zamjena zaliska (SAVR)	Ugradnja mehaničke ili biološke proteze	Standardni kirurški pristup za teški CAVS
Transkateterska implantacija zaliska (TAVR)	Implantacija biološke proteze putem katetera	Manje invazivna metoda; dokazano učinkovita kod visokorizičnih i starijih bolesnika

Kratice: SAVR – kirurška zamjena aortalnog zaliska (surgical aortic valve replacement); CAVS – kalcificirajuća aortalna stenozа (calcific aortic valve stenosis); CMR – magnetska rezonancija srca (cardiac magnetic resonance); CCT – kompjutorizirana tomografija srca (cardiac computed tomography); EOA – efektivna površina aortalnog ušća (effective orifice area); LV – lijevi ventrikul (left ventricle); LDL – lipoproteini niske gustoće (low-density lipoproteins); RA / LA – desni / lijevi atrij (right / left atrium); TAVR – transkateterska implantacija aortalnog zaliska (transcatheter aortic valve replacement).

2.4. Epigenetski mehanizmi

U novijim desetljećima postalo je jasno da genetska osnova sama po sebi ne može u potpunosti objasniti složen patobiološki spektar kalcificirajuće aortalne stenozе. Klasična genetska paradigma, iako prepoznaje brojne nasljedne varijante povezane s bolešću, ne objašnjava u dovoljnoj mjeri jasno potvrđenu povezanost između CAVS-a, aterogenih čimbenika, okolišnih utjecaja i životnih navika. Zbog toga je u fokusu istraživanja sve veća pažnja usmjerena na epigenetske regulacijske procese – stabilne, ali reverzibilne kemijske modifikacije DNA i histonskih proteina koje mijenjaju gensku aktivnost bez promjene primarnog slijeda nukleotida (4, 26).

Epigenetske promjene mogu biti naslijeđene ili stečene tijekom života, a imaju ključnu ulogu u usmjeravanju stanične diferencijacije, organogenezi i održavanju tkivne homeostaze. Budući da sve somatske stanice posjeduju identičnu DNA sekvencu, upravo epigenetski mehanizmi određuju koji će se skup gena aktivirati ili utišati u određenom staničnom tipu. Oni oblikuju prostorno-vremenski obrazac ekspresije gena, što omogućuje funkcionalnu specijalizaciju stanica i tkiva (4, 27).

Četiri su glavna epigenetska mehanizma (Slika 18):

1. Metilacija DNA – dodavanje metilnih skupina na citozinske ostatke, čime se smanjuje transkripcijska aktivnost gena.
2. Kovalentne posttranslacijske modifikacije histona – uključuju acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju i ubikvitinaciju histonskih repova.
3. ATP-ovisno remodeliranje kromatina – promjene u strukturi nukleosoma koje utječu na dostupnost DNA transkripcijskim faktorima.
4. Regulacija pomoću nekodirajućih RNA (ncRNA) – obuhvaća male mikroRNA (miRNA) i duge nekodirajuće RNA (lncRNA) koje djeluju kao transkripcijski i posttranskripcijski regulatori (4, 27).

Zajednički, ovi procesi čine tzv. epigenom, složen sustav „pisača“, „čitača“ i „brisača“ epigenetskih oznaka koji oblikuje transkripcijski profil svake stanice (34, 35). Ključne osobine epigenetskih mehanizama – stabilnost, prilagodljivost i reverzibilnost – čine ih istodobno osnovom stanične plastičnosti i mogućom metom terapijske modulacije (4).

Brojna istraživanja potvrdila su da epigenetske promjene imaju izravan utjecaj na disfunkciju endotela, aktivaciju upalnih i imunoloških stanica, te osteogenu transformaciju valvularnih intersticijskih stanica (VIC) (4). Ovi procesi rezultiraju fibroznim zadebljanjem, kalcifikacijom i posljedičnim remodeliranjem lijeve klijetke. Iako je najveći broj podataka dostupan za mikroRNA, dokazana je i važna, premda manje istražena, uloga dugih nekodirajućih RNA (lncRNA) te drugih epigenetskih modifikatora (4).

2.4.1. Regulatorne protein-nekodirajuće RNA molekule

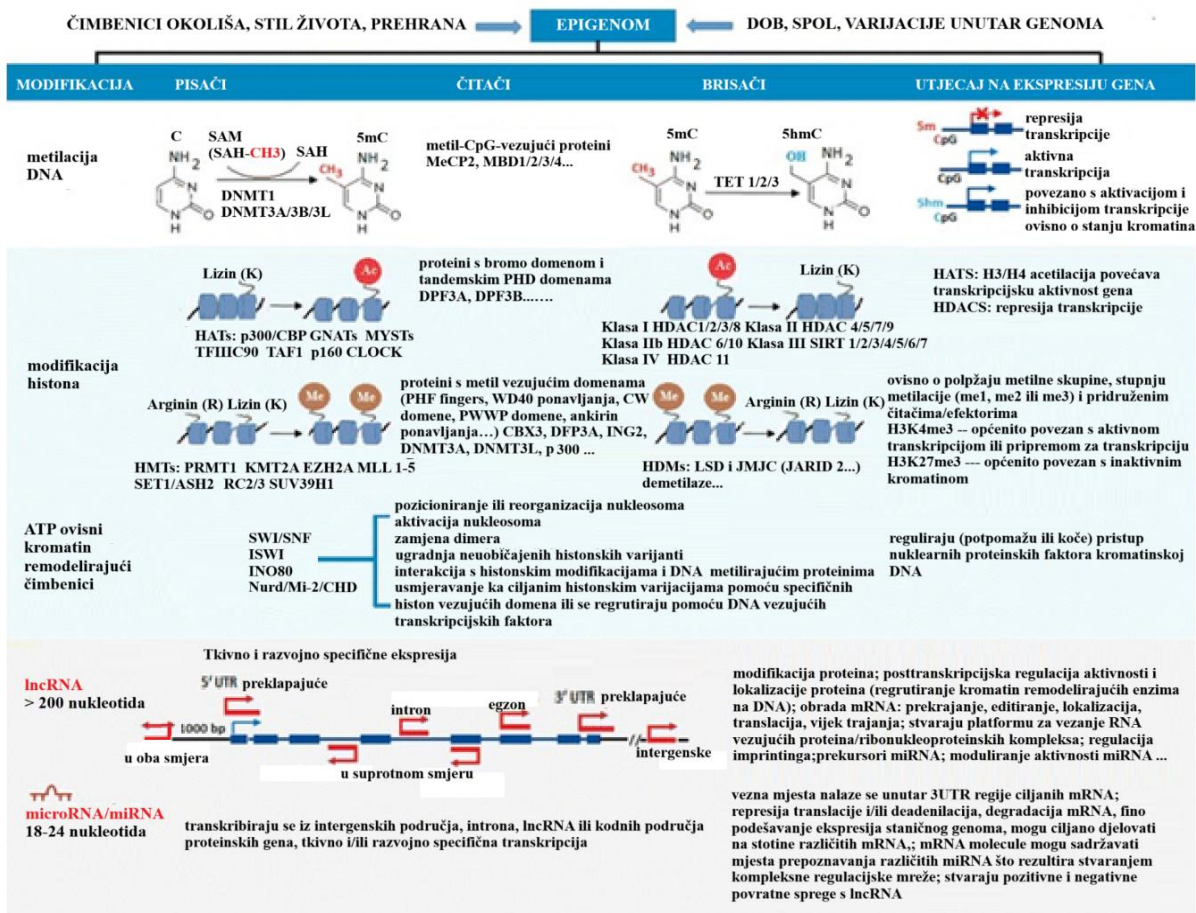
Samo manji dio ljudskog genoma (oko 1–2 %) transkribira se u mRNA koja služi kao predložak za sintezu proteina, dok više od tri četvrtine genoma proizvodi nekodirajuće RNA (ncRNA) s važnim strukturnim i regulatornim ulogama.

U osnovne, tzv. konstitutivne ncRNA, ubrajaju se ribosomske RNA (rRNA) i transportne RNA (tRNA), ključne za translaciju, kao i male nukleolarne (snoRNA), male nuklearne (snRNA) i telomerne RNA (TRNA), koje sudjeluju u procesima obrade RNA i održavanju integriteta kromosoma.

Posebnu skupinu čine regulatorne ncRNA, koje ne kodiraju proteine, ali imaju presudnu ulogu u finoj regulaciji ekspresije gena. Među njima se ističu dvije glavne podskupine:

- mikroRNA (miRNA) – kratke, <200 nukleotida duge molekule koje ciljano inhibiraju stabilnost i translaciju mRNA, čime kontroliraju posttranskripcijsku regulaciju (Slika 43) (4);
- duge nekodirajuće RNA (lncRNA) – RNA dulje od 200 nukleotida koje sudjeluju u epigenetskom upravljanju genskom ekspresijom putem interakcija s DNA, RNA ili proteinima (36-39).

lncRNA djeluju cis (na gene u neposrednoj blizini) ili trans (na udaljene gene na drugim kromosomima), pri čemu mogu poticati ili inhibirati transkripciju. Njihova ekspresija ovisi o staničnom tipu i fiziološkom stanju te je ključna za diferencijaciju, rast i odgovor na stres.



Slika 18. Epigenetski mehanizmi u stanicama sisavaca. Sažeti prikaz glavnih epigenetskih mehanizama i njihovih učinaka na gensku ekspresiju. Epigenetske modifikacije uključuju (1) metilaciju DNA, (2) modifikacije histona, (3) ATP-ovisno remodeliranje kromatina te (4) nekodirajuće RNA molekule (*lncRNA* i *miRNA*). Svaka skupina obuhvaća tri osnovne funkcionalne klase enzima ili proteina: “writers” (enzimi koji uvode modifikaciju, npr. DNMT, HMT, HAT), “readers” (proteini koji prepoznaju modifikaciju putem specifičnih domena, npr. MeCP2, bromodomain, PHD, chromodomain) i “erasers” (enzimi koji uklanjaju modifikaciju, npr. TET, HDAC, LSD demetilaze). Metilacija DNA obično dovodi do supresije transkripcije, dok acetilacija histona potiče aktivaciju gena. Metilacija histona ima kontekstno ovisne učinke (aktivirajuće ili represorske), ovisno o položaju i stupnju metilacije. ATP-ovisni kompleksi za remodeliranje kromatina (SWI/SNF, ISWI, INO80, NuRD) reguliraju dostupnost DNA transkripcijskim faktorima. Dugolančane nekodirajuće RNA (*lncRNA*) (>200 nukleotida) i mikroRNA (*miRNA*) (18–24 nukleotida) dodatno moduliraju gensku ekspresiju na razinama transkripcije, posttranskripcije i translacije, djelujući putem interakcija s DNA, RNA i proteinskim kompleksima. Djelovanje epigenetskih mehanizama dinamički je uvjetovano čimbenicima okoliša, dobi, spolom i genetskom predispozicijom. Kratice: DNMT – DNA metiltransferaze; CBX3 – kromoboks 3; CLOCK – cirkadijalni regulator sata; DPF3A – double PHD fingers 3a; 5hmC – 5-hidroksimetilcitozin; HAT1 – histon acetiltransferaza 1; HMT – histon metiltransferaza; ING2 – inhibitor rasta 2; KMT2A – lizin metiltransferaza 2A; MeCP2 – metil-CpG vezujući protein 2; MBD1 – methyl-CpG-binding domain protein 1; MLL1–5 – obitelj lizin metiltransferaza; MYSTs – obitelj histon acetiltransferaza; p300 – histon acetiltransferaza P300; PRMT1 – protein arginin metiltransferaza 1; p160 – MYB vezujući protein 1a; SAM – S-adenozil metionin; SET1/ASH2 – histon-metiltransferazni kompleks; SUV39H1 – histon-lizin-N-metiltransferaza. Modificirano prema: Gošev I i sur., *Clin Epigenetics* 2017;9:106 (4).

Regulatorne mreže koje uključuju ncRNA mogu biti:

- RNA–RNA interakcije (npr. lncRNA–miRNA–mRNA osi),
- RNA–DNA interakcije,
- RNA–protein interakcije.

Ove su mreže dinamične i podložne promjenama pod utjecajem okolišnih i endogenih signala (4). Zbog svoje stabilnosti i prisutnosti u biološkim tekućinama (plazma, serum, urin), miRNA i lncRNA smatraju se perspektivnim biomarkerima i potencijalnim terapijskim metama u CAVS-u, zatajenju srca (HF) i drugim kardiovaskularnim bolestima (4).

2.4.2. Duge nekodirajuće RNA molekule

Duge (dugolančane) nekodirajuće RNA (lncRNA) predstavljaju heterogenu skupinu transkriptata duljih od 200 nukleotida koji nemaju sposobnost kodiranja proteina, ali sudjeluju u brojnim regulatornim procesima na razini kromatina, transkripcije i posttranskripcijske kontrole. Prema novijim integrativnim analizama transkriptoma, lncRNA molekule čine značajan dio transkripcijskog outputa genoma viših eukariota, a njihova ekspresija pokazuje izraženu tkivnu, razvojnu i stanično-specifičnu regulaciju (167).

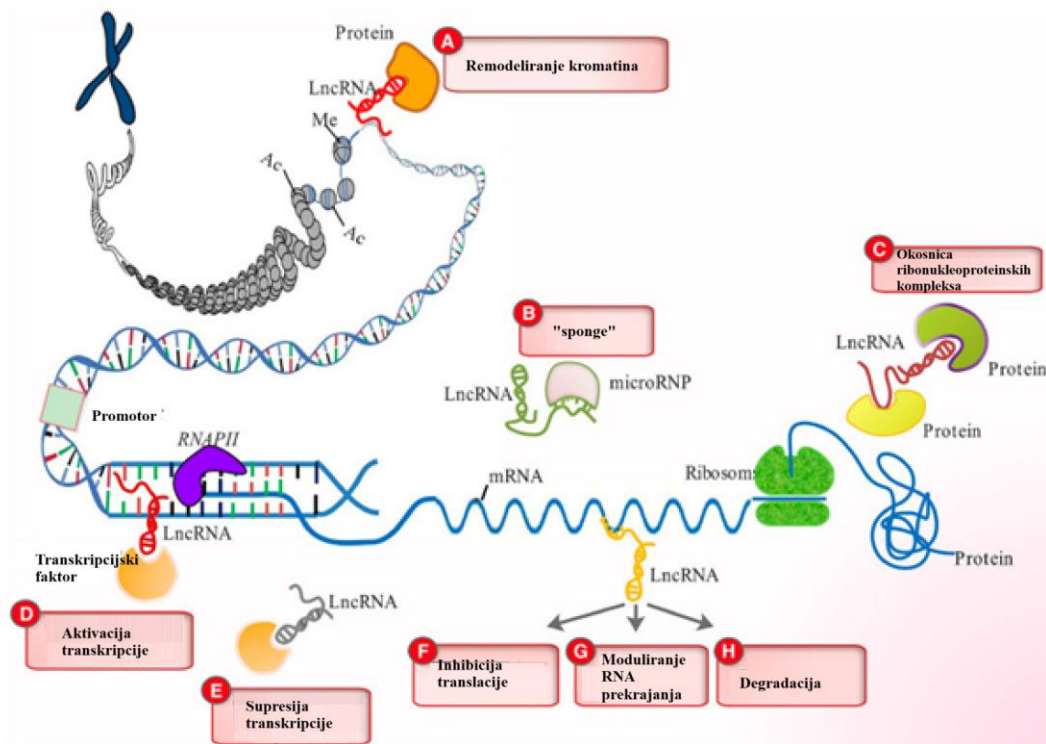
lncRNA djeluju kroz različite mehanizme, uključujući interakcije s DNA, RNA i proteinima, pri čemu mogu poslužiti kao molekularni vodiči (guides), mostovi (scaffolds), mamac molekule (decoys) ili regulatori u cis i trans (167).

Funkcionalno, lncRNA sudjeluju u epigenetskoj regulaciji kromatina, modifikaciji histona, stabilizaciji mRNA, kontroli spajanja i translacije te u formiranju nuklearnih tijela (167).

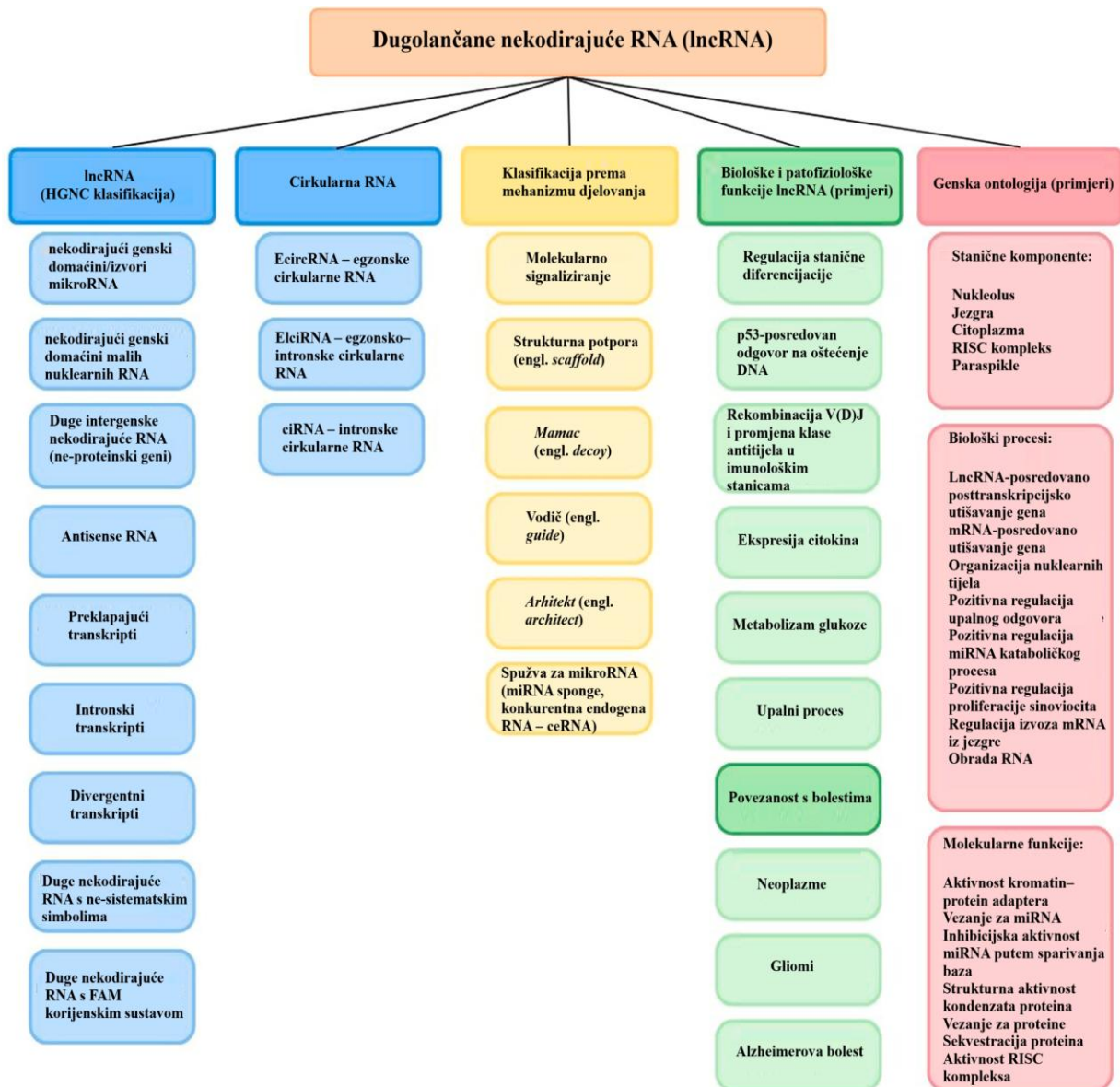
Ovisno o njihovoj staničnoj lokalizaciji, lncRNA molekule mogu imati različite biološke funkcije. Procjenjuje se da se oko 15 % lncRNA nalazi u citoplazmi, dok se većina njih nalazi u staničnoj jezgri, gdje sudjeluju u regulaciji ekspresije gena putem interakcija s kromatinom, transkripcijskim faktorima i epigenetskim kompleksima (168).

Nasuprot tome, citoplazmatske lncRNA najčešće djeluju kao “molekularne spužve” (engl. *sponge*) za mikroRNA (miRNA), vežući ih i sprječavajući njihovu interakciju s ciljnom mRNA, čime posredno utječu na stabilnost i translaciju transkripata (169).

Uloga mnogih lncRNA još uvijek nije potpuno razjašnjena, a njihova biološka složenost i niska razina konzervacije predstavljaju značajne metodološke izazove u istraživanju. Glavni mehanizmi djelovanja, genomska organizacija i struktura dugolančanih nekodirajućih RNA (lncRNA) u regulaciji genske ekspresije prikazani su na Slici 19, 20, 21 i 22.


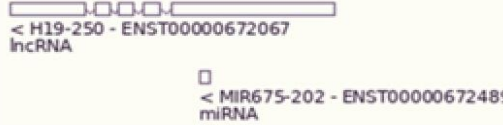

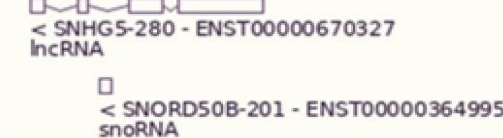

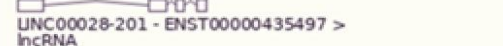






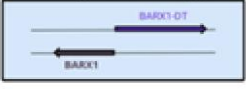

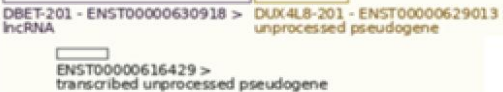

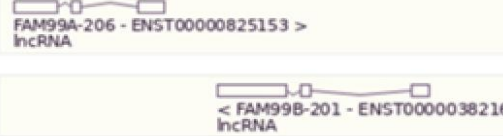


Slika 19. Glavni mehanizmi djelovanja dugolančanih nekodirajućih RNA (lncRNA) u regulaciji genske ekspresije. lncRNA molekule ostvaruju svoje regulatorne učinke na više razina genske kontrole, uključujući: (A) remodeliranje kromatina putem interakcija s epigenetskim kompleksima i histonskim modifikatorima, što rezultira promjenama u dostupnosti DNA transkripcijskim faktorima; (B) djelovanje kao molekularne spužve koje vežu mikroRNA (miR) i sprječavaju njihovo vezanje na ciljnu mRNA; (C) funkciju molekularnih skela (*scaffolds*) koje omogućuju prostornu organizaciju i stabilizaciju više proteinskih kompleksa; (D) aktivaciju transkripcije kroz interakcije s transkripcijskim faktorima ili regulatornim elementima promotora; (E) supresiju transkripcije blokiranjem vezanja transkripcijskih faktora ili stvaranjem represorskih kompleksa; (F) inhibiciju translacije putem vezanja na mRNA ili ribosome; (G) modulaciju splicinga kroz interakciju sa spliceosomskim komponentama; (H) regulaciju razgradnje RNA putem stabilizacije ili destabilizacije mRNA transkripata. Ovi različiti mehanizmi omogućuju lncRNA molekulama da koordiniraju složene mreže stanične signalizacije i epigenetske kontrole, utječući tako na diferencijaciju, homeostazu i patološke procese. Modificirano prema: (170)

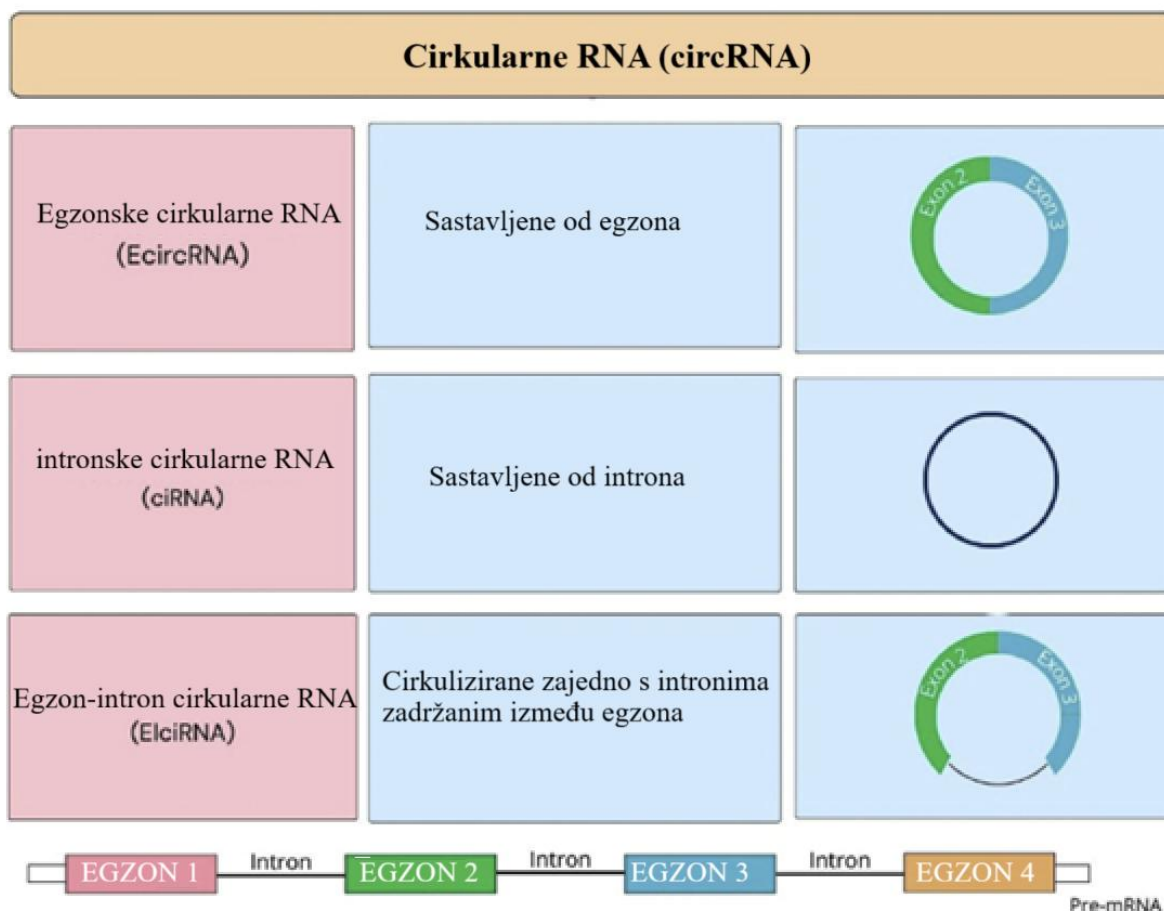


Slika 20. Klasifikacija, mehanizmi djelovanja i biološke funkcije dugolančanih nekodirajućih RNA (lncRNA). Prikazan je pregled osnovnih skupina nekodirajućih RNA prema HGNC klasifikaciji, uključujući mikroRNA host gene i long intergenic non-protein coding RNA, te povezanih oblika cirkularnih RNA (circRNA). LncRNA se mogu svrstati i prema mehanizmu djelovanja – kao molekularni signalizatori, strukturni nosači (scaffolds), mamac molekule (decoys), vodiči (guides), arhitekti ili spužve za mikroRNA (ceRNA). Njihove biološke i patofiziološke funkcije obuhvaćaju regulaciju stanične diferencijacije, odgovore na oštećenje DNA, imunološke rekombinacije, kontrolu ekspresije citokina, metabolizam glukoze i upalne procese, ali i povezanost s bolestima poput neoplazmi, glioma i Alzheimerove bolesti. U desnom dijelu prikaza navedeni su primjeri genske ontologije (gene ontology) koji objašnjavaju stanične komponente (nukleolus, jezgru, citoplazmu, RISC kompleks), biološke procese (posttranskripcijsko utišavanje gena, obradu RNA, upalnu regulaciju) te molekularne funkcije (vežanje za miRNA, sekvestraciju proteina i aktivnost kromatin–protein adaptera). Ovaj prikaz naglašava složenost i višerazinsku regulacijsku ulogu lncRNA u staničnoj i patološkoj signalizaciji. Modificirano prema: Chodurska B, Kunej T. Long non-coding RNAs in humans: Classification, genomic organization and function. *Noncoding RNA Res.* 2025;11:313–27. (171)

Duge nekodirajuće RNA (lncRNA)

<p>MicroRNA – nekodirajući genski domaćini</p> 	<p>Domaćini miRNA gena.</p> <p>miRNA gen se nalazi unutar introna ili egzona na istom lancu. Primjer: H19 – MIR675</p>	
<p>snoRNA -genski domaćini</p> 	<p>male jezgrine RNA – nekodirajući genski domaćini</p> <p>Domaćini snoRNA gena. snoRNA gen se nalazi unutar introna ili eksona na istom lancu. Primjer: SNHG5 – SNORD50B</p>	
<p>Duge intergenske nekodirajuće RNA (lincRNA)</p> 	<p>Ne preklapaju se s genskim područjem koje kodira protein ni na jednom lancu. Ne dijele dvosmjerni promotor s genom koji kodira protein. Ne sadrže miRNA ni snoRNA gene. Primjer: LINC00208</p>	
<p>Antisense RNA</p> 	<p>Preklapaju se s genom koji kodira protein, ali na suprotnom lancu. Primjer: AGAP2-AS1</p>	
<p>Preklapajući transkripti</p> 	<p>Preklapaju se s genom koji kodira protein na istom lancu. Primjer: TGFβ2-OT1</p>	
<p>Intronski transkripti</p> 	<p>Preklapaju se s intronom gena koji kodira protein na istom lancu. Primjer: ALMS1-IT1</p>	
<p>Divergentni transkripti</p> 	<p>lncRNA geni smješteni unutar 300–500 nukleotida od gena koji kodira protein, na suprotnom lancu. Primjer: BARX1-DT</p>	
<p>Duge nekodirajuće RNA s nesistematskim simbolima</p> <p>Any genomic position</p>	<p>Genski simboli koji ne slijede sustavna pravila imenovanja. Primjer: DBET, DUX4L8</p>	
<p>Duge nekodirajuće RNA s FAM korijenskim sustavima</p> 	<p>Homologne lncRNA unutar genoma. Primjer: FAM99A, FAM99B</p>	

Slika 21. Podskupine dugih nekodirajućih RNA (lncRNA): karakteristike i genska organizacija. FAM – obitelj sličnosti sekvenci (family with sequence similarity). Genomski prikazi preuzeti su iz baze Ensembl i prikazani u pojednostavljenom obliku radi veće preglednosti, bez izmjene izvornih podataka. Modificirano prema: Chodurska B, Kunej T. Long non-coding RNAs in humans: Classification, genomic organization and function. *Noncoding RNA Res.* 2025;11:313–27. (171)



Slika 22. Shematski prikaz podskupina cirkularnih (kružnih) RNA. Egzoni – dijelovi gena koji kodiraju proteine; prikazani u obojenim blokovima (npr. Egzon 1, Egzon 3, Egzon 4). Introni – nekodirajući segmenti između egzona; prikazani sivim i zelenim blokovima. Egzoniske cirkularne RNA (EcircRNA) – sastavljene isključivo od egzona. Intronske cirkularne RNA (ciRNA) – sastavljena isključivo od introna. Egzon-intron cirkularne RNA (EiCiRNA) – nastaju kružnom ligacijom egzona s dijelovima introna zadržanima između njih. Pre-mRNA (pre-mRNA) – prekursorica molekula glasničke RNA iz koje nastaju različiti tipovi cirkularnih RNA. Modificirano prema: Chodurska B, Kunej T. Long non-coding RNAs in humans: Classification, genomic organization and function. *Noncoding RNA Res.* 2025;11:313–27. (171)

2.4.3. Epigenetski i translacijski potencijal lncRNA

Duge nekodirajuće RNA (lncRNA) predstavljaju ključnu funkcionalnu sponu između epigenetskih modifikacija i kontrole genske ekspresije. U kardiovaskularnom sustavu djeluju kao epigenetski vodiči koji regrutiraju enzime za modifikaciju kromatina – metiltransferaze, acetilaze i deacetilaze – na specifična promotorska i enhancerska mjesta, čime reguliraju ekspresiju gena odgovornih za kontraktilnost, odgovor na stres, proliferaciju i reparaciju miokarda (172, 173).

Takav oblik epigenetske kontrole objašnjava složenu i reverzibilnu prirodu srčanih remodelacijskih procesa u kojima sudjeluju lncRNA poput Chaer, MEG3 i ANRIL, koje moduliraju histonske modifikacije i transkripcijsku aktivnost u ovisnosti o metaboličkom i upalnom okruženju (172, 173).

Njihova stabilnost u cirkulaciji i tkivna specifičnost čine lncRNA atraktivnim kandidatima za biomarkere srčanih bolesti. Detektiraju se u plazmi, serumu i eksosomima te često koreliraju s težinom bolesti i strukturnim remodeliranjem srca. Klinička istraživanja pokazala su da cirkulirajuće lncRNA (primjerice LIPCAR, NRON, MHRT, H19) mogu razlikovati bolesnike sa zatajenjem srca od zdravih kontrola te predvidjeti nepovoljan ishod, čak i neovisno o standardnim biokemijskim pokazateljima (174-177).

Kombinacija profila lncRNA s konvencionalnim biomarkerima kao što su NT-proBNP i visokosenzitivni troponin povećava dijagnostičku i prognostičku vrijednost modela za prepoznavanje srčanog zatajenja, dijastoličke disfunkcije i fibrotičnih komplikacija (178-180).

2.4.4. Uloga lncRNA u kardiovaskularnim bolestima

Kardiovaskularne bolesti ostaju vodeći uzrok smrtnosti unatoč napretku dijagnostike i liječenja. U tom kontekstu ulogu sve više preuzimaju duge nekodirajuće RNA kao slojeviti regulatori srčane biologije (181). Kao što je već navedeno lncRNA koordiniraju transkripciju i epigenetske procese, djeluju kao „spužve” za miRNA te posreduju u remodeliranju kromatina, čime utječu na proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje kardiomiocita te na fibrozu i električnu spregu miokarda (181). U eksperimentalnim i kliničkim modelima promjene ekspresije specifičnih lncRNA povezane su s razvojem i ishodom zatajenja srca, poremećaja provođenja i aritmija (osobito fibrilacije atrijske), koronarne bolesti i ishemijsko-reperfuzijske ozljede, infarkta miokarda, hipertrofije i dijabetičke kardiomiopatije (181). Pritom se ističe tkivno- i stanično-specifična regulacija te pojavnost u cirkulaciji, što pojedinim lncRNA daje potencijal dijagnostičkih biljega i terapijskih meta (181). Ipak, unatoč brzom porastu dokaza, velik dio funkcionalnih mehanizama u ljudskom srcu ostaje nerazjašnjen, a translacija u kliničku praksu zahtijeva standardizirane modele, validaciju biomarkera i razvoj sigurnih strategija modulacije ekspresije (181).

U zdravom srcu lncRNA sudjeluju u regulaciji razvoja i diferencijacije kardiomiocita, sazrijevanju provođenja impulsa i održavanju strukturne stabilnosti miokarda (181). Tijekom embriogeneze njihova ekspresija je izrazito dinamična i vremenski usklađena s programima transkripcije koji definiraju srčane linije (181).

Baze podataka poput NONCODE identificirale su više od 170 000 lncRNA transkripata u ljudi, a tisuće njih pokazuje visoku razinu ekspresije u miokardnim tkivima, što upućuje na njihovu evolucijski očuvanu ulogu u homeostazi srca (181). Eksperimentalna istraživanja potvrdila su da se tijekom stanične diferencijacije i odgovora na stres mijenja transkripcijski profil brojnih lncRNA, pri čemu one djeluju kao cis- ili trans-regulatori ekspresije gena uključenih u kontraktilnost, metabolizam i međustaničnu signalizaciju (181).

U kontekstu bolesti, sve je više dokaza da lncRNA mogu sudjelovati u patogenezi srčanih disfunkcija modulirajući ključne stanične procese — hipertrofiju, apoptozu, nekrozu, autofagiju i fibrozu (181). Njihova ekspresija ovisi o tipu stanice i stadiju bolesti, a manipulacija razine pojedinih lncRNA eksperimentalno pokazuje učinak na težinu i ishod patoloških procesa poput ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja, srčanog zatajenja i dijabetičke kardiomiopatije (181). Određene lncRNA, poput H19, MIAT, MALAT1, ANRIL i KCNQ1OT1, očituju konzervirane obrasce ekspresije između vrsta, što ih čini atraktivnim kandidatima za translacijska istraživanja i razvoj terapijskih pristupa temeljenih na inhibiciji, nadomještanju ili RNA-interferenciji (181).

Unatoč velikom broju identificiranih molekula, poznavanje njihovih funkcionalnih mreža u srčanim bolestima još je u početnoj fazi. Potrebno je integrirati podatke o lokalizaciji, interakcijama s proteinima i miRNA te epigenetskom kontekstu u kojem djeluju. Razumijevanje tih mehanizama moglo bi otvoriti mogućnosti za razvoj inovativnih terapija usmjerenih na specifične lncRNA i njihov učinak na srčano tkivo, čime bi se unaprijedila dijagnostika, prognoza i liječenje kardiovaskularnih bolesti (181).

Posebno zanimljivo područje istraživanja čini uloga lncRNA u zatajenju srca (HF), stanju koje predstavlja završni ishod većine kardiovaskularnih patologija. U srcu oboljelih bolesnika zabilježene su značajne promjene u ekspresiji više lncRNA, koje sudjeluju u remodeliranju miokarda, upali i regulaciji epigenetskih modifikacija.

Primjerice, HEAT2 je nuklearno lokalizirana lncRNA čija je razina povišena u perifernoj krvi bolesnika sa zatajenjem srca, a povezuje se s histonskom modifikacijom H3K27me3 i represijom promotora ključnih gena za kontraktilnu funkciju (181).

S druge strane, H19 i njezin derivat miR-675 pokazuju deregulaciju u zatajenju srca te moduliraju ekspresiju proapoptotskih i antifibrotičnih signalnih putova, dok GASL1 djeluje protektivno inhibirajući apoptozu kardiomiocita putem inaktivacije TGF- β 1 signalizacije (181). Ovi nalazi upućuju da lncRNA nisu pasivni markeri bolesti, nego aktivni sudionici u progresiji srčane disfunkcije te potencijalne mete za gensku ili farmakološku modulaciju (181).

U području srčanog provođenja i aritmija, identificirane su lncRNA koje reguliraju električnu stabilnost miokarda. CCRR (cardiac conduction regulatory RNA) prepoznata je kao antiaritmijaska lncRNA čije smanjene razine uzrokuju oštećenje međustaničnih spojeva i povećanu aritmogenost, dok njezino povećanje obnavlja interkalacijske diskove i stabilizira proteinske komplekse vezane uz connexin-43 (181).

Slično tome, KCNQ1OT1 posreduje u razvoju fibrilacije atrija putem regulacije osi YY1-miR-384-CACNA1C, čime izravno utječe na ionske kanale i provođenje impulsa (181). Takvi mehanizmi ukazuju na to da poremećaji u ekspresiji lncRNA mogu pridonijeti nastanku aritmija kroz promjene u strukturnom i električnom remodeliranju srčanog tkiva (181).

U koronarnoj bolesti i ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi (I/R) brojna su istraživanja dokazala da lncRNA moduliraju odgovor kardiomiocita na hipoksiju i oksidativni stres (181). SENCER, citoplazmatska lncRNA selektivna za vaskularne stanice, održava kontraktilni fenotip glatkih mišićnih stanica krvnih žila, dok antisensni transkript ANRIL sudjeluje u razvoju ateroskleroze i koronarne bolesti putem regulacije INK4/ARF lokusa (181).

Nadalje, NEAT1, MHRT, SNHG1 i H19 povezane su s procesima apoptoze, autofagije i mitohondrijske disfunkcije tijekom reperfuzije, pri čemu H19-ovisna os miR-675-PPAR α ima ključnu ulogu u oštećenju miokarda nakon hipoksije. Ovi rezultati naglašavaju važnost lncRNA u prilagodbi srčanih stanica na ishemijski stres i njihovu moguću primjenu kao biomarkera ishemijskog oštećenja (181).

Jedno od najintenzivnije istraživanih područja odnosi se na infarkt miokarda (MI) i posljedičnu reparaciju tkiva. Tijekom akutnog infarkta dolazi do masovne smrti kardiomiocita i aktivacije reparativnih mehanizama u kojima lncRNA imaju višestruke funkcije – od regulacije apoptoze i fibroze do kontrole angiogeneze (181).

Više lncRNA pokazuje značajnu promjenu ekspresije u plazmi i tkivu bolesnika s MI, uključujući MIAT, LIPCAR, UCA1, MALAT1, KCNQ1OT1 i ANRIL, koje se smatraju potencijalnim biomarkerima bolesti i prediktorima disfunkcije lijeve klijetke (181).

LncRNA MEG3, primjerice, inducira apoptozu kardiomiocita nakon infarkta putem interakcije s kompleksom p53–FUS, dok eksperimentalno utišavanje MEG3 značajno smanjuje staničnu smrt i poboljšava kontraktilnu funkciju (181).

S druge strane, MIAT djeluje kao pro-fibrotična molekula čije snižavanje ublažava fibroblastnu proliferaciju i intersticijsku fibrozu, a ROR i GAS5 posreduju u zaštiti kardiomiocita od hipoksičnih oštećenja putem spužvanja miRNA i regulacije signalnih putova PI3K/AKT i p53 (181).

Posebno zanimljiva je lncRNA HOTAIR, čije su razine u serumu bolesnika s akutnim infarktom smanjene; eksperimentalno pojačanje njezine ekspresije pokazalo je antiapoptotski učinak preko modulacije miRNA-1, što upućuje na moguću kardioprotektivnu funkciju (181).

U okviru dijabetičke kardiomiopatije (DCM), lncRNA se pojavljuju kao ključni regulatori staničnog odgovora na kroničnu hiperglikemiju i oksidativni stres (181). Patofiziološki mehanizmi uključuju poremećaj energetskeg metabolizma, fibrozu i apoptozu, a brojne lncRNA posreduju u tim procesima (181).

H19 je jedna od najvažnijih – njezina se ekspresija u srcu dijabetičkih modela smanjuje, dok eksperimentalno povećanje ublažava oksidativni stres, upalu i autofagiju. Mehanizam djelovanja uključuje kompleks H19/miR-675, koji cilja VDAC1 i Di-Ras-3, čime se sprječava mitohondrijska apoptoza i potiče fosforilacija mTOR-a (181).

Slično tome, MALAT1 je u DCM-u značajno povišena i pridonosi upali i apoptozi kardiomiocita; njezino utišavanje dovodi do smanjenja oštećenja i poboljšanja funkcije lijeve klijetke(181). MIAT, identificirana u studijama infarkta, u DCM-u djeluje kao spužva za miR-22-3p, regulirajući ekspresiju DAPK2, dok KCNQ1OT1 pojačava piroptozu ciljanjem osi miR-214-3p/CASP1(181). Osim njih, SENCER modulira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica, MT-LIPCAR pokazuje korelaciju s dijastoličkom disfunkcijom u bolesnika s dijabetesom, a ANRIL se povezuje s genetskom osjetljivošću za razvoj dijabetičke i koronarne kardiopatije (181).

U kontekstu srčane hipertrofije i remodeliranja, lncRNA djeluju kao finoregulacijski elementi transkripcijske mreže koja nadzire stanični rast i promjenu fenotipa. Identificirane su brojne srčano-specifične lncRNA koje sudjeluju u hipertrofiji – među njima Chaer, Chast, MHRT i CHRFB (181).

Chaer definira epigenetsku kontrolnu točku patološke hipertrofije interakcijom s kompleksom PRC2, dok Chast potiče fibrozu i dilataciju klijetki (181). Nasuprot tome, MHRT, koja potječe iz lokusa Myh7, ima zaštitni učinak jer smanjuje patološko zadebljanje stijenke, a CHRFB regulira ekspresiju miR-489 i njegovog cilja Myd88, čime kontrolira odgovor na stres preopterećenja (181).

Novije lncRNA, poput TINCR, MAGI1-IT1 i SNHG7, dodatno proširuju spektar molekula uključenih u hipertrofiju djelovanjem na osi Wnt/ β -katenin, miR-302e/DKK1 i SDAD1, potvrđujući složenost lncRNA mreže u remodeliranju miokarda (181).

Sveukupno, lncRNA predstavljaju ključne epigenetske i posttranskripcijske regulatore koji povezuju genetske, metaboličke i okolišne čimbenike u patogenezi srčanih bolesti. Njihova stabilnost u biološkim tekućinama, tkivna specifičnost i mogućnost ciljane manipulacije čine ih privlačnim kandidatima za biomarkere i terapijske mete (181).

Buduća istraživanja trebala bi usmjeriti napore prema mapiranju funkcionalnih mreža lncRNA, razvoju validiranih dijagnostičkih panela i translaciji eksperimentalnih nalaza u kliničke primjene (181).

Funkcija prethodno spomenutih lncRNA u kardiovaskularnom sustavu sažeto su prikazane u Tablici 7, 8, 9 i Slici 23 i 24.

Tablica 7. Pregled funkcija dugih nekodirajućih RNA (lncRNA) u srčanim bolestima

Srčana bolest	lncRNA (primjeri)	Glavne biološke funkcije / mehanizmi djelovanja	Ključne reference
Zatajenje srca (HF)	HEAT2, H19/miR-675, GASL1	HEAT2 povezana s epigenetskom represijom gena (H3K27me3); H19/miR-675 deregulirana u HF – utječe na apoptozu i fibrozu; GASL1 smanjuje apoptozu inhibicijom TGF-β1 puta	(182-184)
Srčano provođenje i aritmije (AF)	CCRR, KCNQ1OT1, CR608741, TCONS_00075467, TCONS_00032546, TCONS_00026102	CCRR stabilizira interkalacijske diskove i sprečava aritmije; KCNQ1OT1 regulira ionske kanale (CACNA1C) putem miR-384; ostale lncRNA povezane s TGF-β/Smad signalizacijom i remodeliranjem atrija	(173, 185-193)
Koronarna bolest (CAD) / ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (I/R)	SENCR, ANRIL, NEAT1, MHRT, SNHG1, H19/miR-675	SENCR održava kontraktilni fenotip VSMC; ANRIL povezan s INK4 lokusom i aterosklerozom; NEAT1 i SNHG1 reguliraju apoptozu; H19/miR-675 osi sudjeluje u PPARα regulaciji tijekom I/R ozljede	(194-198)
Infarkt miokarda (MI)	MIAT, LIPCAR, UCA1, MALAT1, KCNQ1OT1, ANRIL, MEG3, ROR, GAS5, HOTAIR, PCFL, TTTY15, MIRT2, MHRT	MIAT i MEG3 potiču fibrozu i apoptozu; HOTAIR i ROR djeluju protektivno regulacijom miRNA-1 i miR-145; GAS5, PCFL i TTTY15 sudjeluju u staničnoj smrti i reparaciji tkiva; MHRT smanjuje oksidativni stres i sprječava fibrozu	(176, 189, 195, 198-212)
Dijabetička kardiomiopatija (DCM)	H19/miR-675, MALAT1, MIAT, KCNQ1OT1, SENCER, MT-LIPCAR, ANRIL	H19 smanjuje oksidativni stres i autofagiju (VDAC1, Di-Ras3); MALAT1 i MIAT povećane u DCM – potiču apoptozu; KCNQ1OT1 posreduje piroptozu (miR-214-3p/CASP1); MT-LIPCAR biomarker dijastoličke disfunkcije	(175, 213-235)
Srčana hipertrofija / remodeliranje	Chaer, Chast, MHRT, CHRF, TINCR, MAGI1-IT1, SNHG7	Chaer regulira PRC2 i epigenetski kontrolira hipertrofiju; Chast potiče fibrozu; MHRT i CHRF imaju zaštitne učinke; TINCR i MAGI1-IT1 djeluju preko Wnt/β-katenin signalizacije; SNHG7 stabilizira SDAD1 mRNA	(173, 177, 236-241)

Modificirano prema: Wang Y, Sun X. The functions of lncRNA in the heart. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;168:108249.(181).

Tablica 8. Sažetak najvažnijih mehanizama djelovanja pojedinih lncRNA u srcu

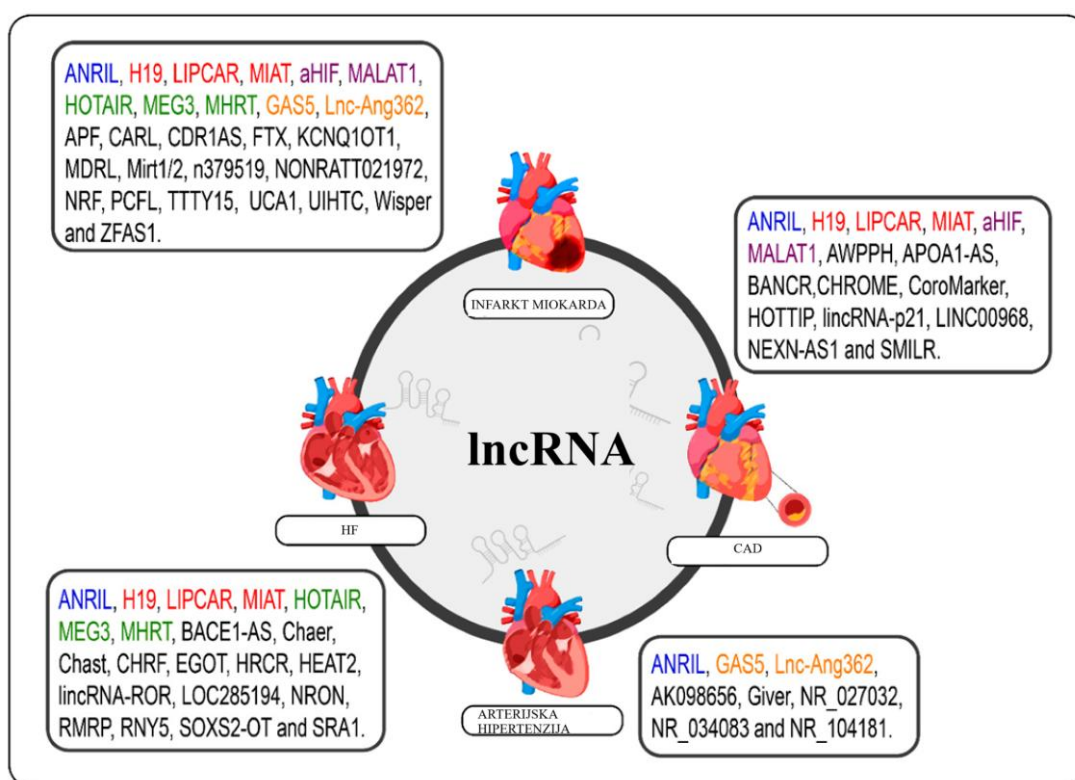
lncRNA	Dominantna lokalizacija	Glavna funkcija u srcu	Povezane signalne osi / ciljevi
H19	Citoplazma	Anti-apoptotski i antioksidativni učinak; ublažava DCM i I/R ozljedu	miR-675 → PPARα, VDAC1, Di-Ras3
MALAT1	Jezgra	Regulira upalu i apoptozu u DCM; povezana s splicing domenama	NF-κB, miR-133, inflamatorni geni
MIAT	Jezgra / citoplazma	Potiče fibrozu i apoptozu nakon MI i u DCM	miR-22-3p → DAPK2; miR-150 → kolagen
ANRIL	Jezgra	Regulira INK4 lokus; sudjeluje u CAD, T2DM i HF	p15INK4b/p16INK4a; miR-7-5p/SIRT1
KCNQ1OT1	Jezgra	Upravlja ionskim kanalima i piroptozom	miR-384/CACNA1C; miR-214-3p/CASP1
Chaer	Jezgra	Epigenetska kontrola hipertrofije	PRC2 kompleks (EZH2, H3K27me3)
Chast	Citoplazma	Promovira fibrozu i dilataciju klijetki	Wnt/β-katenin put
MHRT	Jezgra	Protektivna, sprječava hipertrofiju i fibrozu	BRG1/Myh7 signalni kompleks
GASL1 / GAS5	Citoplazma	Smanjuju apoptozu i oštećenje miokarda	TGF-β1; miR-142-5p/TP53INP1
MT-LIPCAR	Mitohondrij / plazma	Biomarker dijastoličke disfunkcije; odraz metaboličkog stresa	Korelira s inzulinom, HDL-C i volumenom potkožnog masnog tkiva

Modificirano prema: Wang Y, Sun X. The functions of lncRNA in the heart. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;168:108249.(181).

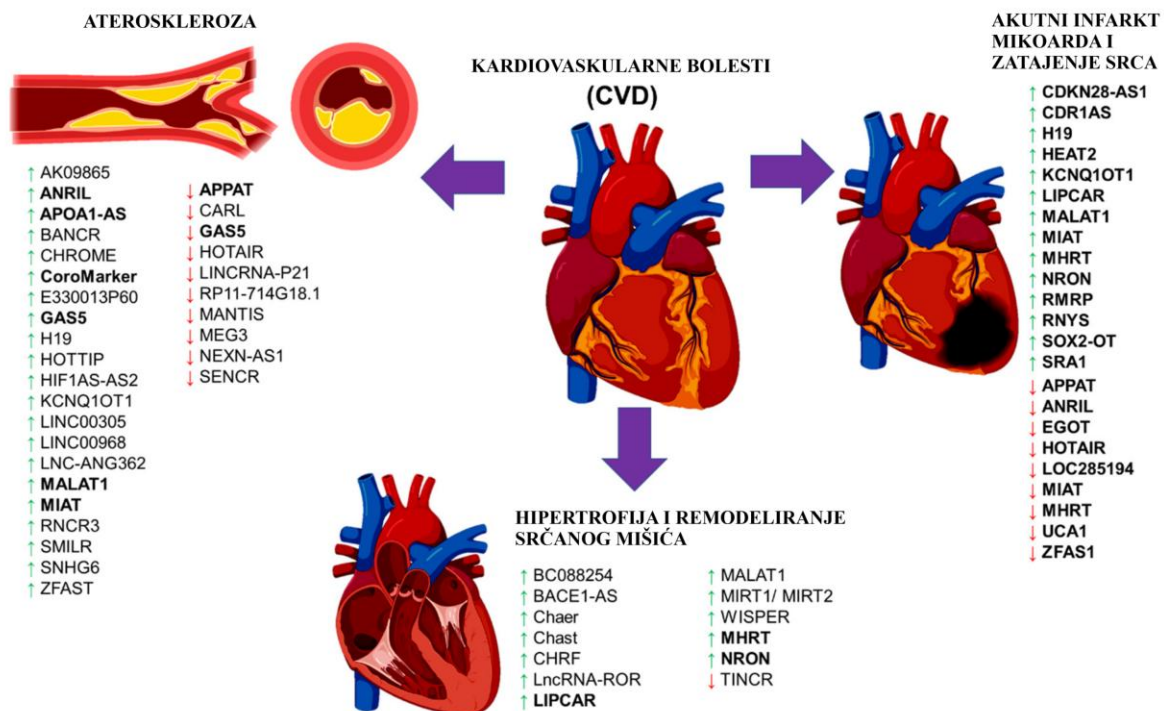
Tablica 9. Potencijalne kliničke primjene lncRNA u kardiovaskularnoj medicini

Primjena	Primjeri lncRNA	Napomena / potencijal
Dijagnostički biomarkeri	MIAT, LIPCAR, UCA1, H19, MT-LIPCAR	Detekcija u plazmi kod MI i DCM; povezanost s ishodom i disfunkcijom LV
Prognoza bolesti	ANRIL, KCNQ1OT1, Chaer	Predviđanje progresije CAD i hipertrofije; povezanost s genetskim polimorfizmima
Terapijski ciljevi	H19, MALAT1, MHRT, CHRFB, CCRB	Eksperimentalno utišavanje / nadomještanje; učinci na apoptozu i provođenje
Epigenetska terapija	Chaer, MEG3, ANRIL	Modulacija histonskih modifikacija i transkripcijskih kompleksa

Modificirano prema: Wang Y, Sun X. The functions of lncRNA in the heart. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;168:108249.(181).



Slika 23. Duge nekodirajuće RNA (lncRNA) pokazuju diferenciranu ekspresiju u nizu kardiovaskularnih bolesti, uključujući zatajenje srca, infarkt miokarda, koronarnu bolest srca i arterijsku hipertenziju. Brojne studije potvrdile su da se isti transkripti mogu pojavljivati u različitim srčanim patologijama, što upućuje na njihovu zajedničku regulatornu ulogu u srčanom remodeliranju, upali i staničnom odgovoru na stres. lncRNA označene plavom bojom istodobno su prisutne u infarktu miokarda, koronarnoj bolesti (CAD; engl. coronary artery disease), zatajenju srca (HF; engl. heart failure) i arterijskoj hipertenziji, dok su one označene crvenom zajedničke za infarkt miokarda, koronarnu bolest i zatajenje srca. Molekule prikazane zelenom bojom karakteristične su za infarkt miokarda i zatajenje srca, narančaste su povezane s infarktom miokarda i arterijskom hipertenzijom, dok se ljubičaste pojavljuju u infarktu miokarda i koronarnoj bolesti. Ovakva preklapanja u ekspresijskim obrascima odražavaju konvergenciju patofizioloških mehanizama — uključujući oksidativni stres, fibrozu, apoptozu i epigenetsku regulaciju gena — koji su zajednički većem broju kardiovaskularnih poremećaja. Stoga lncRNA predstavljaju središnje molekularne posrednike između različitih kliničkih entiteta i potencijalne terapijske mete s translacijskim značajem za ranu dijagnostiku i personalizirano liječenje srčanih bolesti. Modificirano prema: Correia CCM, Rodrigues LF, de Avila Pelozin BR, Oliveira EM, Fernandes T. Long Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases: Potential Function as Biomarkers and Therapeutic Targets of Exercise Training. *Noncoding RNA.* 2021;7(4). (242)



Slika 24. Shema prikazuje uključenost dugih nekodirajućih RNA (lncRNA) u različite komplikacije kardiovaskularnih bolesti (CVD). Na dijagramu su prikazane prethodno opisane lncRNA molekule povezane s aterosklerozom, remodeliranjem i hipertrofijom srčanog mišića, infarktom miokarda te zatajenjem srca. Zelena strelica okrenuta prema gore označava povećanu ekspresiju (uparenje) lncRNA, dok crvena strelica okrenuta prema dolje označava smanjenu ekspresiju (downregulaciju). lncRNA prikazane podebljanim slovima prisutne su u cirkulacijskim biološkim uzorcima (plazma, serum, krvne stanice) te stoga imaju dijagnostički i prognostički potencijal kao biomarkeri srčanih bolesti. Modificirano prema: Ismail N, Abdullah N, Abdul Murad NA, Jamal R, Sulaiman SA. Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) in Cardiovascular Disease Complication of Type 2 Diabetes. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(1). (243)

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Nacrt istraživanja

Ovo prospektivno istraživanje obuhvatilo je analizu:

- ekspresijskog obrasca regulatornih nekodirajućih RNA molekula u patološki promijenjenom tkivu aortalnih zalistaka srca, izoliranih iz pacijenata s teškim oblikom kalcificirajuće aortalne stenozе (CAVS, n = 75) kod kojih je bila indicirana kirurška zamjena aortalnog zalistka, u usporedbi s kontrolnim, patološki nepromijenjenim uzorcima aortalnih zalistaka (eksplantirano srce, n = 25) pacijenata kod kojih je, zbog drugih oblika kardiomiopatije, bila indicirana transplantacija srca.
- ekspresijskog obrasca regulatornih nekodirajućih RNA molekula u perifernoj krvnoj plazmi bolesnika s teškim oblikom CAVS-a (n = 75), u usporedbi s njihovom ekspresijom u plazmi zdravih kontrolnih ispitanika (n = 100) uključenih u ovo istraživanje.
- ekspresijskog obrasca regulatornih nekodirajućih RNA molekula u perifernoj krvnoj plazmi bolesnika s blagim (n = 25) i umjerenim oblikom CAVS-a (n = 34), u usporedbi s njihovom ekspresijom u plazmi zdravih kontrolnih ispitanika i CAVS pacijenata s teškim oblikom bolesti kod kojih je bila indicirana kirurška zamjena aortalnog zalistka.

Napomena: broj analiziranih uzoraka periferne krvi pacijenata s blagim i umjerenim oblikom CAVS-a nešto je niži od početno planiranog (blagi oblik CAVS-a, n = 30; umjereni oblik CAVS-a, n = 45) te su u analizu uključeni samo pacijenti s blagim i umjerenim oblikom CAVS-a koji su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u studiji i za koje su prikupljeni svi relevantni demografski klinički i ehokardiografski podaci.

Istraživanje je provedeno u sklopu znanstvenog projekta: „Karakterizacija biomarkerskog potencijala dugih nekodirajućih RNA molekula u bolestima aortalnih zalistaka srca“, odobrenog 18. lipnja 2019. godine od strane:

- Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Dubrava
- Etičkog povjerenstva medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Zagreb 12. 12. 2019; Klasa:841-01/19-02/01)

Svi ispitanici uključeni u istraživanje potpisali su informirani pristanak, a istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom.

Klinički dio istraživanja

Klinički dio istraživanja proveden je u Kliničkoj bolnici Dubrava, Zagreb, i obuhvaćao je:

- prikupljanje relevantnih demografskih i kliničkih podataka ispitanika
- prikupljanje i patohistološku analizu uzoraka tkiva
- biokemijsku analizu krvi
- ehokardiografsko ispitivanje
- određivanje CT kalcijskog zbroja (Ca score)

U provedbu kliničkog dijela bili su uključeni sljedeći odjeli i zavodi:

- Zavod za kardijalnu i transplantacijsku kirurgiju
- Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
- Klinički zavod za patologiju i citologiju
- Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju
- Klinika za bolesti srca i krvnih žila

Eksperimentalni dio istraživanja

Eksperimentalni dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu, Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a obuhvatio je:

- obradu tkiva i uzoraka krvi
- izolaciju i kvantifikaciju ukupne RNA
- qRT-PCR analizu (lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu; *engl. quantitative real-time polymerase chain reaction*)
- analizu proteinske koncentracije biomarkera CRP, troponina i NT-proBNP u perifernoj krvi (plazmi)
- statističku obradu rezultata

4.2. Prikupljanje i obrada uzoraka tkiva

Prospektivni uzorci tkiva aortalnih zalistaka pacijenata s kalcificirajućom aortalnom stenozom (CAVS) prikupljeni su u razdoblju od 1. siječnja 2020. do 29. kolovoza 2024. u operacijskoj sali Zavoda za kardijalnu i transplantacijsku kirurgiju Kliničke bolnice Dubrava, neposredno nakon završetka operativnog zahvata i tijekom rutinske obrade tkiva u okviru zakonom propisanog postupka patohistološke analize.

Dio tkiva izdvojenog za potrebe istraživanja, neposredno nakon ekscizije, pohranjen je na sobnoj temperaturi u otopini RNAlater (namijenjenoj stabilizaciji RNA i proteina), dok je drugi dio uzorka uklopljen u standardne parafinske blokove za tkivnu lokalizaciju ekspresije ciljanih lncRNA metodom in situ hibridizacije (ViewRNA™ ISH).

Svi uzorci pohranjeni u RNAlater otopini procesuirani su i prebačeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ unutar 2 sata od izuzimanja.

Kontrolni uzorci trikuspidalnih aortalnih zalistaka srca prikupljeni su u istom vremenskom razdoblju (1. siječnja 2020. – 29. kolovoza 2024.) u operacijskoj sali istog zavoda, nakon izvršene eksplantacije srca primatelja i tijekom rutinske patohistološke obrade tkiva.

Kao i u slučaju patološki promijenjenih uzoraka (CAVS), dio kontrolnog tkiva je neposredno po izuzimanju pohranjen u otopini RNAlater, dok je drugi dio uklopljen u parafinske blokove i korišten za tkivnu lokalizaciju ekspresije ciljanih lncRNA metodom in situ hibridizacije (ViewRNA™ ISH).

Od svakog CAVS bolesnika (blagi, umjereni i teški oblik bolesti) uključenog u istraživanje u odgovarajuće EDTA tubice (2 x 5 ml) uzeti su i predoperativni uzorci (2 x 5 ml) venske krvi. Uzorci venske krvi (2 x 5 ml) uzet su i od dobrovoljnih kontrolnih ispitanika obuhvaćenih istraživanjem.

Napomena: U sklopu istraživanja planirano je i prikupljanje postoperativnih uzoraka venske krvi (plazma) CAVS 6–12 mjeseci nakon kirurške zamjene aortalnog zalistka (AVR; engl. aortic valve replacement). Međutim, unatoč predviđenom planu istraživanja, analiza navedenih uzoraka nije obuhvaćena ovom studijom budući je njihovo prikupljanje u adekvatnom broju bilo onemogućeno uslijed pandemije bolesti COVID-19 (SARS-CoV-2).

4.3. Demografski i klinički podaci ispitanika

Demografski i klinički podaci pacijenata s kalcificirajućom aortalnom stenozom (CAVS), kod kojih je bila indicirana kirurška zamjena aortalnog zalistka, kao i podaci kontrolnih ispitanika kod kojih je zbog oboljenja srčanog mišića druge etiologije bila indicirana transplantacija srca, prikupljeni su tijekom rutinskih kliničkih postupaka, pregleda te laboratorijskih i patohistoloških analiza.

Prikupljanje i obrada podataka provedeni su u okviru Kliničke bolnice Dubrava (Zagreb), i to u sljedećim ustrojbenim jedinicama:

- Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
- Klinika za bolesti srca i krvnih žila
- Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju
- Zavod za kardijalnu i transplantacijsku kirurgiju
- Klinički zavod za patologiju i citologiju

4.4. Izdvajanje plazme

Uzorci venske krvi prikupljeni su u EDTA antikoagulacijske epruvete (BD Vacutainer®, 2 x 5 mL) tijekom rutinskih kliničkih postupaka, neposredno prije operativnog zahvata ili dijagnostičke obrade. Nakon prikupljanja, epruvete su nježno invertirane (5–10 puta) radi homogenizacije s antikoagulansom i pohranjene na 4 °C do centrifugiranja, koje je provedeno unutar 1 sata od uzorkovanja.

Primarno centrifugiranje

Centrifugiranje je provedeno pri $1\ 500 \times g$ tijekom 15 minuta na 4 °C kako bi se odvojila plazma od stanične komponente krvi. Dobiveni supernatant (plazma) pažljivo je prebačen u nove, sterilne RNase-free epruvete, pazeći da se ne naruši sloj leukocita (buffy coat).

Sekundarno centrifugiranje

Za dodatno uklanjanje zaostalih staničnih elemenata, plazma je ponovno centrifugirana pri $12\ 000 \times g$ tijekom 10 minuta na $4\ ^\circ\text{C}$. Nakon toga je dobiven bistri supernatant, koji je alikvotiran u volumene od 400–500 μL .

Pohrana

Alikvoti plazme pohranjeni su na $-80\ ^\circ\text{C}$ do daljnje uporabe za:

- izolaciju ukupne RNA uporabom TRIzol LS reagensa,
- te kvantifikacijsku analizu biomarkera (ELISA: CRP, troponin, NT-proBNP).

Svaka epruveta bila je jasno označena jedinstvenim ID brojem ispitanika, datumom i vrstom analize, a svi uzorci evidentirani su u elektroničkoj bazi podataka Laboratorija za epigenetiku i molekularnu medicinu.

4.5. Kvantifikacija CRP, troponina i NT-proBNP u plazmi (ELISA)

Koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP), srčanog troponina (cTnI ili cTnT; prema dostupnosti kita) i N-terminalnog pro-B-natriuretskog peptida (NT-proBNP) određene su u plazmi (EDTA) metodom enzimski vezanog imunosorbentnog testa (ELISA), prema uputama proizvođača. Uzorci su bili alikvotirani i pohranjeni na $-80\ ^\circ\text{C}$; prije analize odmrznuti jednom, centrifugirani ($10\ 000 \times g$, 5 min, $4\ ^\circ\text{C}$) i analizirani bez staničnih ostataka.

Priprema i mjerenje. Za svaki analit pripremljena je standardna krivulja (najmanje 6–8 točaka) u odgovarajućem puferu; uzorci su mjereni u duplikatu. Tipične razrijeđenja: CRP 1:100–1:5 000 (ovisno o kitu i očekivanom rasponu), troponin često nerazrijeđen ili 1:2, NT-proBNP nerazrijeđen do 1:4. Nakon inkubacija i pranja prema protokolu, dodan je HRP-konjugat i supstrat TMB; reakcija je zaustavljena kiselinom te je apsorbancija očitana na 450 nm uz referentni kanal 570–620 nm (mikropločasti čitač). Koncentracije su izračunate 4-parametarskom logističkom regresijom (4PL) uz automatsku korekciju za razrjeđenje.

Kontrola kvalitete. U svakoj ploči korištene su unutarnje kontrole (niska/srednja/visoka) i blank. Kao kriteriji prihvata korišteni su: R^2 krivulje $\geq 0,99$, intra-assay CV $\leq 10\ \%$, inter-assay CV $\leq 15\ \%$, oporavak (spike-recovery) 80–120 % i linearnost pri razrjeđenju $r \geq 0,98$.

Uzorci izvan raspona kvantifikacije ponovno su analizirani uz dodatna razrjeđenja. Granice detekcije/kvantifikacije (LOD/LOQ) preuzete su iz specifikacija pojedinog kita i potvrđene internom validacijom (blank + niske kontrole, $n \geq 20$).

Izještavanje. Rezultati su izraženi u mg/L (CRP), ng/L (troponin) i ng/L ili pmol/L (NT-proBNP; uz konverziju prema kitu). Za statističku analizu korištene su log-transformacije kada je bilo potrebno (asimetrične distribucije).

4.6. qRT-PCR analiza ekspresije ciljanih lncRNA molekula

4.6.1. Izolacija ukupne RNA iz tkiva aortalnih zalistaka srca

Izolacija ukupne RNA iz tkiva aortalnih zalistaka provedena je uporabom TRIzol™ reagensa (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), prema modificiranom standardnom protokolu proizvođača, optimiziranom za fibro-kalcificirana srčana tkiva visoke čvrstoće.

Priprema i homogenizacija uzoraka

Tkiva aortalnih zalistaka pohranjena u otopini RNAlater prethodno su otopljena na sobnoj temperaturi, a zatim homogenizirana ručno pomoću sterilnog mortara i pistila u prisutnosti tekućeg dušika, sve dok nije postignuta prahasta konzistencija tkiva. Dobiveni homogeni prah odmah je prenesen u sterilne RNase-free mikrocentrifugalne epruvete s 1 mL TRIzol reagensa na svakih ≤ 100 mg tkiva, uz temeljito pipetiranje i miješanje do potpune liziranja.

Fazno razdvajanje

Nakon homogenizacije, uzorcima je dodano 200 μ L kloroforma na 1 mL TRIzol-a. Uzorci su intenzivno vorteksirani i inkubirani 3–5 minuta na sobnoj temperaturi.

Centrifugiranjem pri $12\,000 \times g$ tijekom 15 minuta na 4 °C postignuto je razdvajanje triju faza: vodene (RNA), interfacijalne (DNA) i organske (proteini). Vodena faza je pažljivo prenesena u novu RNase-free epruvetu.

Precipitacija RNA

U vodenoj fazi RNA je precipitirana dodatkom 0,5 mL izopropanola na 1 mL početnog TRIzol volumena. Uzorci su inkubirani preko noći na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i zatim centrifugirani pri $12\ 000 \times g$ tijekom 15 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobiveni RNA pelet ispran je dva puta s 1 mL 75%-tnog etanola, kratko vorteksiran i ponovno centrifugiran ($7\ 500 \times g$, 5 minuta, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Otapanje i pohrana RNA

Pelet ukupne RNA je sušen na sobnoj temperaturi (3–5 min) te otopljen u 20–30 μL RNase-free vode (Ambion™). Koncentracija i čistoća RNA određene su spektrofotometrijski na NanoDrop™ ND-1000 instrumentu (Thermo Fisher Scientific) pri valnim duljinama 260/280 i 260/230 nm. Uzorci su pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize.

4.6.2. Izolacija ukupne RNA iz plazme

Izolacija ukupne RNA iz plazme perifernog venskog uzorka provedena je uporabom reagensa TRIzol™ LS (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), prema modificiranom protokolu proizvođača, optimiziranom za male količine cirkulirajuće RNA.

Priprema uzoraka

Za svaku izolaciju korišteno je 400 μL plazme pohranjenog na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzorci su nakon odmrzavanja kratko centrifugirani ($3\ 000 \times g$, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) radi uklanjanja staničnih ostataka i zatim preneseni u RNase-free epruvete.

Dodano je 1200 μL TRIzol LS reagensa (omjer 1 : 3 plazma : TRIzol), uz temeljito pipetiranje i miješanje do homogenosti. Uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi radi potpunog liziranja i inaktivacije RNaza.

Fazno razdvajanje

Dodano je 200 μL kloroforma na 1 mL TRIzol LS-a, uz intenzivno vorteksiranje i inkubaciju 3 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja ($12\ 000 \times g$, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) formirane su tri faze, a vodena faza (gornji sloj) pažljivo je prenesena u novu RNase-free epruvetu.

Precipitacija RNA

U vodenoj fazi RNA je precipitirana dodatkom 1 volumena izopropanola te 1 μL glikogena (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) kao nosioca RNA. Uzorci su lagano promiješani i inkubirani preko noći na -80 $^{\circ}\text{C}$, a zatim centrifugirani pri $12\,000 \times g$ tijekom 15 min na 4 $^{\circ}\text{C}$.

Dobiveni pelet RNA ispran je dva puta s 1 mL 75%-tnog etanola, kratko vorteksiran i ponovno centrifugiran ($7\,500 \times g$, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$).

Otapanje i pohrana RNA

Nakon kratkog sušenja (3–5 min) pelet je otopljen u 15–20 μL RNase-free vode (Ambion™). Uzorci su kvantificirani spektrofotometrijski (NanoDrop™ ND-1000, Thermo Fisher Scientific) pri valnim duljinama 260/280 i 260/230 nm te pohranjeni na -80 $^{\circ}\text{C}$ do reverzne transkripcije.

Napomena o pročišćavanju RNA

Zbog niske koncentracije i mogućih tragova organskih nečistoća, dio izoliranih uzoraka dodatno je pročišćen kolonskim postupkom uporabom Ambion™ PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), prema modificiranom protokolu (alkoholni prijenos + DNase tretman). Takav kombinirani pristup (TRIzol + kolonska pročišćavanja) omogućio je povećanje čistoće i stabilnosti RNA dobivene iz plazme.

Kontrola kvalitete

Koncentracija RNA bila je u rasponu od 1–15 $\text{ng}/\mu\text{L}$, s omjerima A260/A280 između 1,7 i 2,0, što je smatrano zadovoljavajućom kvalitetom za reverznu transkripciju i qRT-PCR analizu niskopristupnih lncRNA transkripata.

4.6.3. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija ukupne RNA provedena je uporabom PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc., Japan). Reakcijska smjesa pripremljena je na ledu u ukupnom volumenu od 20 µL, i sadržavala je 4 µL 5× PrimeScript RT Master Mix, uz dodatak 16 mikrolitara ukupne RNA (do 500 ng).

Reakcija je provedena na uređaju CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA) prema sljedećem temperaturnom profilu:

- 37 °C tijekom 15 minuta (sinteza cDNA)
- 85 °C tijekom 5 sekundi (inaktivacija reverzne transkriptaze)
- 4 °C (održavanje)

Dobiveni cDNA uzorci pohranjeni su na –20 °C do kvantitativne qRT-PCR analize.

4.6.4. qRT-PCR reakcija

Umnažanje ciljanih genskih lokusa provedeno je korištenjem:

- CFX-96 qRT-PCR sustava i C100 termobloka (*Bio-Rad, USA*),
- gen-specifičnih početnica (Tablica 8) za ciljane lncRNA i GAPDH (referentni gen),
- TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNase H Plus), Bulk Kit (*Takara, Dalian, China*).

Početnice (Tablica 10) su odabrane iz literature a njihova specifičnost i duljina amplikona provjerene su pomoću NCBI PRIMER-BLAST (244). Temperatura tališta početnica (engl. *primer annealing*) provjerena je korištenjem slobodno dostupnog mrežnog T_m kalkulatora [Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>].

Uvjeti reakcije (volumen 10 µl):

1. 95 °C, 2 min (1 ciklus)
2. 95 °C, 5 s; 60 °C, 1 min (40 ciklusa)

4.6.5. Analiza qRT-PCR podataka

Vrijednosti Ct (prag ciklusa; engl. *cycle threshold*) dobivene su u CFX96 Maestro softveru.

Relativna ekspresija izračunata je prema $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodi (245):

$$\Delta Ct (\text{uzorak}) = Ct (\text{ciljana lncRNA}) - Ct (GAPDH - \text{endogeni referentni gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{CAVS uzorci}) - \Delta Ct (\text{prosječna vrijednost } \Delta Ct \text{ kontrolnih uzoraka})$$

Specifičnost amplifikacije potvrđena je melt curve analizom.

Tablica 10. qRT-PCR početnice korištene za analizu ekspresije ciljanih lncRNA

Gen	Referentna sekvenca	Lijeva početnica (5'→3')	Desna početnica (5'→3')	Veličina ampikona
ANRIL/CDKN2B-AS1	NR_003529.4	ACACACATCAAAGGAGAATTTT	CCGTCTCTACTGTACCTC	167 pb
UCA1	NR_015379.3	GCTTAATCCAGGAGACAAAG	CATAGGTGTGAGTGGCG	153 pb
MALAT1	NR_002819.5	TTATCCTTGGAAGAGTATT	TAAGAAGTCACATTATTGG	146 pb
TUG1	NM_001398476.1	TAGCAGTTCCCAATCCTTG	CACAAATTCATCATTCCC	116 pb
H19	NR_002196.3	ATCGGTGCCTCAGCGTTCGG	CTGTCCTCGCCGTACACCG	145 pb
MEG3	NR_002766.2	TGGCATAGAGGAGGTGAT	AGACAAGTAAGACAAGCAAGA	88 pb
GAS5	NR_002578.4	CCATGGATGACTTGCTTGGG	TGCATGCTTGCTTGTGTGG	197 pb
PVT1	NR_003367.4	GCCCCTTCTATGGGAATCACTA	GGGGCAGAGATGAAATCGTAAT	165 pb
CYTOR	NR_024204.2	ACCGAAAATCAGACTCAGCCC	AATGGGAAACCGACCAGACCAG	187 pb
MIAT	NR_003491.4	GCTGACCACTAACCAACC	AGGAACAGACCAGGAAGGCAG	122 pb
ROR	NR_048536.2	CCAGGACAATGAAACCAC	AGGAGCCCAAAGTAACAG	146 pb
RUNX1-IT1	NR_026812.1	GGACACGCAGAGGAAGTCAA	GTTCTTGAGGTTGGCGGAGA	97 pb
AGAP2-AS1	NR_027032.1	TACCTTGACCTTGCTGCTCTC	TGTCCCTTAATGACCCCATCC	187 pb
JADE1	NM_199320.4	AACCTGAAGAGAGCGT	AGGAAGCGAATGCTCA	180 pb
OIP5-AS1	NR_026757.2	TGCGAAGATGGCGGAGTAAG	TAGTTCCTCTCCTTGCCCG	136 pb
KLF3-AS1	NR_026804.1	AATGAGTGCCTGGAGGAAAT	CCTGGGCAACAGAGTGAGAC	138 pb
CASC15	NR_015410.2	CACACGCATGGAAAACCCAG	GAGGACCTGAGCTGTAAGCC	140 pb
PACERR	NR_125801.1	CTCCACGGGTCAACAATATAAA	ACGCATCAGGGAGAGAAATG	126 pb
ZEB1-AS1	NR_024284.1	AACCTTGTTGCTAGGGACCG	AGTCACTTCCATCCCGGTT	212 pb
HOTAIR	NR_047517.2	AATAGACATAGGAGAACACTT	AATCTTAATAGCAGGAGGAA	155 pb
GAPDH	NM_002046.7	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87 pb
TBP	NM_003194.5	GGTCTTCTCTCCAATCCCTTC	TGGTATTATTCTGTAGCGGAAAG	86 pb

Napomena: Kao što je inicijalno navedeno u prijavi istraživanja u studiji su kao referentni geni analizirani TBP (engl. *TATA-Box Binding Protein*) i GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza) no kako ekspresija TBP gena nije zabilježena u svim uzorcima tkiva

aortalnih zalistaka srca kao ni u većini uoraka periferne krvi (plazma) kao referentni gen u konačnici je za $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu korištena samo ekspresija GAPDH čija ekspresija je detektirana u svim analiziranim uzorcima tkiva i periferene krvi.

4.7. Analiza ekspresije lncRNA molekula TUG1 i H19 metodom in situ hibridizacije (ViewRNA™ ISH)

Analiza tkivne ekspresije regulatornih nekodirajućih RNA molekula TUG1 i H19 provedena je metodom in situ hibridizacije (ISH) uporabom ViewRNA™ ISH Tissue Assay kita (Thermo Fisher Scientific, USA), prema standardnom protokolu proizvođača prilagođenom za formalinom fiksirana, parafinski uklopljena (FFPE) tkiva.

Za detekciju ciljanih transkripata korištene su komercijalno dostupne, validirane ViewRNA™ probe sets:

- VA1-11879 (*Homo sapiens TUG1*, tip 1) – detekcija Fast Red kromogenim sustavom (alkalna fosfataza)
- VA6-3167844 (*Homo sapiens H19*, tip 6) – detekcija Fast Blue kromogenim sustavom (alkalna fosfataza)

Tkivni rezovi debljine 4–5 μm nanešeni su na naelektrizirane mikroskopske stakalce, sušeni 1 sat na 60 °C, te deparafinizirani u ksilenu (2 × 10 minuta), rehidrirani u seriji etanola (100 %, 95 %, 70 %) i isprani u RNase-free vodi. Nakon iscrtavanja hidrofobne barijere, sekcije su podvrgnute toplinskoj predobradi u 1× Pretreatment otopini pri ≈ 95 °C tijekom 15 minuta, čime se omogućio pristup ciljnoj RNA. Slijedila je proteazna digestija (Protease Solution, 40 °C, 15 minuta) optimizirana radi očuvanja morfologije tkiva.

Hibridizacija specifičnih ViewRNA sonda (VA1-11879 i VA6-3167844) provedena je pri 40 °C tijekom 2 sata u vlažnoj komori. Nakon ispiranja, provedeni su uzastopni koraci bDNA amplifikacije signala (PreAmplifier, Amplifier, Label Probe) prema standardnom protokolu kita.

Vizualizacija signala ostvarena je enzimsko-kromogenom reakcijom:

- *TUG1 (VA1-11879, tip 1)* → Fast Red supstrat (crveni signal)
- *H19 (VA6-3167844, tip 6)* → Fast Blue supstrat (plavi signal)

Vrijeme razvoja boje prilagođeno je intenzitetu signala ($\approx 30\text{--}45$ minuta), nakon čega su stakalca isprana, opcionalno kontrastno obojena hematoksilinom, te pokrivena vodotopivim medijem za montažu.

Mikroskopska analiza provedena je na uporabom svjetlosnog mikroskopa (Leica) pri povećanjima od $20\times$ i $40\times$. Pozitivni signal interpretiran je kao intenzivno punktiformno obojenje u citoplazmi ili jezgri ciljnih stanica unutar fibrokalificiranog tkiva aortalnog zalistka.

4.8. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je uporabom SPSS statističkog softvera (IBM® SPSS® Statistics, verzija 30.0). Normalnost distribucije varijabli provjerena je primjenom Kolmogorov–Smirnov i Shapiro–Wilks testa.

Veza između demografskih i kliničkih podataka s prisutnošću kalcificirajuće aortalne stenozе (CAVS) određena je uporabom Studentovog t-testa za kontinuirane varijable, odnosno χ^2 testa ili Fisherovog egzaktnog testa za kategoričke varijable.

Usporedba između skupina provedena je primjenom independent Student's t-testa za parametrijske, odnosno Mann–Whitney U testa ili Kruskal–Wallis testa za neparametrijske varijable.

Povezanost ekspresijskih vrijednosti analiziranih lncRNA molekula s pojavnosti CAVS-a određena je metodom logističke regresijske analize, a rezultati su prikazani s vrijednostima p, OR (engl. odds ratio) i 95% CI (engl. confidence interval).

Povezanost pojedinih varijabli s ekspresijskim vrijednostima analiziranih lncRNA molekula procijenjena je pomoću Pearsonova koeficijenta korelacije. Vrijednosti p (two-tailed) $< 0,05$ smatrane su statistički značajnima. Korekcija p-vrijednosti za multiple usporedbe provedena je primjenom Bonferronijeve metode ($P_c = 0,05/N$, gdje je N broj usporedbi).

5. Rezultati

Istraživanjem je obuhvaćeno 75 pacijenata s kalcificirajućom aortalnom stenozom (CAVS), kod kojih je indicirana kirurška zamjena aortalnog zalistka (AVR), te 25 pacijenata kod kojih je, zbog kardiomiopatija druge vrste, indicirana transplantacija srca.

Uz navedene skupine bolesnika, u istraživanje je uključeno i 100 zdravih kontrolnih ispitanika.

5.1. Opće karakteristike ispitanika

5.1.1. Opće karakteristike bolesnika s kalcificirajućom aortalnom stenozom (CAVS)

U skupini bolesnika s kalcificirajućom aortalnom stenozom (CAVS; $n = 75$) prosječna dob iznosila je $70,5 \pm 8,1$ godina, bez značajne spolne razlike u većini demografskih i kliničkih obilježja (Tablica 11).

Žene su bile nešto starije od muškaraca ($72,5 \pm 5,6$ prema $68,5 \pm 9,7$ godina; $p = 0,038$), dok su muškarci češće bili aktivni pušači ($37,1$ % prema $13,2$ %; $p = 0,028$). Očekivano, muškarci su imali veće vrijednosti površine tijela (BSA; $2,1 \pm 0,2$ m² prema $1,7 \pm 0,1$ m²; $p < 0,001$) te izraženije morfološko remodeliranje lijevog ventrikula, što se očitovalo u većim vrijednostima krajnjeg sistoličkog volumena (LVESV), teledijastoličkog volumena (LVEDV) i mase lijevog ventrikula (LV masa).

Od laboratorijskih parametara, značajne spolne razlike uočene su za koncentracije hemoglobina (viši u muškaraca; $p < 0,001$), kolesterola ($p = 0,044$), HDL kolesterola ($p = 0,007$), ALT ($p = 0,028$) i GGT ($p < 0,001$).

Srednje vrijednosti troponina bile su više u muškaraca ($p = 0,017$), dok su vrijednosti CRP-a i NT-proBNP-a pokazivale izraženu varijabilnost, bez statistički značajne spolne razlike.

Na razini srčane funkcije, muškarci su imali nižu ejekcijsku frakciju lijevog ventrikula (LVEF; medijan 53 % prema 62 %; $p = 0,007$) i više vrijednosti CT kalcijskog zbroja (Ca score; medijan $4115,1$ AU prema $2365,7$ AU; $p < 0,001$), što ukazuje na izraženiju valvularnu kalcifikaciju.

Nakon primjene Bonferroni korekcije za višestruke usporedbe ($P_c = 0,05/N = 0,000625$), statistički značajne razlike zadržane su za površinu tijela (BSA), koncentraciju GGT-a, vrijednosti hemoglobina, dimenzije i volumene lijevog ventrikula, masu lijevog ventrikula, promjer LVOT-a, te CT kalcijski zbroj. Ostale razlike između spolova izgubile su statističku značajnost nakon korekcije.

Tablica 11. Osnovne demografske, kliničke, laboratorijske i ehokardiografske karakteristike CAVS ispitanika (teški stadij bolesti)

	Svi ispitanici N = 75	Žene N = 38	Muškarci N=37	P vrijednosti
<i>Dob</i>	70.52±8.1	72.45±5.6	68.54±9.7	0.038
<i>Pušači</i>	18.0 (24.7)	5.0 (13.2)	13.0 (37.1)	0.028
<i>BMI, kg/m²</i>	30.1±4.9	30.9±5.2	29.2±4.4	0.065
<i>BSA, m²</i>	1.9±0.2	1.7±0.1	2.1±0.2	< 0.001
Komorbiditeti				
<i>Pozitivna obiteljska anamneza CAVS-a</i>	15.0 (20.5)	10.0 (26.3)	5.0 (14.3)	0.254
<i>Arterijska hipertenzija</i>	67.0 (91.8)	36.0 (94.7)	31.0 (88.6)	0.418
<i>Dijabetes</i>	15.0 (20.5)	7.0 (18.4)	8.0 (22.9)	0.774
<i>Hiperlipoproteinemia</i>	51.0 (69.9)	27.0 (71.1)	24.0 (68.6)	> 0.999
<i>CV/TIA</i>	7.0 (9.6)	2.0 (5.3)	5.0 (14.3)	0.249
<i>CAD</i>	6.0 (8.2)	4.0 (10.5)	2.0 (5.7)	0.676
<i>PAD</i>	9.0 (12.3)	2.0 (5.3)	7.0 (20.0)	0.078
<i>AF</i>	9.0 (15.5)	5.0 (13.2)	4.0 (14.3)	> 0.999
<i>Bolesti štitnjače</i>	9.0 (12.3)	7.0 (18.4)	2.0 (5.7)	0.155
Lijekovi				
<i>Warfarin</i>	19 (26.0)	14.0 (36.8)	5.0 (14.3)	0.035
<i>NOAC</i>	1.0 (1.4)	0.0 (0.0)	1.0 (2.9)	0.479
<i>Clopidogrel/Aspirin</i>	55.0 (75.3)	29.0 (76.3)	26.0 (74.3)	> 0.999
<i>ACE/AT inhibitori</i>	60.0 (82.2)	31.0 (81.6)	29.0 (82.9)	> 0.999
<i>Blokatori kalcijevih kanala</i>	33.0 (45.2)	19.0 (50.0)	14.0 (40.0)	0.482
<i>Beta blokatori</i>	53.0 (72.6)	28.0 (73.7)	25.0 (71.4)	> 0.999
<i>Statini</i>	45.0 (61.6)	23.0 (60.5)	22.0 (62.9)	> 0.999
<i>Diuretici</i>	30.0 (41.1)	18.0 (47.4)	12.0 (34.3)	0.342
<i>Insulin</i>	3.0 (4.1)	2.0 (5.3)	1.0 (2.9)	> 0.999
<i>Metformin</i>	14.0 (19.2)	7.0 (18.4)	7.0 (20.0)	> 0.999
<i>Drugi hipoglikemici</i>	5.0 (6.8)	1.0 (2.6)	4.0 (11.4)	0.187
Laboratorijski nalazi				
<i>GUK, mmol/L</i>	6.1 (5.4-7.2)	6.1 (5.4-6.8)	6.2 (5.6-6.9)	0.604
<i>urea, mmol/L</i>	7.3 (6.0-9.8)	7.2 (6.0-9.9)	7.6 (6.0-9.7)	0.640
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	83.0 (70.0-97.3)	72.0 (60.0-93.0)	87.0 (79.0-109.5)	< 0.001
<i>eGFR, ml / min /1,73 m²</i>	80.1 (70.1-92.7)	74.8 (62.8-90.7)	84.7 (76.2-94.6)	0.020
<i>Urat, μmol/L</i>	385.5 (302.8-461.3)	364.0 (279.0-443.0)	399.0 (320.5-471.0)	0.204
<i>Ukupni proteini, g/L</i>	72.0 (70.0-76.0)	73.0 (70.0-78.0)	71.0 (68.5-75.0)	0.094
<i>Serumski albumin, g/L</i>	42.5 (40.0-45.3)	43.0 (40.0-46.0)	42.0 (41.0-44.0)	0.686
<i>Trigliceridi, mmol/L</i>	1.2 (0.9-1.8)	1.2 (0.9-1.4)	1.4 (1.0-2.1)	0.119
<i>Kolesterol, mmol/L</i>	4.8 (4.0-5.7)	5.1 (4.1-6.4)	4.6 (3.6-5.2)	0.044
<i>HDL, mmol/L</i>	1.3 (1.1-1.5)	1.4 (1.2-1.6)	1.2 (0.9-1.4)	0.007
<i>LDL, mmol/L</i>	3.0 (2.1-3.7)	3.2 (2.2-4.1)	2.7 (1.9-3.5)	0.063
<i>Ukupni Ca, mmol/L</i>	2.4 (2.3-2.5)	2.4 (2.3-2.5)	2.4 (2.3-2.5)	0.354
<i>AST, U/L</i>	24.0 (21.0-33.0)	24.0 (21.0-30.0)	24.0 (20.0-35.0)	0.737
<i>ALT, U/L</i>	21.0 (16.0-29.0)	20.0 (15.0-24.0)	22.0 (17.0-37.5)	0.028
<i>LDH, U/L</i>	203.0 (181.0-237.0)	209.5 (192.0-242.5)	199.0 (171.0-236.5)	0.201
<i>CK, U/L</i>	97.0 (65.5-148.0)	83.0 (54.0-153.3)	106.0 (73.0-142.0)	0.169
<i>GGT, U/L</i>	30.5 (19.0-60.3)	21.0 (15.0-21.0)	39.0 (24.0-78.0)	< 0.001
<i>ALP, U/L</i>	73.0 (64.0-90.5)	77.0 (64.5-90.0)	72.5 (63.3-91.0)	0.633
<i>Amilaza, U/L</i>	56.7±23.7	52.9±15.3	62.0±31.8	0.285
<i>CRP, mg/L</i>	2.9 (1.4-7.0)	2.9 (1.9-7.1)	2.2 (1.4-7.4)	0.677
<i>Troponin, μg/l</i>	0.01 (0.01-0.03)	0.01 (0.01-0.01)	0.03 (0.01-0.03)	0.017
<i>NT-proBNP, pg/ml</i>	1207.0 (411.0-3783.0)	674.5 (399.1-3959.6)	1473.5 (492.3-4805.8)	0.302
<i>Leukociti x10⁹/L</i>	6.8 (5.7-9.0)	6.7 (5.2-8.6)	7.1 (5.8-9.4)	0.182
<i>Eritrociti x10¹²/L</i>	4.6±0.5	4.4±0.4	4.7±0.6	0.018
<i>Haemoglobin, g/L</i>	136.5±17.2	130.6±13.6	141.6±18.4	< 0.001
<i>Trombociti, x10⁹/L</i>	210.5 (176.0-272.5)	238.0 (184.5-288.5)	195.0 (174.0-249.5)	0.028
<i>Fibrinogen, g/L</i>	3.8 (3.4-4.5)	3.9 (3.4-4.4)	3.8 (3.3-4.6)	0.431
Podaci o tlaku				
<i>Sistolčki krvni tlak, mmHg</i>	127.2±18.8	131.1±19.8	123.8±17.3	0.031
<i>Dijastolički krvni tlak, mmHg</i>	75.0 (70.0-80.0)	79.0 (70.0-87.5)	73.0 (65.0-80.0)	0.289
<i>Tlak pulsa, mmHg</i>	55.0 (50.0-65.0)	57.5 (50.0-70.0)	55.0 (50.0-60.0)	0.535
<i>Srednji arterijski tlak, mmHg</i>	94.6±10.9	96.7±11.9	92.4±9.4	0.047
UZV srca				
<i>LVIDd, mm</i>	49.0 (41.0-55.0)	45.0 (42.0-51.0)	50.5 (15.9-56.8)	0.088
<i>LVIDs, mm</i>	32.0 (28.0-35.8)	31.0 (27.8-34.0)	34.0 (28.3-40.3)	0.020
<i>IVSd, mm</i>	15.0 (14.0-16.0)	15.0 (14.0-16.0)	15.0 (12.0-16.0)	0.993
<i>LVPW, mm</i>	15.0 (13.0-16.0)	14.5 (13.8-16.0)	15.0 (12.3-16.0)	0.726
<i>Anulus aorte</i>	24.7±2.9	24.2±2.9	25.3±2.7	0.108
<i>LAVI, ml/m²</i>	39.0 (31.0-49.0)	37.5 (31.8-50.3)	40.0 (29.0-48.0)	0.744
<i>LVEDV, ml</i>	121.9±37.1	100.5±21.8	144.6±36.7	< 0.001
<i>LVESV, ml</i>	45.0 (37.3-62.5)	39.0 (33.0-45.0)	60.0 (46.0-79.0)	< 0.001
<i>LVEF, %</i>	58.0 (45.0-65.0)	62.0 (51.5-65.0)	53.0 (30.5-62.8)	0.007
<i>Masa LV, g</i>	346.6±84.4	308.6±59.6	387.9±88.5	< 0.001
<i>Indeksirana masa LV, g/m²</i>	185.1±41.9	180.2±38.5	190.4±45.3	0.307
<i>Vmax, m/s</i>	4.6±0.6	4.7±0.6	4.5±0.6	0.087
<i>PGmax, mmHg</i>	86.3±20.8	90.3±21.5	81.9±19.4	0.087
<i>PGmean, mmHg</i>	51.7±14.8	53.1±15.0	50.3±14.7	0.413
<i>Time Velocity Integral, cm</i>	113.5±20.2	116.1±20.3	118.8±19.9	0.261
<i>AVA, cm²</i>	0.076 (0.69-0.90)	0.75 (0.57-0.87)	0.79 (0.70-0.90)	0.033

Tablica 11. Nastavak

	Svi ispitanici N = 75	Žene N = 38	Muškarci N=37	P vrijednosti
AVAI, cm/m ²	0.40 (0.36-0.48)	0.42 (0.33-0.50)	0.40 (0.38-0.41)	0.327
LVOT Vmax, m/s	0.99±0.2	1.0±0.2	0.97±0.2	0.263
LVOT PGmax, mmHg	3.8±1.3	3.9±1.2	3.7±1.4	0.472
LVOT PGmean, mmHg	2.0±0.68	2.1±0.7	1.98±0.69	0.632
LVOT dijametar, mm	21.0 (19.0-22.0)	20.0 (18.8-21.0)	21.0 (20.0-22.0)	<'.001
Udarni volumen, ml	87.3 (70.8-97.9)	77.0 (68.1-96.9)	88.6 (76.9-102.7)	0.032
CT nalazi				
CT Ca score, AU	3217.3 (2035.4-5125.0)	2365.7 (1646.0-3542.2)	4115.1 (3074.1-5595.8)	< 0.001

Ovisno o tome radi li se o kategoričkim ili kontinuiranim varijablama te o njihovoj raspodjeli (Gaussova distribucija ili distribucija koja odstupa od normale), podaci su prikazani kao frekvencija (n) i postotak (%), medijan i interkvartilni raspon (IQR, engl. interquartile range) ili kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija, engl. standard deviation). Testovi: χ^2 /Fisher za kategoričke; t-test/Mann-Whitney za kontinuirane. Statistički značajnom smatrana je vrijednost $P < 0.050.2$ korigirane prema Bonferroni korekciji za višestruke usporedbe ($P_c = 0.000625$). Kratice: AU – proizvoljne jedinice (engl. arbitrary units), BMI – indeks tjelesne mase (engl. body mass index), BSA – površina tijela (engl. body surface area), CAD – koronarna ateroskleroza (engl. coronary artery disease), PAD – periferna arterijska bolest (engl. peripheral artery disease), AF – fibrilacija atrija (engl. atrial fibrillation), NOAC – antikoagulansi koji nisu antagonisti vitamina K (engl. non-vitamin K antagonist oral anticoagulants), GUK – glukoza u krvi (engl. blood glucose), IQR – interkvartilni raspon (engl. interquartile range), eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. estimated glomerular filtration rate), SD – standardna devijacija (engl. standard deviation), HDL – lipoproteini visoke gustoće (engl. high density lipoproteins), LDL – lipoproteini niske gustoće (engl. low density lipoproteins), CT – kompjutorizirana tomografija (engl. computed tomography), AST – aspartat-aminotransferaza (engl. aspartate aminotransferase), ALT – alanin-aminotransferaza (engl. alanine aminotransferase), ALP – alkalna fosfataza (engl. alkaline phosphatase), CRP – C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein), GGT – gama-glutamil transferaza (engl. gamma-glutamyl transferase), CK – kreatin kinaza (engl. creatine kinase), LDH – laktat dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase), NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (engl. N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide), LVIDd – unutarnji promjer lijevog ventrikula u diastoli (engl. left ventricle internal dimension at diastole), LVIDs – unutarnji promjer lijevog ventrikula u sistoli (engl. left ventricle internal dimension at systole), IVSd – debljina interventrikularnog septuma u diastoli (engl. interventricular septum thickness in diastole), LVPW – debljina stražnje stijenke lijevog ventrikula u diastoli (engl. left ventricular posterior wall thickness in diastole), LVEDV – teledijastolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end diastolic volume), LVESV – telesistolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end systolic volume), LVEF – ejekcijska frakcija lijevog ventrikula (engl. left ventricular ejection fraction), RWT – relativna debljina stijenke lijevog ventrikula (engl. relative wall thickness), Vmax – maksimalna brzina protoka preko aortalnog zaliska (engl. peak velocity), PGmax – maksimalni gradijent tlaka (engl. maximum pressure gradient), PGmean – srednji gradijent tlaka (engl. mean pressure gradient), AVA – površina aortalnog zaliska (engl. aortic valve area), AVAi – indeksirana površina aortalnog zaliska (engl. indexed aortic valve area), LVOT – izlazni trakt lijevog ventrikula (engl. left ventricular outflow tract), LVOT Vmax – maksimalna brzina protoka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum velocity), LVOT PGmax – maksimalni gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum pressure gradient), LVOT PGmean – srednji gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT mean pressure gradient), UZV – ultrazvuk srca (engl. echocardiography). Nakon Bonferroni korekcije, značajne spolne razlike zadržane su za BSA, GGT, Hb, LV dimenzije/volumene/masu, LVOT promjer (izraženije remodeliranje) i CT Ca score. Ostale varijable nisu dosegle korekcijski prag.

5.1.2. Opće karakteristike transplantiranih pacijenata

U skupini kontrolnih ispitanika (N = 25), kod kojih je zbog kardiomiopatija druge vrste indicirana transplantacija srca, također su analizirane osnovne demografske, kliničke, laboratorijske i ehokardiografske značajke s obzirom na spol (Tablica 12). Medijan dobi ispitanika iznosio je 58,0 (53,5–62,5) godina, bez statistički značajne razlike između žena i muškaraca ($p = 0,883$). Indeks tjelesne mase (BMI) i površina tijela (BSA) bili su značajno niži u žena u odnosu na muškarce (BMI $21,9 \pm 1,6$ kg/m² naspram $26,4 \pm 3,9$ kg/m²; BSA $1,7 \pm 0,1$ m² naspram $2,0 \pm 0,2$ m²; oba $p < 0,001$). Učestalost arterijske hipertenzije, dijabetesa, hiperlipoproteinemije, atrijske fibrilacije i ishemijske bolesti srca nije se značajno razlikovala među spolovima.

Od lijekova, zabilježena je veća učestalost primjene ACE/AT inhibitora u žena (85,7 %) u odnosu na muškarce (17,6 %; $p = 0,004$), dok za ostale skupine lijekova (NOAC, beta-blokatori, statini, diuretici, antitrombocitni i hipoglikemijski lijekovi) nisu nađene značajne razlike. Laboratorijski parametri (glukoza, urea, kreatinin, urati, lipidi, jetreni enzimi, CRP i NT-proBNP) pokazali su slične vrijednosti među spolovima, uz tendenciju viših vrijednosti kreatinina i fibrinogena u muškaraca, ali bez statističke značajnosti. Niti u broju leukocita, eritrocita, hemoglobinu i trombocitima nije bilo razlika između skupina.

Prosječne vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka bile su usporedive između žena i muškaraca ($110,0 \pm 16,4$ mmHg i $71,8 \pm 11,3$ mmHg; $p > 0,05$). Ehokardiografski parametri (LVIDd, LVIDs, IVSd, LVPW i LVEF) također nisu pokazali značajne spolne razlike, premda su muškarci imali tendenciju prema većim dimenzijama lijeve klijetke i nešto nižoj ejskijskoj frakciji. Ukupno gledano, u kontrolnoj skupini nije zabilježen statistički značajan spolni efekt u većini analiziranih varijabli, osim u antropometrijskim parametrima i primjeni ACE/AT inhibitora.

Bonferroni korekcija primijenjena je za višestruke usporedbe ($P_c = 0,0018$).

Tablica 12. Osnovne demografske, kliničke, laboratorijske i ehokardiografske karakteristike transplantiranih pacijenata

	Svi ispitanici N = 25	Žene N = 7	Muškarci N = 18	P vrijednosti
Dob	58.0 (53.5-62.5)	58.0 (54.0-63.0)	58.5 (52.8-62.3)	0.883
Pušači	6.0 (24.0)	1.0 (14.3)	5.0 (27.8)	0.637
BMI, kg/m ²	25.1±3.9	21.9±1.6)	26.4±3.9)	< 0.001
BSA, m ²	1.9±0.2	1.7±0.1	2.0±0.2	< 0.001
Komorbiditeti				
Arterijska hipertenzija	13.0 (52.0)	2.0 (28.6)	11.0 (61.1)	0.202
Dijabetes	4.0 (16.0)	0.0 (0.0)	4.0 (22.2)	0.294
Hiperlipoproteinemia	11.0 (44.0)	3.0 (42.9)	8.0 (44.4)	> 0.999
AF	13.0 (52.0)	5.0 (71.4)	8.0 (44.4)	0.378
Ishemijske bolesti srca	8.0 (32.0)	2.0 (28.6)	6.0 (33.3)	> 0.999
Lijekovi				
NOAC	21.0 (84.0)	6.0 (85.7)	15.0 (83.3)	> 0.999
Clopidogrel/aspirin	2.0 (8.0)	1.0 (14.3)	1.0 (5.6)	0.490
ACE/AT inhibitori	9.0 (37.5)	6.0 (85.7)	3.0 (17.6)	0.004
Blokatori kalcijevih kanala	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	NA
Beta blokatori	20.0 (80.0)	7.0 (100.0)	13.0 (72.2)	0.274
Statini	10.0 (40.0)	3.0 (42.9)	7.0 (38.9)	> 0.999
Diuretici	22.0 (88.0)	7.0 (100.0)	15.0 (83.3)	0.534
Insulin	2.0 (8.0)	0.0 (0.0)	2.0 (11.1)	> 0.999
Metformin	2.0 (8.0)	0.0 (0.0)	2.0 (11.1)	> 0.999
Drugi hipoglikemici	3.0 (12.0)	0.0 (0.0)	3.0 (16.7)	0.534
Laboratorijski nalazi				
GUK, mmol/l	5.9 (5.4-7.7)	5.4 (4.9-7.6)	6.2 (5.4-7.8)	0.198
Urea, mmol/l	8.1 (6.4-11.6)	7.4 (6.4-10.2)	8.9 (6.2-13.8)	0.423
Kreatinin, μmol/l	106.0 (88.5-149.0)	101.0 (80.0-106.0)	113.5 (88.8-160.5)	0.085
Urati, μmol/l	462.2±168.6	498.0±141.1	444.3±183.1	0.469
Ukupni proteini, g/l	71.0 (67.0-73.5)	73.0 (70.0-79.0)	70.0 (65.8-72.5)	0.198
Serumski albumin, g/l	41.0 (38.0-43.0)	41.0 (38.0-47.0)	40.5 (37.8-43.0)	0.534
Trigliceridi, mmol/l	1.4±0.6	1.6±0.6	1.3±0.6	0.593
Kolesterol, mmol/l	4.1 (3.5-4.8)	4.1 (3.6-6.1)	4.2 (3.5-4.8)	0.376
HDL, mmol/l	1.16±0.3	1.19±0.4	1.15±0.3	0.825
LDL, mmol/l	2.6 (2.0-3.4)	2.7 (2.1-4.4)	2.4 (1.8-3.3)	0.299
AST, U/l	27.0 (20.5-39.0)	31.0 (24.0-47.0)	23.5 (18.8-36.8)	0.158
ALT, U/l	22.0 (17.5-40.5)	25.0 (20.0-29.0)	21.0 (17.0-48.5)	0.883
LDH, U/l	278.3±152.9	226.0±42.4	330.5±239.7	0.648
GGT, U/l	76.0 (27.5-128.0)	94.0 (28.0-193.0)	62.5 (26.5-137.3)	0.701
ALP, U/l	84.5 (71.3-103.8)	87.0 (78.0-108.0)	83.0 (67.0-100.0)	0.534
CRP, mg/l	6.2 (2.1-20)	6.0 (2.5-9.4)	8.3 (1.9-20.2)	0.836
NT-proBNP, pg/ml	6019.1 (2997.3-15000.0)	11313.0 (2997.2-13091.1)	4335.5 (2846.5-16899.0)	0.769
Leukociti, x10 ⁹ /l	7.4 (6.0-9.4)	7.2 (6.4-7.4)	8.8 (5.8-10.4)	0.198
Eritrociti, x10 ¹² /l	4.6±0.6	4.5±0.6	4.7±0.6	0.461
Hemoglobin, g/l	137.6±23.9	131.0±25.2	140.1±23.6	0.427
Trombociti, x10 ⁹ /l	254.0 (206.5-316.5)	287.0 (218.0-335.0)	230.5 (202.8-308.5)	0.458
Fibrinogen, g/l	4.1 (3.5-4.7)	3.6 (3.1-4.0)	4.5 (3.8-4.9)	0.066
Podaci o tlaku				
Sistolički krvni tlak, mmHg	110.0±16.4	108.3±18.0	110.7±16.3	0.768
Dijastolički krvni tlak, mmHg	71.8±11.3	69.1±10.8	73.0±11.6	0.456
UZV srca				
LVIDD, cm	6.8 (6.0-7.9)	6.1 (5.5-7.7)	7.4 (6.2-7.9)	0.336
LVIDS, cm	6.1 (5.1-7.0)	5.8 (4.3-7.1)	6.1 (5.3-7.0)	0.489
IVSD, cm	1.0 (0.8-1.0)	0.9 (0.6-1.2)	1.0 (0.8-1.0)	0.371
LVPW, cm	1.1 (0.9-1.1)	1.0 (0.7-1.2)	1.1 (0.9-1.1)	0.503
LVEF, %	23.0 (17.0-32.0)	33.0 (15.0-45.0)	22.0 (18.0-27.0)	0.275

Ovisno o tipu varijable i raspodjeli podataka, rezultati su prikazani kao frekvencija (n) i postotak (%), medijan i interkvartilni raspon (IQR) ili srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Za usporedbu između skupina korišteni su χ^2 test ili Fisherov egzaktni test za kategoričke varijable te Studentov t-test ili Mann-Whitney U test za kontinuirane varijable. Bonferroni korekcija primijenjena za višestruke usporedbe ($P_c = 0.0018$). Kratice: BMI – indeks tjelesne mase; BSA – površina tijela; NOAC – antikoagulansi koji nisu antagonisti vitamina K; AF – atrijska fibrilacija; GUK – glukoza u krvi; HDL – lipoproteini visoke gustoće; LDL – lipoproteini niske gustoće; AST – aspartat-aminotransferaza; ALT – alanin-aminotransferaza; ALP – alkalna fosfataza; GGT – gama-glutamil transferaza; LDH – laktat-dehidrogenaza; CRP – C-reaktivni protein; NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida; LVIDD – unutarnji promjer lijeve klijetke u dijastoli; LVIDS – promjer lijeve klijetke u sistoli; IVSD – debljina interventrikularnog septuma u dijastoli; LVPW – debljina stražnje stijenke lijeve klijetke u dijastoli; LVEF – ežekcijska frakcija lijevog ventrikula; UZV – ultrazvuk srca; IQR – interkvartilni raspon; SD – standardna devijacija.

5.1.3. Opće karakteristike kontrolnih, zdravih ispitanika

U skupini zdravih kontrolnih ispitanika (N = 100; 50 žena, 50 muškaraca) prosječna dob iznosila je $59,6 \pm 10,4$ godina, pri čemu su žene bile statistički značajno starije od muškaraca ($62,2 \pm 9,1$ vs. $57,0 \pm 11,0$ godina; $p = 0,011$) (Tablica 13). Vrijednosti tjelesne mase, indeksa tjelesne mase (BMI) i većine biokemijskih parametara nisu se značajno razlikovale između spolova. Muškarci su imali značajno veću površinu tijela (BSA) ($2,1 [2,0-2,3]$ m² vs. $1,8 [1,7-1,9]$ m²; $p < 0,001$), dok su žene pokazivale viši HDL ($1,4 [1,2-1,5]$ mmol/L vs. $1,1 [1,0-1,4]$ mmol/L; $p = 0,023$) te niže vrijednosti kreatinina ($67,0 [61,0-83,0]$ vs. $84,0 [74,8-99,5]$ μmol/L; $p = 0,023$).

U morbiditetnom profilu, najčešće su bile zastupljene arterijska hipertenzija (64 %) i hiperlipoproteinemija (34 %), bez značajnih spolnih razlika. Učestalost dijabetesa, koronarne i periferne arterijske bolesti te fibrilacije atrijske bila je niska i ujednačena među skupinama. U skladu s time, i primjena kardiovaskularnih lijekova nije pokazala značajne razlike.

U laboratorijskim pokazateljima nije bilo relevantnih spolnih razlika osim navedenih parametara bubrežne funkcije i HDL kolesterola. Svi ispitanici imali su normalne vrijednosti upalnih biljega (CRP, troponin, NT-proBNP) i jetrenih enzima.

Ehokardiografska analiza pokazala je spolno uvjetovane anatomske razlike: muškarci su imali veće vrijednosti dimenzija i volumena lijevog ventrikula (LVIDd, LVEDV, LVESV) te veći promjer anulus aorte i LVOT, kao i veću masu lijevog ventrikula, dok se ejekcijska frakcija (LVEF) nije značajno razlikovala među spolovima. Maksimalne brzine protoka (Vmax) i gradijenti tlaka (PGmax) preko aortnog zaliska bili su viši u žena, ali bez značaja nakon Bonferroni korekcije.

Nakon primjene Bonferroni korekcije ($P_c = 0.000625$), statistički značajne razlike između spolova zadržane su za površinu tijela (BSA), hemoglobin, odabrane dimenzije i volumene lijevog ventrikula (LVIDd, LVIDs, LVEDV, LVESV, masa LV), promjer LVOT-a te CT kalcijски score. Ostale varijable nisu dosegle prag korekcijske značajnosti.

Tablica 13. Osnovne demografske, kliničke, laboratorijske i ehokardiografske karakteristike kontrolnih, zdravih ispitanika

	Svi ispitanici N = 100	Žene N = 50	Muškarci N = 50	P vrijednosti
Dob	59.6±10.4	62.2±9.1	57.0±11.0	0.011
Pušači	20.0 (20.0)	11.0 (22.0)	9.0 (18.0)	0.803
BMI, kg/m ²	27.8 (25.3-30.0)	28.3 (24.9-30.3)	27.7 (26.0-29.4)	0.869
BSA, m ²	1.9 (1.8-2.2)	1.8 (1.7-1.9)	2.1 (2.0-2.3)	< 0.001
Komorbiditeti				
Pozitivna obiteljska anamneza CAVS-a	27.0 (27.0)	16.0 (32.0)	11.0 (22.0)	0.368
Arterijska hipertenzija	64.0 (64.0)	35.0 (70.0)	29.0 (58.0)	0.298
Dijabetes	13.0 (13.0)	5.0 (10.0)	8.0 (16.0)	0.554
Hiperlipoproteinemija	34.0 (34.0)	16.0 (32.0)	18.0 (36.0)	0.833
CVI/TIA	1.0 (1.0)	1.0 (2.0)	0.0 (0.0)	> 0.999
CAD	4.0 (4.0)	3.0 (6.0)	1.0 (2.0)	0.617
PAD	9.0 (9.0)	4.0 (8.0)	5.0 (10.0)	> 0.999
AF	7.0 (7.0)	3.0 (6.0)	4.0 (8.0)	> 0.999
Lijekovi				
Warfarin	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	---
NOAC	6.0 (6.0)	4.0 (8.0)	2.0 (4.0)	0.678
Clopidogrel/Aspirin	13.0 (13.0)	8.0 (16.0)	5.0 (10.0)	0.554
ACE/AT inhibitori	52.0 (52.0)	30.0 (60.0)	22.0 (44.0)	0.161
Blokatori kalcijevih kanala	30.0 (30.0)	17.0 (34.0)	13.0 (26.0)	0.513
Beta blokatori	28.0 (28.0)	17.0 (34.0)	11.0 (22.0)	0.265
Statini	22.0 (22.0)	14.0 (28.0)	8.0 (16.0)	0.227
Diuretici	7.0 (7.0)	3.0 (6.0)	4.0 (8.0)	> 0.999
Insulin	2.0 (2.0)	0.0 (0.0)	2.0 (4.0)	0.495
Metformin	9.0 (9.0)	3.0 (6.0)	6.0 (12.0)	0.487
Drugi hipoglikemici	4.0 (4.0)	2.0 (4.0)	2.0 (4.0)	> 0.999
Laboratorijski nalazi				
GUK, mmol/L	5.9 (5.4-6.5)	5.8 (5.5-6.3)	6.1 (5.2-6.7)	0.755
urea, mmol/L	6.0 (5.6-7.1)	6.0 (4.8-7.9)	6.1 (5.6-7.0)	0.908
Kreatinin, μmol/L	81.0 (65.0-97.0)	67.0 (61.0-83.0)	84.0 (74.8-99.5)	0.023
eGFR, ml / min /1,73 m ²	81.7±18.4	77.4±19.4	85.5±17.1	0.226
Urati, μmol/L	331.0±86.7	313.9±88.7	345.3±84.9	0.311
Ukupni proteini, g/L	73.1±4.5	73.2±4.8	73.1±4.3	0.919
Serumski albumin, g/L	43.2±2.3	43.1±2.1	43.3±2.6	0.764
Trigliceridi, mmol/L	1.5 (1.1-2.2)	1.5 (1.3-2.2)	1.3 (1.0-2.1)	0.499
Kolesterol, mmol/L	5.6±1.4	6.1±1.5	5.2±1.2	0.080
HDL, mmol/L	1.2 (1.11.4)	1.4 (1.2-1.5)	1.1 (1.0-1.4)	0.023
LDL, mmol/L	3.5±1.1	3.95±1.2	3.22±1.0	0.070
Ukupni Ca, mmol/L	2.4±0.1	2.4±0.1	2.4±0.1	0.821
AST, U/L	26.0 (21.0-31.0)	24.0 (21.0-31.0)	28.5 (21.3-30.8)	0.479
ALT, U/L	25.0 (20.0-36.0)	23.0 (17.0-32.0)	25.5 (21.5-36.0)	0.298
LDH, U/L	175.0±37.8	179.0±38.9	172.1±37.8	0.600
CK, U/L	96.0 (67.0-141.0)	80.0 (56.0-107.0)	105.0 (82.3-168.8)	0.086
GGT, U/L	35.0 (23.0-54.0)	27.0 (22.0-41.0)	39.0 (23.8-63.5)	0.099
ALP, U/L	85.0 (67.8-100.3)	89.0 (70.0-113.0)	82.0 (64.3-98.0)	0.274
Amilaza, U/L	50.2±17.8	45.5±15.9	54.9±18.9	0.183
CRP, mg/L	2.6 (1.1-4.2)	2.0 (2.0-3.2)	2.6 (0.8-5.5)	0.961
Troponin, μg/l	0.01 (0.01-0.02)	0.01 (0.01-0.02)	0.01 (0.01-0.04)	0.762
NT-proBNP, pg/ml	98.1 (76.9-119.2)	89.5 (76.9-119.0)	101.0 (74.8-120.1)	0.424
Leukociti x10 ⁹ /L	7.2±1.8	7.7±2.0	6.8±1.6	0.158
Eritrociti x10 ¹² /L	4.8±0.5	4.5±0.4	5.1±0.4	< 0.001
Haemoglobin, g/L	146.0 (131.0-158.0)	134.0 (129.0-144.0)	156.5 (147.0-160.0)	< 0.001
Trombociti, x10 ⁹ /L	233.0 (188.0-278.0)	240.0 (188.0-302.0)	211.5 (186.5-261.8)	0.542
Fibrinogen, g/L	3.2±0.5	3.2±0.5	3.2±0.6	0.985
Podaci o tlaku				
Sistolički krvni tlak, mmHg	130.0 (120.0-140.0)	130.0 (120.0-140.0)	130.0 (120.0-140.0)	0.743
Dijastolički krvni tlak, mmHg	80.0 (80.0-90.0)	80.0 (73.8-85.0)	80.0 (80.0-90.0)	0.108
Tlak pulsa, mmHg	50.0 (40.0-53.8)	50.0 (43.8-60.0)	50.0 (40.0-50.0)	0.558
Srednji arterijski tlak, mmHg	96.5 (93.2-106.4)	96.5 (89.9-103.2)	96.5 (93.2-106.5)	0.234
UZV srca				
LVIDd, mm	49.6±4.2	47.8±4.1	51.4±3.5	< 0.001
LVIDs, mm	33.0 (30.0-34.0)	32.0 (28.5-34.0)	33.0 (31.0-35.0)	< 0.001
IVSd, mm	11.0 (10.0-12.0)	11.0 (10.0-12.0)	11.0 (11.0-12.0)	0.247
LVPW, mm	11.0 (10.0-12.0)	11.0 (10.0-12.0)	11.0 (10.0-12.0)	0.957
Anulus aorte	24.0 (23.0-26.0)	24.0 (22.0-25.0)	25.0 (24.0-28.0)	< 0.001
LAVI, ml/m ²	21.0 (18.0-27.0)	21.0 (16.0-25.5)	22.5 (18.0-28.0)	0.582
LVEDV, ml	114.3±23.3	103.2±22.3	125.1±19.0	< 0.001
LVESV, ml	41.7±10.2	37.5±10.3	45.9±8.4	< 0.001
LVEF, %	64.9±4.6	65.3±4.8	64.5±4.3	0.395
Masa LV, g	207.0 (170.0-246.0)	188.0 (153.0-246.0)	224.0 (194.0-248.3)	0.015
Indeksirana masa LV, g/m ²	102.0 (89.0-126.0)	102.0 (86.5-129.0)	102.0 (91.0-115.5)	0.950
Vmax, m/s	1.4 (1.3-1.6)	1.5 (1.3-1.7)	1.4 (1.2-1.5)	0.044
PGmax, mmHg	7.8 (6.5-10.6)	8.6 (7.1-11.1)	7.4 (5.9-9.6)	0.035
PGmean, mmHg	4.2 (3.5-5.4)	4.4 (3.6-5.7)	4.0 (3.2-5.1)	0.171

Tablica 13. Nastavak

	Svi ispitanici N = 100	Žene N = 50	Muškarci N = 50	P vrijednosti
Time Velocity Integral, cm	33.8 (27.2-37.9)	35.0 (28.0-38.9)	31.2 (25.9-42.1)	0.080
AVA, cm ²	2.8 (2.3-3.5)	2.6 (2.2-3.4)	2.9 (2.4-3.8)	0.057
AVAI, cm/m ²	1.5 (1.2-1.8)	1.5 (1.2-1.8)	1.5 (1.1-1.7)	0.578
LVOT Vmax, m/s	0.9 (0.8-1.1)	1.0 (0.9-1.1)	0.9 (0.8-1.0)	0.023
LVOT PGmax, mmHg	3.6 (2.8-4.5)	3.8 (3.2-4.6)	3.2 (2.4-4.1)	0.035
LVOT PGmean, mmHg	1.9±0.7	1.9±0.7	1.8±0.6	0.304
LVOT dijametar, mm	22.0 (21.0-24.0)	21.0 (20.0-23.0)	23.0 (21.8-25.3)	< 0.001
CT nalazi				
CT Ca score, AU	---	---	---	---

Ovisno o tome radi li se o kategoričkim ili kontinuiranim varijablama te o njihovoj raspodjeli (Gaussova distribucija ili distribucija koja odstupa od normale), podaci su prikazani kao frekvencija (n) i postotak (%), medijan i interkvartilni raspon (IQR, engl. interquartile range) ili kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija, engl. standard deviation). Testovi: χ^2 /Fisher za kategoričke; t-test/Mann-Whitney za kontinuirane. Statistički značajnom smatrana je vrijednost $P < 0.050.2$ korigirane prema Bonferroni korekciji za višestruke usporedbe ($P_c = 0.000625$). Kratice: AU – proizvoljne jedinice (engl. arbitrary units), BMI – indeks tjelesne mase (engl. body mass index), BSA – površina tijela (engl. body surface area), CAD – koronarna ateroskleroza (engl. coronary artery disease), PAD – periferna arterijska bolest (engl. peripheral artery disease), AF – fibrilacija atrijske (engl. atrial fibrillation), NOAC – antikoagulansi koji nisu antagonisti vitamina K (engl. non-vitamin K antagonist oral anticoagulants), GUK – glukoza u krvi (engl. blood glucose), IQR – interkvartilni raspon (engl. interquartile range), eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. estimated glomerular filtration rate), SD – standardna devijacija (engl. standard deviation), HDL – lipoproteini visoke gustoće (engl. high density lipoproteins), LDL – lipoproteini niske gustoće (engl. low density lipoproteins), CT – kompjutorizirana tomografija (engl. computed tomography), AST – aspartat-aminotransferaza (engl. aspartate aminotransferase), ALT – alanin-aminotransferaza (engl. alanine aminotransferase), ALP – alkalna fosfataza (engl. alkaline phosphatase), CRP – C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein), GGT – gama-glutamil transferaza (engl. gamma-glutamyl transferase), CK – kreatin kinaza (engl. creatine kinase), LDH – laktat dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase), NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (engl. N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide), LVId – unutarnji promjer lijevog ventrikula u dijastoli (engl. left ventricle internal dimension at diastole), LVIdS – unutarnji promjer lijevog ventrikula u sistoli (engl. left ventricle internal dimension at systole), IVSd – debljina interventrikularnog septuma u dijastoli (engl. interventricular septum thickness in diastole), LVPW – debljina stražnje stijenke lijevog ventrikula u dijastoli (engl. left ventricular posterior wall thickness in diastole), LVEDV – teledijastolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end diastolic volume), LVESV – telesistolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end systolic volume), LVEF – ejekcijska frakcija lijevog ventrikula (engl. left ventricular ejection fraction), RWT – relativna debljina stijenke lijevog ventrikula (engl. relative wall thickness), Vmax – maksimalna brzina protoka preko aortalnog zaliska (engl. peak velocity), PGmax – maksimalni gradijent tlaka (engl. maximum pressure gradient), PGmean – srednji gradijent tlaka (engl. mean pressure gradient), AVA – površina aortalnog zaliska (engl. aortic valve area), AVAI – indeksirana površina aortalnog zaliska (engl. indexed aortic valve area), LVOT – izlazni trakt lijevog ventrikula (engl. left ventricular outflow tract), LVOT Vmax – maksimalna brzina protoka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum velocity), LVOT PGmax – maksimalni gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum pressure gradient), LVOT PGmean – srednji gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT mean pressure gradient), UZV – ultrazvuk srca (engl. echocardiography). Nakon Bonferroni korekcije, značajne spolne razlike zadržane su za BSA, GGT, Hb, LV dimenzije/volumene/masu, LVOT promjer (izraženije remodeliranje) i CT Ca score. Ostale varijable nisu dosegle korekcijski prag.

5.1.4. Usporedba demografskih, kliničkih, laboratorijskih i ehokardiografskih karakteristika CAVS bolesnika (teški stadij bolesti) i zdravih, kontrolnih ispitanika

U usporedbi sa skupinom zdravih kontrola, bolesnici s kalcificiranom aortalnom stenozom (CAVS) bili su značajno stariji (71,0 vs. 60,0 godina, $P < 0,001$) te su imali viši indeks tjelesne mase (30,0 vs. 27,8 kg/m², $P = 0,008$) (Tablica 14). Učestalost muškaraca bila je slična između skupina (49,3% vs. 50,0%, $P > 0,999$), kao i udio aktivnih pušača ($P = 0,465$). Među komorbiditetima, arterijska hipertenzija ($P < 0,001$) i hiperlipoproteinemija ($P < 0,001$) bile su znatno češće u CAVS skupini, dok su cerebrovaskularni incidenti (CVI/TIA) također bili zastupljeniji ($P = 0,010$).

U farmakoterapiji, bolesnici s CAVS značajno češće su uzimali varfarin, antitrombotične lijekove (klopidogrel/aspirin), ACE/AT inhibitore, beta-blokatore, statine i diuretike (sve $P < 0,001$), što odražava prisutnost višestrukih kardiovaskularnih bolesti i terapijskih indikacija.

Od laboratorijskih parametara, bolesnici s CAVS imali su povišene vrijednosti ureje ($P = 0,022$), urata ($P = 0,025$), LDH ($P < 0,001$) i fibrinogena ($P < 0,001$), te snižene vrijednosti ALT ($P = 0,001$), hemoglobina ($P = 0,005^*$) i broja eritrocita ($P = 0,006^*$) (Slika 25). Vrijednosti NT-proBNP bile su višestruko više u CAVS skupini (641,7 vs. 98,1 pg/mL, $P < 0,001$), što potvrđuje hemodinamsko opterećenje i prisutnost dijastoličke disfunkcije.

Na ehokardiografiji (Slika 26-28), bolesnici s CAVS imali su značajno povećanu debljinu interventrikularnog septuma i stražnje stijenke lijevog ventrikula (obje $P < 0,001$), veću masu i indeksiranu masu lijevog ventrikula ($P < 0,001$), te sniženu ejijsku frakciju (LVEF, $P < 0,001$). Lijevi atrij bio je proširen (LAVI, $P < 0,001$), a LVOT promjer manji ($P < 0,001$). Hemodinamski parametri jasno su potvrdili stenozu s višestruko povećanom brzinom protoka (V_{max} 4,6 vs. 1,4 m/s, $P < 0,001$) i gradijentima tlaka ($P < 0,001$), uz smanjenu površinu aortnog ušća (AVA 0,8 vs. 2,8 cm², $P < 0,001$).

Nakon Bonferroni korekcije za višestruke usporedbe ($P_c = 0,000625$), statistički značajne razlike zadržale su se za BSA, GGT, hemoglobin, LV morfometrijske pokazatelje (debljina, volumen i masa), LVOT promjer te hemodinamske parametre (V_{max} , PG_{max} , PG_{mean} , AVA, AVAI). Ostale razlike izgubile su značaj nakon korekcije.

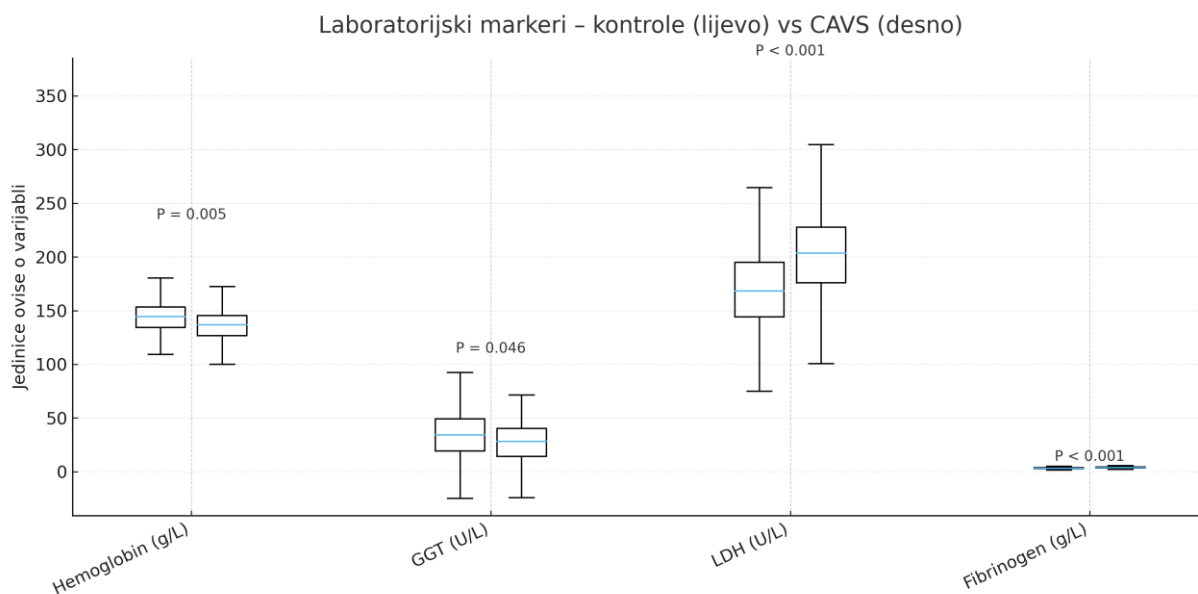
Tablica 14. Osnovne demografske, kliničke, laboratorijske i ehokardiografske karakteristike CAVS bolesnika (teški stadij bolesti)u usporedbi s kontrolnim, zdravim ispitanicima

	Svi ispitanici N = 175	Zdrave kontrole N = 100	CAVS N = 75	P vrijednosti
<i>Dob</i>	65.0 (56.0-73.0)	60.0 (54.0-66.8)	71.0 (66.0-77.0)	< 0.001
<i>Spol, muškarci</i>	87.0 (49.7)	50.0 (50.0)	37.0 (49.3)	> 0.999
<i>Pušači</i>	38.0 (22.0)	20.0 (20.0)	18.0 (24.7)	0.465
<i>BMI, kg/m²</i>	28.9 (25.9-31.8)	27.8 (25.3-30.0)	30.0 (26.3-33.1)	0.008
<i>BSA, m²</i>	1.9 (1.8-2.1)	1.9 (1.8-2.2)	1.9 (1.8-2.1)	0.008
Komorbiditeti				
<i>Pozitivna obiteljska anamneza CAVS-a</i>	42.0 (24.3)	27.0 (27.0)	15.0 (20.5)	0.372
<i>Arterijska hipertenzija</i>	131.0 (75.7)	64.0 (64.0)	67.0 (91.8)	< 0.001
<i>Dijabetes</i>	28.0 (16.2)	13.0 (13.0)	15.0 (20.5)	0.213
<i>Hiperlipoproteinemia</i>	85.0 (49.1)	34.0 (34.0)	51.0 (69.9)	< 0.001
<i>CVI/TIA</i>	8.0 (4.6)	1.0 (1.0)	7.0 (9.6)	0.010
<i>CAD</i>	10.0 (5.8)	4.0 (4.0)	6.0 (8.2)	0.326
<i>PAD</i>	18.0 (10.4)	9.0 (9.0)	9.0 (12.3)	0.615
<i>AF</i>	16.0 (10.1)	7.0 (7.0)	9.0 (15.5)	0.104
Lijekovi				
<i>Warfarin</i>	19.0 (11.0)	0.0 (0.0)	19.0 (26.0)	< 0.001
<i>NOAC</i>	7.0 (4.0)	6.0 (6.0)	1.0 (1.4)	0.241
<i>Clopidogrel/Aspirin</i>	68.0 (39.3)	13.0 (13.0)	55.0 (75.3)	< 0.001
<i>ACE/AT inhibitori</i>	112.0 (64.7)	52.0 (52.0)	60.0 (82.2)	< 0.001
<i>Blokatori kalcijevih kanala</i>	63.0 (36.4)	30.0 (30.0)	33.0 (45.2)	0.055
<i>Beta blokatori</i>	81.0 (46.8)	28.0 (28.0)	53.0 (72.6)	< 0.001
<i>Statini</i>	67.0 (38.7)	22.0 (22.0)	45.0 (61.6)	< 0.001
<i>Diuretici</i>	37.0 (21.4)	7.0 (7.0)	30.0 (41.1)	< 0.001
<i>Insulin</i>	5.0 (2.9)	2.0 (2.0)	3.0 (4.1)	0.651
<i>Metformin</i>	23.0 (13.3)	9.0 (9.0)	14.0 (19.2)	0.069
<i>Drugi hipoglikemici</i>	9.0 (5.2)	4.0 (4.0)	5.0 (6.8)	0.496
Laboratorijski nalazi				
<i>GUK, mmol/L</i>	6.0 (5.5-6.7)	5.9 (5.4-6.5)	6.1 (5.5-6.9)	0.434
<i>urea, mmol/L</i>	6.8 (5.7-8.2)	6.0 (5.6-7.1)	7.0 (5.8-9.2)	0.022
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	79.5 (65.0-90.5)	81.0 (65.0-97.0)	77.0 (65.0-88.5)	0.524
<i>eGFR, ml / min /1.73 m²</i>	81.7 (69.5-93.1)	84.6 (67.4-93.5)	80.1 (70.1-92.7)	0.728
<i>Urati, μmol/L</i>	363.0±109.0	331.0±86.7	377.4±115.4	0.025
<i>Ukupni proteini, g/L</i>	73.2±4.9	73.1±4.5	73.3±5.1	0.861
<i>Serumski albumin, g/L</i>	43.0 (41.0-46.0)	43.0 (42.0-45.0)	43.0 (41.0-46.0)	0.776
<i>Trigliceridi, mmol/L</i>	1.3 (1.0-1.9)	1.5 (1.1-2.2)	1.2 (1.0-1.8)	0.104
<i>Kolesterol, mmol/L</i>	5.1 (4.3-6.3)	5.4 (4.4-6.3)	5.0 (4.2-6.0)	0.103
<i>HDL, mmol/L</i>	1.3 (1.1-1.5)	1.2 (1.1-1.4)	1.3 (1.1-1.5)	0.358
<i>LDL, mmol/L</i>	3.1 (2.3-4.0)	3.5 (2.5-4.1)	3.1 (2.2-3.9)	0.071
<i>Ukupni Ca, mmol/L</i>	2.4 (2.3-2.5)	2.4 (2.3-2.5)	2.4 (2.3-2.5)	0.615
<i>AST, U/L</i>	24.0 (21.0-31.0)	26.0 (21.0-31.0)	24.0 (21.0-32.5)	0.452
<i>ALT, U/L</i>	22.0 (17.0-30.0)	25.0 (20.0-36.0)	21.0 (15.0-24.5)	0.001
<i>LDH, U/L</i>	196.5 (170.0-228.0)	170.0 (148.0-199.0)	203.0 (181.0-234.5)	< 0.001
<i>CK, U/L</i>	96.5 (67.0-144.3)	96.0 (67.0-141.0)	97.0 (66.5-148.0)	0.735
<i>GGT, U/L</i>	29.5 (19.0-43.8)	35.0 (23.0-54.0)	28.0 (17.0-41.5)	0.046
<i>ALP, U/L</i>	76.0 (64.0-91.0)	85.0 (67.8-100.3)	71.0 (60.5-90.0)	0.033
<i>Amilaza, U/L</i>	51.0 (40.0-69.0)	45.0 (37.5-67.0)	55.0 (41.0-69.5)	0.214
<i>CRP, mg/L</i>	2.6 (1.3-4.2)	2.6 (1.1-4.2)	2.6 (1.3-4.2)	0.929
<i>Troponin, μg/l</i>	0.01 (0.01-0.03)	0.01 (0.01-0.02)	0.01 (0.01-0.03)	0.509
<i>NT-proBNP, pg/ml</i>	393.0 (121.0-1252.0)	98.1 (76.9-119.2)	641.7 (309.2-1705.0)	< 0.001
<i>Leukociti x10⁹/L</i>	6.7 (5.6-8.7)	6.9 (5.9-8.8)	6.5 (5.3-8.7)	0.733
<i>Eritrociti x10¹²/L</i>	4.6±0.5	4.8±0.5	4.6±0.5	0.006
<i>Haemoglobin, g/L</i>	138.9±14.7	144.4±13.8	136.2±14.4	0.005
<i>Trombociti, x10⁹/L</i>	202.0 (176.0-267.8)	233.0 (188.0-278.0)	195.0 (174.0-263.0)	0.037
<i>Fibrinogen, g/L</i>	3.6 (3.1-4.0)	3.1 (2.8-3.7)	3.8 (3.4-4.3)	< 0.001
Podaci o tlaku				
<i>Sistolčki krvni tlak, mmHg</i>	130.0 (120.0-140.0)	130.0 (120.0-140.0)	130.0 (120.0-140.09)	0.531
<i>Dijastolički krvni tlak, mmHg</i>	80.0 (70.0-85.0)	80.0 (80.0-90.0)	75.0 (70.0-85.0)	< 0.001
<i>Tlak pulsa, mmHg</i>	50.0 (45.0-60.0)	50.0 (40.0-53.8)	55.0 (50.0-65.0)	< 0.001
<i>Srednji arterijski tlak, mmHg</i>	96.5 (89.8-103.2)	96.5 (93.2-106.4)	94.8 (88.1-102.3)	0.020
UZV srca				
<i>LVIDd, mm</i>	50.0 (46.0-54.0)	50.0 (47.0-52.0)	51.0 (45.0-55.5)	0.274
<i>LVIDs, mm</i>	33.0 (31.0-35.0)	33.0 (30.0-34.0)	34.0 (31.0-38.0)	0.028
<i>IVSd, mm</i>	13.0 (11.0-15.0)	11.0 (10.0-12.0)	15.0 (14.0-16.0)	< 0.001
<i>LVPW, mm</i>	13.0 (11.0-15.0)	11.0 (10.0-12.0)	15.0 (14.0-16.0)	< 0.001
<i>Anulus aorte</i>	24.0 (23.0-27.0)	24.0 (23.0-26.0)	24.0 (22.5-27.0)	0.988
<i>LAVI, ml/m²</i>	27.0 (20.0-39.0)	21.0 (18.0-27.0)	39.0 (31.0-49.0)	< 0.001
<i>LVEDV, ml</i>	118.0 (93.0-136.0)	118.0 (96.0-130.0)	115.0 (91.0-148.8)	0.504
<i>LVESV, ml</i>	43.0 (36.0-53.0)	43.0 (34.0-50.0)	45.0 (37.3-62.5)	0.014
<i>LVEF, %</i>	64.0 (60.0-67.0)	65.0 (62.0-68.0)	62.0 (53.0-65.0)	< 0.001
<i>Masa LV, g</i>	248.0 (200.3-335.0)	207.0 (170.0-246.0)	335.0 (294.0-406.0)	< 0.001
<i>Indeksirana masa LV, g/m²</i>	130.9 (99.0-180.0)	102.0 (89.0-126.0)	181.0 (156.5-216.3)	< 0.001
<i>Vmax, m/s</i>	1.7 (1.4-4.5)	1.4 (1.3-1.6)	4.6 (4.2-5.0)	< 0.001
<i>PGmax, mmHg</i>	12.0 (7.5-79.5)	7.8 (6.5-10.6)	85.1 (71.4-100.5)	< 0.001
<i>PGmean, mmHg</i>	6.4 (4.0-47.9)	4.2 (3.5-5.4)	50.9 (41.8-60.0)	< 0.001
<i>Time Velocity Integral, cm</i>	67.1±42.3	32.9±6.6	113.5±20.2	< 0.001

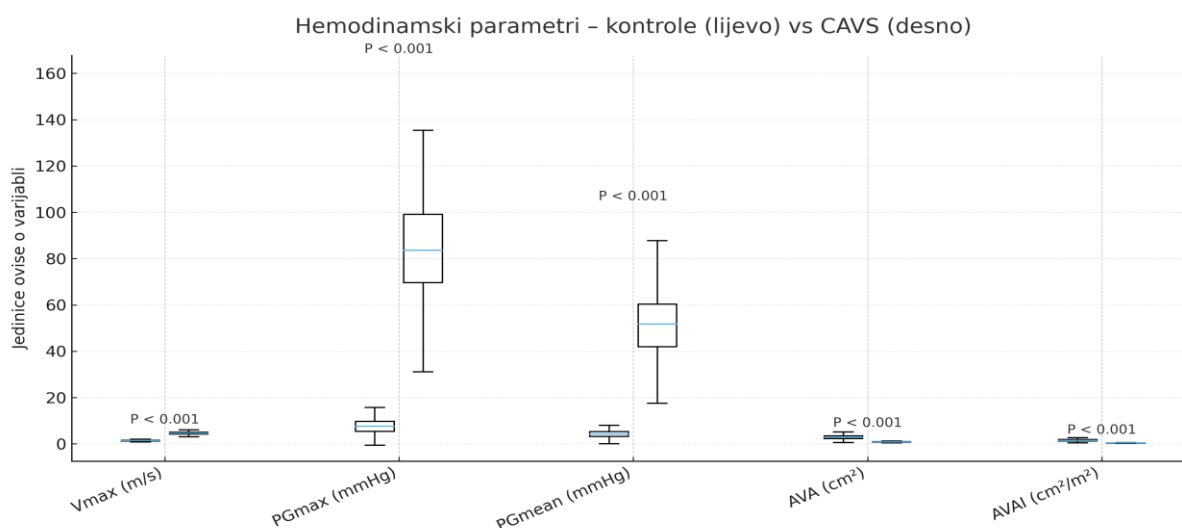
Tablica 14. Nastavak

	Svi ispitanici N = 175	Zdrave kontrole N = 100	CAVS N = 75	P vrijednosti
AVA, cm ²	2.1 (0.8-2.9)	2.8 (2.3-3.5)	0.8 (0.7-0.9)	< 0.001
AVAI, cm/m ²	1.1 (0.4-1.5)	1.5 (1.2-1.8)	0.4 (0.4-0.5)	< 0.001
LVOT Vmax, m/s	1.0±0.2	1.0±0.2	1.0±0.2	0.114
LVOT PGmax, mmHg	3.7 (2.9-4.5)	3.6 (2.8-4.5)	3.8 (3.1-4.5)	0.339
LVOT PGmean, mmHg	1.9 (1.4-2.4)	1.9 (1.4-2.3)	2.0 (1.5-2.5)	0.124
LVOT dijametar, mm	21.0 (20.0-23.0)	22.0 (21.0-24.0)	21.0 (19.0-22.0)	< 0.001
CT nalazi				
CT Ca score, AU	---	---	---	---

Ovisno o tome radi li se o kategoričkim ili kontinuiranim varijablama te o njihovoj raspodjeli (Gaussova distribucija ili distribucija koja odstupa od normale), podaci su prikazani kao frekvencija (n) i postotak (%), medijan i interkvartilni raspon (IQR, engl. interquartile range) ili kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija, engl. standard deviation). Testovi: χ^2 /Fisher za kategoričke; t-test/Mann-Whitney za kontinuirane. Statistički značajnom smatrana je vrijednost $P < 0.050.2$ korigirane prema Bonferroni korekciji za višestruke usporedbe ($P_c = 0.000625$). Kratice: AU – proizvoljne jedinice (engl. arbitrary units), BMI – indeks tjelesne mase (engl. body mass index), BSA – površina tijela (engl. body surface area), CAD – koronarna ateroskleroza (engl. coronary artery disease), PAD – periferna arterijska bolest (engl. peripheral artery disease), AF – fibrilacija atrija (engl. atrial fibrillation), NOAC – antikoagulansi koji nisu antagonisti vitamina K (engl. non-vitamin K antagonist oral anticoagulants), GUK – glukoza u krvi (engl. blood glucose), IQR – interkvartilni raspon (engl. interquartile range), eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. estimated glomerular filtration rate), SD – standardna devijacija (engl. standard deviation), HDL – lipoproteini visoke gustoće (engl. high density lipoproteins), LDL – lipoproteini niske gustoće (engl. low density lipoproteins), CT – kompjutorizirana tomografija (engl. computed tomography), AST – aspartat-aminotransferaza (engl. aspartate aminotransferase), ALT – alanin-aminotransferaza (engl. alanine aminotransferase), ALP – alkalna fosfataza (engl. alkaline phosphatase), CRP – C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein), GGT – gama-glutamil transferaza (engl. gamma-glutamyl transferase), CK – kreatin kinaza (engl. creatine kinase), LDH – laktat dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase), NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (engl. N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide), LVIDd – unutarnji promjer lijevog ventrikula u diastoli (engl. left ventricle internal dimension at diastole), LVIDs – unutarnji promjer lijevog ventrikula u sistoli (engl. left ventricle internal dimension at systole), IVSd – debljina interventrikularnog septuma u diastoli (engl. interventricular septum thickness in diastole), LVPW – debljina stražnje stijenke lijevog ventrikula u diastoli (engl. left ventricular posterior wall thickness in diastole), LVEDV – teledijastolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end diastolic volume), LVESV – telesistolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end systolic volume), LVEF – ejekcijska frakcija lijevog ventrikula (engl. left ventricular ejection fraction), RWT – relativna debljina stijenke lijevog ventrikula (engl. relative wall thickness), Vmax – maksimalna brzina protoka preko aortalnog zaliska (engl. peak velocity), PGmax – maksimalni gradijent tlaka (engl. maximum pressure gradient), PGmean – srednji gradijent tlaka (engl. mean pressure gradient), AVA – površina aortalnog zaliska (engl. aortic valve area), AVAi – indeksirana površina aortalnog zaliska (engl. indexed aortic valve area), LVOT – izlazni trakt lijevog ventrikula (engl. left ventricular outflow tract), LVOT Vmax – maksimalna brzina protoka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum velocity), LVOT PGmax – maksimalni gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum pressure gradient), LVOT PGmean – srednji gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT mean pressure gradient), UZV – ultrazvuk srca (engl. echocardiography). Nakon Bonferroni korekcije, značajne spolne razlike zadržane su za BSA, GGT, Hb, LV dimenzije/volumene/masu, LVOT promjer (izraženije remodeliranje) i CT Ca score. Ostale varijable nisu dosegle korekcijski prag.

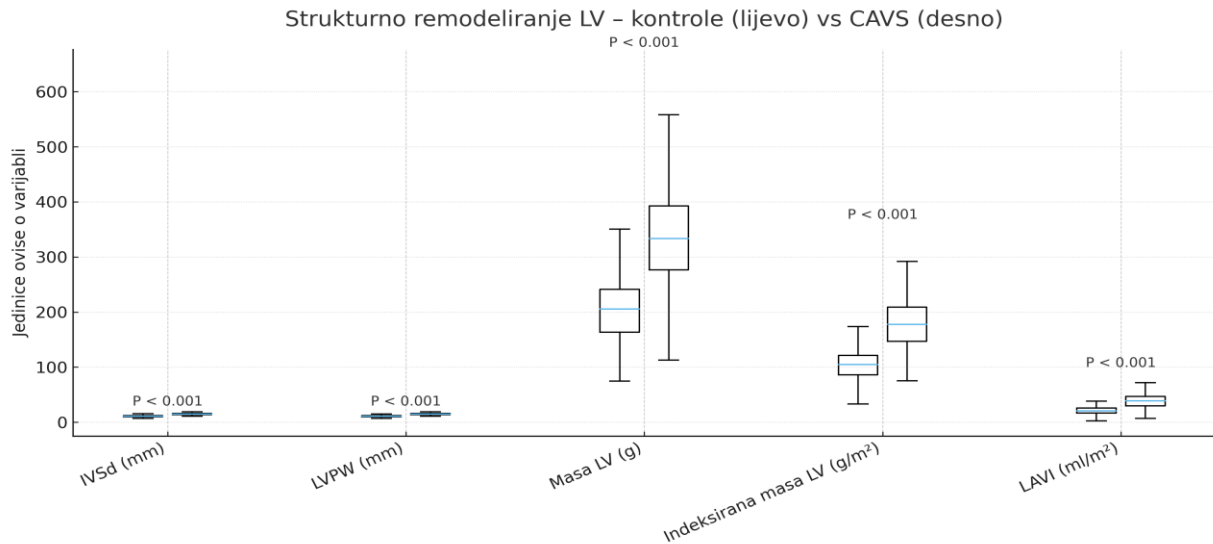


Slika 25. Usporedba laboratorijskih markera između kontrola i CAVS skupine. Stupčasti prikaz srednjih vrijednosti \pm SD za hemoglobin, GGT, LDH i fibrinogen. Bolesnici s CAVS-om imaju snižene vrijednosti hemoglobina i GGT-a te povišene vrijednosti LDH i fibrinogena ($P < 0,001$ za LDH i fibrinogen; $P = 0,005$ za hemoglobin). Ti nalazi odražavaju upalno-metaboličku aktivaciju i povećano tkivno opterećenje kod CAVS-a. Kratice: Hb – hemoglobin; GGT – gama-glutamyl transferaza (engl. gamma-glutamyl transferase); LDH – laktat-dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase); Fbg – fibrinogen.

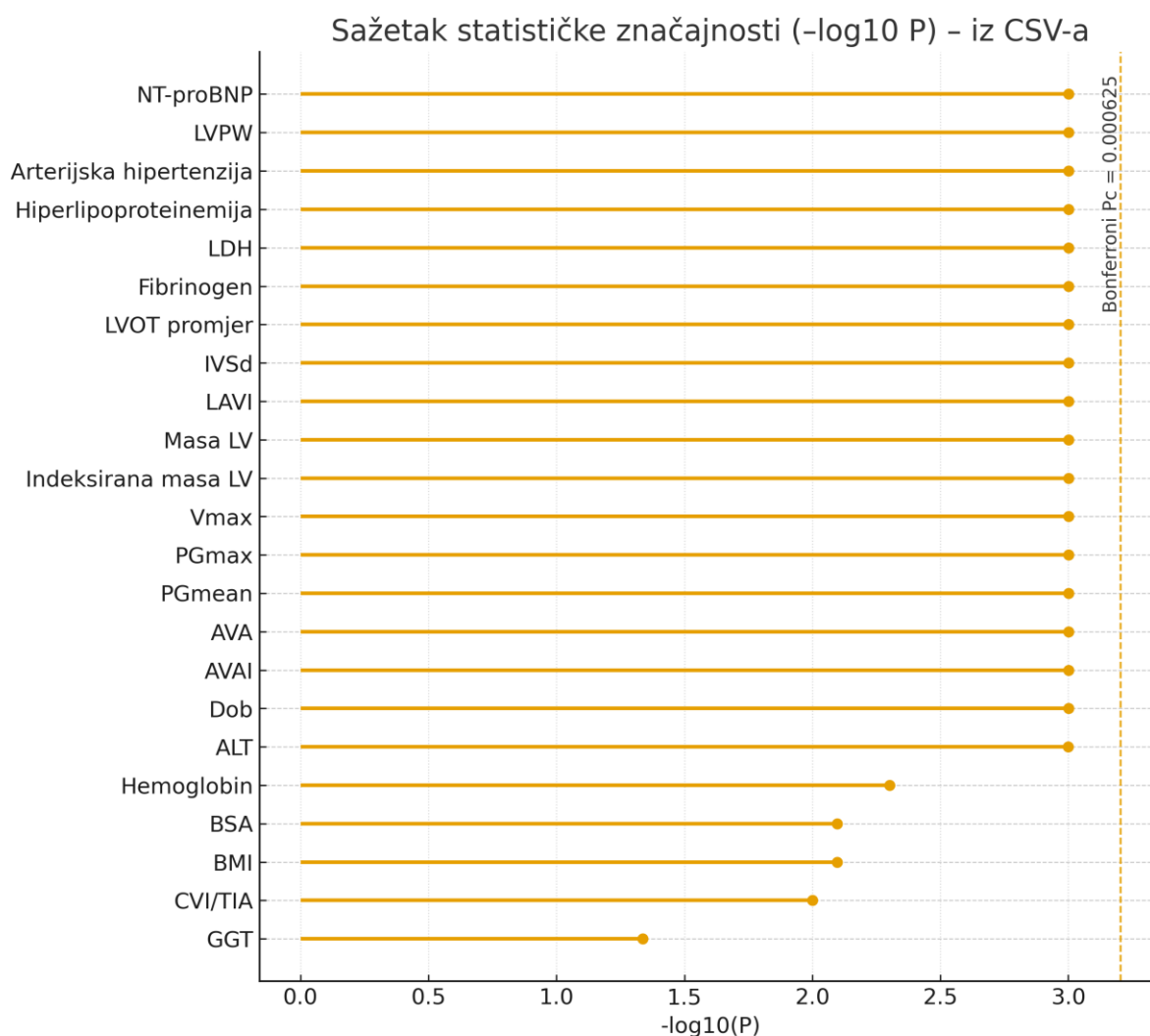


Slika 26. Hemodinamski parametri aortalnog zaliska u skupinama kontrola i bolesnika s CAVS-om. Box-plot prikaz maksimalne brzine protoka (V_{max}), maksimalnog i srednjeg gradijenta tlaka (PG_{max} , PG_{mean}), površine aortalnog ušća (AVA) i indeksirane površine aortalnog ušća (AVAI) u kontrolnoj i CAVS skupini. U bolesnika s CAVS-om zabilježene su višestruko povećane vrijednosti V_{max} , PG_{max} i PG_{mean} uz značajno smanjenje AVA i

AVAI, što potvrđuje izraženu stenozu aortalnog zaliska ($P < 0,001$ za sve). Kratice: CAVS – kalcificirana aortalna stenozu (engl. calcific aortic valve stenosis); AVA – površina aortalnog ušća (engl. aortic valve area); AVAI – indeksirana površina aortalnog ušća (engl. indexed aortic valve area); Vmax – maksimalna brzina protoka preko aortalnog zaliska (engl. peak velocity); PGmax – maksimalni gradijent tlaka (engl. maximum pressure gradient); PGmean – srednji gradijent tlaka (engl. mean pressure gradient).



Slika 27. Strukturno remodeliranje lijevog ventrikula u CAVS-u. Box-plot prikaz debljine interventrikularnog septuma (IVSd), stražnje stijenke lijevog ventrikula (LVPW), ukupne i indeksirane mase lijevog ventrikula te volumena lijevog atrija (LAVI). CAVS bolesnici pokazuju izraženu koncentričnu hipertrofiiju lijevog ventrikula i povećanje LAVI-ja, što je u skladu s kroničnim pritiskom preopterećenja ($P < 0,001$ za sve nakon Bonferroni korekcije). Kratice: IVSd – debljina interventrikularnog septuma u dijastoli (engl. interventricular septum thickness in diastole); LVPW – debljina stražnje stijenke lijevog ventrikula u dijastoli (engl. left ventricular posterior wall thickness in diastole); LAVI – volumen lijevog atrija indeksiran na BSA (engl. left atrial volume index); LV mass – masa lijevog ventrikula; LV mass index – indeksirana masa lijevog ventrikula; BSA – površina tijela (engl. body surface area).



Slika 28. Sažetak statističke značajnosti između skupina ($-\log_{10} P$). Horizontalni prikaz $-\log_{10}$ transformiranih P -vrijednosti za sve analizirane varijable u usporedbi kontrolne i CAVS skupine. Isprekidana vertikalna linija označuje Bonferroni-korekcijski prag ($P_c = 0,000625$). Varijable smještene desno od praga zadržale su statističku značajnost i nakon korekcije za višestruke usporedbe. Najizraženije razlike zabilježene su za NT-proBNP, debljinu stijenke lijevog ventrikula (IVSd, LVPW), masu i indeksiranu masu lijevog ventrikula, hemodinamske parametre aortalnog zaliska (Vmax, PGmax, PGmean, AVA, AVAI) i fibrinogen. Kratice: CAVS – kalcificirana aortalna stenoza (engl. calcific aortic valve stenosis); $-\log_{10}(P)$ – negativni dekadski logaritam P -vrijednosti; P_c – Bonferroni-korekcijski prag značajnosti; BMI – indeks tjelesne mase (engl. body mass index); BSA – površina tijela (engl. body surface area); Dob – kronološka dob ispitanika; CVI/TIA – cerebrovaskularni inzult / tranzitorna ishemijska ataka; ALT – alanin-aminotransferaza (engl. alanine aminotransferase); GGT – gama-glutamyl transferaza (engl. gamma-glutamyl transferase); LDH – laktat-dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase); Fibrinogen – fibrinogen (g/L); IVSd – debljina interventrikularnog septuma u diastoli (engl. interventricular septum thickness in diastole); LVPW – debljina stražnje stijenke lijevog ventrikula u diastoli (engl. left ventricular posterior wall thickness in diastole); Masa LV / Indeksirana masa LV – ukupna i indeksirana masa lijevog ventrikula; LAVI – indeksirani volumen lijevog atrija (engl. left atrial volume index); LVOT promjer – promjer izlaznog trakta lijevog ventrikula (engl. left ventricular outflow tract diameter); Vmax – maksimalna brzina protoka preko aortalnog zaliska (engl. peak velocity); PGmax – maksimalni gradijent tlaka (engl. maximum pressure gradient); PGmean – srednji gradijent tlaka (engl. mean pressure gradient); AVA – površina aortalnog ušća (engl. aortic valve area); AVAI – indeksirana površina aortalnog ušća (engl. indexed aortic valve area); NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (engl. N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide); Arterijska hipertenzija / Hiperlipoproteinemija – prisutnost dijagnostificirane hipertenzije odnosno dislipidemije; Hemoglobin – koncentracija hemoglobina (g/L)

5.1.5. Opće karakteristike ispitanika s blagim i umjerenim stadijem CAVS-a

U skupini od 59 bolesnika s blagim i umjerenim oblikom kalcificirajuće aortalne stenoze nisu zabilježene razlike u osnovnim demografskim obilježjima, uključujući dob, učestalost pušenja, indeks tjelesne mase i površinu tijela (Tablica 15).

Komorbidity poput arterijske hipertenzije, dijabetesa, dislipidemije, cerebrovaskularnih događaja, koronarne i periferne arterijske bolesti bili su podjednako zastupljeni u obje skupine. Većina bolesnika primala je ACE/AT-inhibitore, beta-blokatore i statine, bez značajnih razlika među skupinama, osim za NOAC terapiju, koja je bila češća u bolesnika s blagim CAVS-om.

Laboratorijski nalazi, uključujući bubrežnu funkciju, parametre metabolizma lipida, jetrene enzime, markere upale, glukozu i hematološke parametre, također nisu pokazali statistički značajne razlike između blagoga i umjerenog stadija bolesti.

Mjere arterijskoga tlaka bile su usporedive među skupinama. S druge strane, ehokardiografski pokazatelji ukazali su na očekivano hemodinamsko i strukturno napredovanje bolesti: bolesnici s umjerenim CAVS-om imali su veću debljinu stražnje stijenke lijevog ventrikula, veći anulus aorte, veću masu i indeksiranu masu lijevog ventrikula, kao i bržu maksimalnu brzinu protoka preko aortalnog zaliska (V_{max}), više vrijednosti PG_{max} i PG_{mean} , te manju AVA i AVA_i .

Time je potvrđeno jasno razdvajanje hemodinamske težine stenoze između blagoga i umjerenog stadija. Ostali ehokardiografski parametri, uključujući veličine srčanih šupljina, ejekcijsku frakciju i LVOT mjere, nisu pokazali značajne razlike među skupinama.

Tablica 15. Osnovne demografske, kliničke, laboratorijske i ehokardiografske karakteristike CAVS ispitanika s blagim i umjerenim stupnjem oboljenja

	<i>Svi ispitanici</i> N = 59	<i>Blagi CAVS</i> N = 25	<i>Umjereni CAVS</i> N = 34	<i>P vrijednosti</i>
<i>Dob</i>	74.0 (67.0-80.0)	74.0 (65.5-80.0)	74.5 (68.0-79.3)	0.957
<i>Spol, muškarci, n (%)</i>	33.0 (55.9)	15.0 (60.0)	18.0 (52.9)	0.608
<i>Pušači</i>	21.0 (35.6)	9.0 (36.0)	12.0 (35.3)	> 0.999
<i>BMI, kg/m²</i>	29.2±4.2	29.5±4.4	28.9±4.1	0.594
<i>BSA, m²</i>	1.9±0.2	1.95±0.2	1.9±0.2	0.266
Komorbiditeti				
<i>Pozitivna obiteljska anamneza CAVS-a</i>	25.0 (42.4)	11.0 (44.0)	14.0 (41.2)	> 0.999
<i>Arterijska hipertenzija</i>	55.0 (93.2)	25.0 (100.0)	35.0 (88.2)	0.130
<i>Dijabetes</i>	18.0 (30.5)	6.0 (24.0)	12.0 (35.3)	0.403
<i>Hiperlipoproteinemia</i>	32.0 (54.2)	12.0 (48.0)	20.0 (58.8)	0.440
<i>CVI/TIA</i>	6.0 (10.2)	4.0 (16.0)	2.0 (5.9)	0.386
<i>CAD</i>	8.0 (13.6)	4.0 (16.0)	4.0 (11.8)	0.711
<i>PAD</i>	10.0 (16.9)	2.0 (8.0)	8.0 (23.5)	0.166
Lijekovi				
<i>Warfarin</i>	5.0 (8.5)	2.0 (8.0)	3.0 (8.8)	> 0.999
<i>NOAC</i>	5.0 (8.5)	5.0 (20.0)	0.0 (0.0)	0.011
<i>Clopidogrel/Aspirin</i>	20.0 (33.9)	7.0 (28.0)	13.0 (38.2)	0.579
<i>ACE/AT inhibitori</i>	47 (79.7)	21.0 (84.0)	26.0 (76.5)	0.532
<i>Blokatori kalcijских kanala</i>	35.0 (59.3)	14.0 (56.0)	21.0 (61.8)	0.790
<i>Beta blokatori</i>	37.0 (45.8)	12.0 (48.0)	15.0 (44.1)	0.797
<i>Statini</i>	23.0 (39.0)	6.0 (24.0)	17.0 (50.0)	0.060
<i>Diuretici</i>	22.0 (37.3)	11.0 (44.0)	11.0 (32.4)	0.421
<i>Insulin</i>	2.0 (3.4)	1.0 (4.0)	1.0 (2.9)	> 0.999
<i>Metformin</i>	10.0 (16.9)	5.0 (20.0)	5.0 (14.7)	0.729
<i>Drugi hipoglikemici</i>	6.0 (10.2)	2.0 (8.0)	4.0 (11.8)	> 0.999
Laboratorijski nalazi				
<i>GUK, mmol/L</i>	6.1 (5.3-7.3)	6.1 (5.5-7.5)	6.0 (5.1-7.1)	0.368
<i>urea, mmol/L</i>	6.0 (5.0-8.0)	6.0 (5.0-8.0)	6.0 (5.0-8.0)	0.840
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	72.0 (62.3-90.5)	72.0 (66.5-90.0)	72.0 (60.0-90.0)	0.921
<i>eGFR, ml / min /1,73 m²</i>	82.5±25.9	85.4±24.2	80.6±27.2	0.515
<i>Urati, μmol/L</i>	371.2±68.1	382.5±68.4	362.8±67.9	0.310
<i>Ukupni proteini, g/L</i>	70.0 (62.0-72.0)	70.0 (60.5-72.0)	70.5 (64.0-72.0)	0.722
<i>Serumski albumin, g/L</i>	40.0 (38.3-43.0)	41.0 (40.0-43.8)	41.0 (38.0-43.0)	0.461
<i>Trigliceridi, mmol/L</i>	1.4 (1.0-1.9)	1.4 (1.0-2.0)	1.4 (1.0-1.8)	0.727
<i>Kolesterol, mmol/L</i>	5.0±1.5	5.0±1.7	5.0±1.3	0.949
<i>HDL, mmol/L</i>	1.1 (1.0-1.4)	1.3 (1.1-1.4)	1.1 (1.0-1.4)3.0-	0.285
<i>LDL, mmol/L</i>	3.1±1.2	3.1±1.3	3.1±1.2	0.991
<i>Ukupni Ca, mmol/L</i>	2.4 (2.3-2.4)	2.3 (2.3-2.4)	2.4 (2.3-2.4)	0.878
<i>AST, U/L</i>	27.5 (21.8-35.5)	27.0 (20.0-37.0)	28.0 (24.0-35.0)	0.581
<i>ALT, U/L</i>	24.0 (19.0-33.3)	23.0 (19.0-39.0)	25.0 (19.0-32.0)	0.823
<i>LDH, U/L</i>	183.0 (156.0-241.0)	169.5 (150.0-205.8)	191.0 (159.0-260.0)	0.082
<i>CK, U/L</i>	85.0 (65.0-115.0)	80.5 (65.0-98.0)	90.0 (53.0-122.0)	0.620
<i>GGT, U/L</i>	41.0 (28.8-55.3)	42.0 (31.0-55.0)	42.0 (26.0-56.0)	0.739
<i>ALP, U/L</i>	65.3±28.3	63.9±27.3	66.2±29.5	0.391
<i>Amilaza, U/L</i>	42.5 (41.0-56.8)	41.0 (40.0-88.0)	43.0 (41.5-56.5)	0.640
<i>CRP, mg/L</i>	3.2 (1.2-6.4)	3.2 (1.7-7.5)	3.2 (1.2-6.4)	0.799
<i>Troponin, μg/l</i>	0.01 (0.01-0.05)	0.01 (0.01-0.02)	0.02 (0.01-0.06)	0.057
<i>NT-proBNP, pg/ml</i>	241.0 (137.1-628.4)	212.0 (125.0-321.0)	321.5 (138.0-674.3)	0.229
<i>Leukociti x10⁹/L</i>	7.7±1.7	7.7±1.7	7.7±1.7	0.932
<i>Eritrociti x10¹²/L</i>	4.5±0.5	4.6±0.6	4.5±0.4	0.320
<i>Haemoglobin, g/L</i>	140.0 (131.0-146.5)	142.0 (126.5-153.5)	137.5 (131.3-144.5)	0.212
<i>Trombociti, x10⁹/L</i>	266.0 (196.5-)	260.0 (198.5-288.5)	266.5 (191.0-299.0)	0.847
<i>Fibrinogen, g/L</i>	3.6 (3.1-4.0)	3.2 (3.0-4.0)	3.9 (3.1-4.1)	0.064
Podaci o tlaku				
<i>Sistolički krvni tlak, mmHg</i>	140.0 (130.0-145.0)	140.0 (130.0-150.0)	140.0 (130.0-145.0)	0.560
<i>Dijastolički krvni tlak, mmHg</i>	80.0 (80.0-90.0)	85.0 (80.0-90.0)	80.0 (80.0-90.0)	0.530
<i>Tlak pulsa, mmHg</i>	54.7±13.2	54.6±10.0	54.7±15.2	0.974
<i>Srednji arterijski tlak, mmHg</i>	100.0 (96.7-106.7)	100.0 (96.7-108.3)	100.0 (96.7-103.8)	0.443
UZV srca				
<i>LVIDd, mm</i>	49.7±5.4	48.6±4.8	50.5±5.7	0.078
<i>LVIDs, mm</i>	33.0 (30.0-36.0)	33.0 (30.5-36.0)	33.0 (30.0-36.3)	0.764
<i>IVSd, mm</i>	14.0 (13.0-15.0)	14.0 (12.5-15.5)	14.0 (13.0-15.3)	0.228
<i>LVPW, mm</i>	13.8±2.0	13.2±1.8	14.2±2.0	0.038
<i>Anulus aorte</i>	24.0 (23.0-26.0)	24.0 (22.0-25.5)	25.0 (23.0-28.0)	0.040
<i>LAVI, ml/m²</i>	30.0 (26.0-43.0)	30.0 (25.0-38.5)	31.0 (26.8-44.3)	0.504
<i>LVEDV, ml</i>	115.6±28.3	112.0±23.4	118.3±31.5	0.387
<i>LVESV, ml</i>	48.2±15.8	47.4±12.5	48.8±18.0	0.732
<i>LVEF, %</i>	61.0 (57.0-65.0)	62.0 (54.5-65.0)	61.0 (57.0-66.3)	0.617
<i>Masa LV, g</i>	296.2±81.1	271.0±66.4	314.7±86.7	0.032
<i>Indeksirana masa LV, g/m²</i>	149.7 (123.4-166.6)	135.3 (116.8-158.8)	156.1 (136.0-187.1)	0.020
<i>Vmax, m/s</i>	3.1 (2.8-3.4)	2.8 (2.6-2.9)	3.4 (3.2-3.5)	< 0.001
<i>PGmax, mmHg</i>	39.2 (30.3-45.8)	30.2 (25.4-32.8)	44.8 (40.6-49.6)	< 0.001
<i>PGmean, mmHg</i>	22.8±8.3	17.3±3.1	26.8±8.7	< 0.001
<i>Time Velocity Integral, cm</i>	71.1 (62.8-78.1)	62.8 (55.6-69.7)	75.5 (69.8-82.1)	< 0.001
<i>AVA, cm²</i>	1.4 (1.3-1.7)	1.7 (1.6-1.9)	1.3 (1.2-1.4)	< 0.001
<i>AVAI, cm/m²</i>	0.8±0.1	0.9±0.1	0.7±0.1	< 0.001
<i>LVOT Vmax, m/s</i>	1.0±0.3	1.0±0.2	1.1±0.3	0.228

Tablica 15. Nastavak

	Svi ispitanici N = 59	Blagi CAVS N = 25	Umjereni CAVS N = 34	P vrijednosti
LVOT PGmax, mmHg	4.1 (3.2-5.4)	4.0 (3.3-4.7)	4.2 (3.2-6.1)	0.382
LVOT PGmean, mmHg	2.2 (1.8-2.9)	2.0 (1.8-2.8)	2.4 (1.7-3.3)	0.297
LVOT dijametar, mm	22.0 (20.0-24.0)	22.0 (21.0-24.0)	21.0 (19.0-23.3)	0.063
CT nalazi				
CT Ca score, AU	---	---	---	

Ovisno o tome radi li se o kategoričkim ili kontinuiranim varijablama te o njihovoj raspodjeli (Gaussova distribucija ili distribucija koja odstupa od normale), podaci su prikazani kao frekvencija (n) i postotak (%), medijan i interkvartilni raspon (IQR, engl. interquartile range) ili kao srednja vrijednost \pm SD (standardna devijacija, engl. standard deviation). Testovi: χ^2 /Fisher za kategoričke; t-test/Mann-Whitney za kontinuirane. Statistički značajnom smatrana je vrijednost $P < 0.050$.² korigirane prema Bonferroni korekciji za višestruke usporedbe ($P_c = 0.000625$). Kratice: AU – proizvoljne jedinice (engl. arbitrary units), BMI – indeks tjelesne mase (engl. body mass index), BSA – površina tijela (engl. body surface area), CAD – koronarna ateroskleroza (engl. coronary artery disease), PAD – periferna arterijska bolest (engl. peripheral artery disease), AF – fibrilacija atrija (engl. atrial fibrillation), NOAC – antikoagulansi koji nisu antagonisti vitamina K (engl. non-vitamin K antagonist oral anticoagulants), GUK – glukoza u krvi (engl. blood glucose), IQR – interkvartilni raspon (engl. interquartile range), eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. estimated glomerular filtration rate), SD – standardna devijacija (engl. standard deviation), HDL – lipoproteini visoke gustoće (engl. high density lipoproteins), LDL – lipoproteini niske gustoće (engl. low density lipoproteins), CT – kompjutorizirana tomografija (engl. computed tomography), AST – aspartat-aminotransferaza (engl. aspartate aminotransferase), ALT – alanin-aminotransferaza (engl. alanine aminotransferase), ALP – alkalna fosfataza (engl. alkaline phosphatase), CRP – C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein), GGT – gama-glutamil transferaza (engl. gamma-glutamyl transferase), CK – kreatin kinaza (engl. creatine kinase), LDH – laktat dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase), NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (engl. N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide), LVIDd – unutarnji promjer lijevog ventrikula u dijastoli (engl. left ventricle internal dimension at diastole), LVIDs – unutarnji promjer lijevog ventrikula u sistoli (engl. left ventricle internal dimension at systole), IVSd – debljina interventrikularnog septuma u dijastoli (engl. interventricular septum thickness in diastole), LVPW – debljina stražnje stijenke lijevog ventrikula u dijastoli (engl. left ventricular posterior wall thickness in diastole), LVEDV – teledijastolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end diastolic volume), LVESV – telesistolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end systolic volume), LVEF – ejekcijska frakcija lijevog ventrikula (engl. left ventricular ejection fraction), RWT – relativna debljina stijenke lijevog ventrikula (engl. relative wall thickness), Vmax – maksimalna brzina protoka preko aortalnog zaliska (engl. peak velocity), PGmax – maksimalni gradijent tlaka (engl. maximum pressure gradient), PGmean – srednji gradijent tlaka (engl. mean pressure gradient), AVA – površina aortalnog zaliska (engl. aortic valve area), AVAi – indeksirana površina aortalnog zaliska (engl. indexed aortic valve area), LVOT – izlazni trakt lijevog ventrikula (engl. left ventricular outflow tract), LVOT Vmax – maksimalna brzina protoka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum velocity), LVOT PGmax – maksimalni gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum pressure gradient), LVOT PGmean – srednji gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT mean pressure gradient), UZV – ultrazvuk srca (engl. echocardiography). Nakon Bonferroni korekcije, značajne spolne razlike zadržane su za BSA, GGT, Hb, LV dimenzije/volumene/masu, LVOT promjer (izraženi remodeliranje) i CT Ca score. Ostale varijable nisu dosegle korekcijski prag.

5.1.6. Usporedba demografskih, kliničkih, laboratorijskih i ehokardiografskih karakteristika ispitanika s različitim stadijem CAVS-a

Usporedba bolesnika s teškim CAVS-om u odnosu na one s blagim i umjerenim oblikom bolesti pokazala je da se skupine nisu razlikovale prema dobi, spolu, pušenju, nutritivnim parametrima (BMI, BSA) niti prema većini kardiovaskularnih komorbiditeta (Tablica 16). Iznimka je bila pozitivna obiteljska anamneza za CAVS, koja je bila češća u bolesnika s blagim i umjerenim oblikom u odnosu na teški CAVS. U farmakoterapiji su uočene jasne razlike: bolesnici s teškim CAVS-om značajno su češće uzimali antitrombocitne lijekove (aspirin/klopidogrel), β -blokatore i statine, dok je primjena NOAC terapije bila znatno češća u blagom, ali ne i u umjerenom stadiju bolesti.

Laboratorijski nalazi pokazali su nekoliko statistički značajnih razlika. Bolesnici s teškim CAVS-om imali su više vrijednosti ureje, ukupnih proteina, albumina, LDH-a i fibrinogena u odnosu na blagi stadij, dok su vrijednosti GGT-a bile niže u teškom u odnosu na oba blaža fenotipa bolesti. U odnosu na bolesnike s umjerenim CAVS-om, teški CAVS bio je obilježen nižim vrijednostima HDL-kolesterola i višljim LDH-om i GGT-om. Markeri srčanog opterećenja pokazali su najizraženije razlike: razine NT-proBNP-a bile su višestruko više u teškom CAVS-u u usporedbi s oba blaža stadija bolesti.

Mjere sistemskog arterijskog tlaka pokazale su da bolesnici s teškim CAVS-om imaju značajno niže sistoličke, dijastoličke i srednje arterijske tlakove u odnosu na blagi CAVS, što odražava hemodinamsku posljedicu uznapredovale stenotičke lezije; iste su razlike djelomično prisutne i u usporedbi s umjerenim CAVS-om.

Ehokardiografska analiza jasno je razdvojila tri stadija bolesti. U odnosu na blagi CAVS, teški CAVS bio je obilježen većim veličinama lijeve klijetke (LVIDd), značajno debljim septumom i stražnjom stijenkom LV-a, povišenim vrijednostima LAVI-ja te znatno većom masom i indeksiranom masom lijevog ventrikula. Hemodinamski parametri aortalne stenozе pokazuju najizraženije razlike: bolesnici s teškim CAVS-om imali su značajno veću Vmax, PGmax i PGmean, kao i veći TVI, dok je površina aortalnog ušća (AVA i AVAi) bila značajno manja u odnosu na oba blaža stadija bolesti. Ove razlike ostaju izrazite i u usporedbi s umjerenim CAVS-om, potvrđujući progresivno hemodinamsko opterećenje i strukturno

remodeliranje lijeve klijetke u sklopu napredovanja bolesti. Ostali parametri, uključujući LVEF, LV volumene i većinu LVOT mjera, nisu pokazali statistički značajne razlike.

Sveukupno, nalazi jasno ukazuju da se teški CAVS razlikuje od blagih i umjerenih stadija bolesti ponajprije po intenzitetu hemodinamske opstrukcije, izraženijem hipertrofičnom remodeliranju lijeve klijetke te povišenim biomarkerima srčanog stresa (NT-proBNP), dok većina demografskih, kliničkih i biokemijskih obilježja ostaje slična među skupinama.

Tablica 16. Osnovne demografske, kliničke, laboratorijske i ehokardiografske karakteristike CAVS ispitanika s obzirom na stadij oboljenja

	Teški CAVS N = 75	Blagi CAVS N = 25	P ^a vrijednost	Umjereni CAVS N = 34	P ^b vrijednosti
Dob	71.0 (66.0-77.0)	74.0 (65.5-80.0)	0.187	74.5 (68.0-79.3)	0.127
Spol, muškarci; n (%)	37.0 (49.3)	15.0 (60.0)	0.489	18.0 (52.9)	0.837
Pušači	18.0 (24.7)	9.0 (36.0)	0.305	12.0 (35.3)	0.259
BMI, kg/m ²	30.1±4.9	29.5±4.4	0.573	28.9±4.1	0.193
BSA, m ²	1.9±0.2	1.95±0.2	0.177	1.9±0.2	0.788
Komorbiditeti					
Pozitivna obiteljska anamneza CAVS-a	15.0 (20.5)	11.0 (44.0)	0.034	14.0 (41.2)	0.035
Arterijska hipertenzija	67.0 (91.8)	25.0 (100.0)	0.333	35.0 (88.2)	0.723
Dijabetes	15.0 (20.5)	6.0 (24.0)	0.780	12.0 (35.3)	0.150
Hiperlipoproteinemia	51.0 (69.9)	12.0 (48.0)	0.057	20.0 (58.8)	0.279
CVT/IA	7.0 (9.6)	4.0 (16.0)	0.464	2.0 (5.9)	0.716
CAD	6.0 (8.2)	4.0 (16.0)	0.271	4.0 (11.8)	0.723
PAD	9.0 (12.3)	2.0 (8.0)	0.724	8.0 (23.5)	0.162
Lijekovi					
Warfarin	19 (26.0)	2.0 (8.0)	0.088	3.0 (8.8)	0.044
NOAC	1.0 (1.4)	5.0 (20.0)	0.004	0.0 (0.0)	> 0.999
Clopidogrel/Aspirin	55.0 (75.3)	7.0 (28.0)	< 0.001	13.0 (38.2)	< 0.001
ACE/AT inhibitori	60.0 (82.2)	21.0 (84.0)	> 0.999	26.0 (76.5)	0.602
Blokatori kalcijevih kanala	33.0 (45.2)	14.0 (56.0)	0.366	21.0 (61.8)	0.146
Beta blokatori	53.0 (72.6)	12.0 (48.0)	0.030	15.0 (44.1)	0.005
Statini	45.0 (61.6)	6.0 (24.0)	0.002	17.0 (50.0)	0.296
Diuretici	30.0 (41.1)	11.0 (44.0)	0.818	11.0 (32.4)	0.522
Inzulin	3.0 (4.1)	1.0 (4.0)	> 0.999	1.0 (2.9)	> 0.999
Metformin	14.0 (19.2)	5.0 (20.0)	> 0.999	5.0 (14.7)	0.787
Drugi hipoglikemici	5.0 (6.8)	2.0 (8.0)	> 0.999	4.0 (11.8)	0.461
Laboratorijski nalazi					
GUK, mmol/L	6.1 (5.4-7.2)	6.1 (5.5-7.5)	0.674	6.0 (5.1-7.1)	0.457
urea, mmol/L	7.3 (6.0-9.8)	6.0 (5.0-8.0)	0.048	6.0 (5.0-8.0)	0.103
Kreatinin, µmol/L	83.0 (70.0-97.3)	72.0 (66.5-90.0)	0.804	72.0 (60.0-90.0)	0.683
eGFR, ml / min /1,73 m ²	80.1 (70.1-92.7)	93.4 (60.8-100.1)	0.324	76.1 (59.9-102.1)	0.687
Urat, µmol/L	377.4±115.4	382.5±68.4	0.799	362.8±67.9	0.429
Ukupni proteini, g/L	72.0 (70.0-76.0)	70.0 (60.5-72.0)	0.001	70.5 (64.0-72.0)	0.002
Serumski albumin, g/L	42.5 (40.0-45.3)	41.0 (40.0-43.8)	0.043	41.0 (38.0-43.0)	0.002
Trigliceridi, mmol/L	1.2 (0.9-1.8)	1.4 (1.0-2.0)	0.265	1.4 (1.0-1.8)	0.429
Kolesterol, mmol/L	4.8 (4.0-5.7)	5.5 (4.0-6.3)	0.825	4.9 (4.0-5.7)	0.752
HDL, mmol/L	1.3 (1.1-1.5)	1.3 (1.1-1.4)	0.148	1.1 (1.0-1.4)	0.016
LDL, mmol/L	3.0 (2.1-3.7)	3.6 (2.0-4.0)	0.709	3.0 (2.3-3.7)	0.703
Ukupni Ca, mmol/L	2.4 (2.3-2.5)	2.3 (2.3-2.4)	0.231	2.4 (2.3-2.4)	0.216
AST, U/L	24.0 (21.0-33.0)	27.0 (20.0-37.0)	0.497	28.0 (24.0-35.0)	0.067
ALT, U/L	21.0 (16.0-29.0)	23.0 (19.0-39.0)	0.035	25.0 (19.0-32.0)	0.026
LDH, U/L	203.0 (181.0-237.0)	169.5 (150.0-205.8)	0.002	191.0 (159.0-260.0)	0.361
CK, U/L	97.0 (65.5-148.0)	80.5 (65.0-98.0)	0.227	90.0 (53.0-122.0)	0.295
GGT, U/L	30.5 (19.0-60.3)	42.0 (31.0-55.0)	0.032	42.0 (26.0-56.0)	0.025
ALP, U/L	73.7±21.0	63.9±27.3	0.156	66.2±29.5	0.216
Amilaza, U/L	55.0 (41.0-69.5)	41.0 (40.0-88.0)	0.057	43.0 (41.5-56.5)	0.125
CRP, mg/L	2.9 (1.4-7.0)	3.2 (1.7-7.5)	0.268	3.2 (1.2-6.4)	0.488
Troponin, µg/l	0.01 (0.01-0.03)	0.01 (0.01-0.02)	0.319	0.02 (0.01-0.06)	0.068
NT-proBNP, pg/ml	1207.0 (411.0-3783.0)	212.0 (125.0-321.0)	< 0.001	321.5 (138.0-674.3)	0.004
Leukociti x10 ⁹ /L	6.8 (5.7-9.0)	8.1 (6.4-9.1)	0.147	7.5 (6.3-8.8)	0.139
Eritrociti x10 ¹² /L	4.6±0.5	4.6±0.6	0.955	4.5±0.4	0.549
Haemoglobin, g/L	136.5±17.2	140.9±15.1	0.221	137.5 (131.3-144.5)	0.497
Trombociti, x10 ⁹ /L	210.5 (176.0-272.5)	260.0 (198.5-288.5)	0.014	266.5 (191.0-299.0)	0.008
Fibrinogen, g/L	3.8 (3.4-4.5)	3.2 (3.0-4.0)	0.007	3.9 (3.1-4.1)	0.817

Tablica 16. Nastavak

	Teški CAVS N = 75	Blagi CAVS N = 25	P ^a vrijednost	Umjereni CAVS N= 34	P ^b vrijednosti
Podaci o tlaku					
Sistolički krvni tlak, mmHg	130.0 (120.0-140.0)	140.0 (130.0-150.0)	0.047	140.0 (130.0-145.0)	0.146
Dijastolički krvni tlak, mmHg	75.0 (70.0-80.0)	85.0 (80.0-90.0)	0.002	80.0 (80.0-90.0)	0.001
Tlak pulsa, mmHg	55.0 (50.0-65.0)	55.0 (50.0-60.0)	0.576	55.0 (48.8-65.0)	0.562
Srednji arterijski tlak, mmHg	94.6±10.9	100.0 (96.7-108.3)	0.006	100.0 (96.7-103.8)	0.004
UZV srca					
LVIDd, mm	51.1±6.9	48.6±4.8	0.024	50.5±5.7	0.654
LVIDs, mm	32.0 (28.0-35.8)	33.0 (30.5-36.0)	0.482	33.0 (30.0-36.3)	0.875
IVSd, mm	15.0 (14.0-16.0)	14.0 (12.5-15.5)	< 0.001	14.0 (13.0-15.3)	0.012
LVPW, mm	15.0 (13.0-16.0)	13.0 (12.0-14.0)	< 0.001	14.0 (13.0-15.0)	0.011
Anulus aorte	24.0 (22.5-25.5)	24.0 (22.0-25.5)	0.136	25.0 (23.0-28.0)	0.274
LAVI, ml/m ²	39.0 (31.0-49.0)	30.0 (25.0-38.5)	0.006	31.0 (26.8-44.3)	0.012
LVEDV, ml	115.0 (91.0-148.8)	116.0 (93.0-134.0)	0.438	120.0 (104.5-133.0)	0.978
LVESV, ml	45.0 (37.3-62.5)	43.0 (38.5-56.5)	0.698	47.0 (37.8-57.3)	0.768
LVEF, %	58.0 (45.0-65.0)	62.0 (54.5-65.0)	0.800	61.0 (57.0-66.3)	0.389
Masa LV, g	346.6±84.4	271.0±66.4	< 0.001	314.7±86.7	0.079
Indeksirana masa LV, g/m ²	185.1±41.9	135.3 (116.8-158.8)	< 0.001	156.1 (136.0-187.1)	0.009
Vmax, m/s	4.6±0.6	2.8±0.3	< 0.001	3.4±0.4	< 0.001
PGmax, mmHg	85.1 (71.4-100.5)	30.2 (25.4-32.8)	< 0.001	44.8 (40.6-49.6)	< 0.001
PGmean, mmHg	51.7±14.8	17.3±3.1	< 0.001	26.8±8.7	< 0.001
Time Velocity Integral, cm	113.5±20.2	62.8 (55.6-69.7)	< 0.001	75.5 (69.8-82.1)	< 0.001
AVA, cm ²	0.8±0.2	1.7±0.2	< 0.001	1.3 (1.2-1.4)	< 0.001
AVAI, cm/m ²	0.40 (0.36-0.48)	0.9 (0.8-0.9)	< 0.001	0.7 (0.6-0.7)	< 0.001
LVOT Vmax, m/s	0.99±0.2	0.9±0.1	0.914	1.1±0.3	0.153
LVOT PGmax, mmHg	3.8±1.3	4.0 (3.3-4.7)	0.558	4.2 (3.2-6.1)	0.099
LVOT PGmean, mmHg	2.0 (1.5-2.5)	2.0 (1.8-2.8)	0.348	2.4 (1.7-3.3)	0.024
LVOT dijametar, mm	21.0 (19.0-22.0)	22.0 (21.0-24.0)	< 0.001	21.0 (19.0-23.3)	0.092
CT nalazi					
CT Ca score, AU	---	---	---	---	---

Ovisno o tome radi li se o kategoričkim ili kontinuiranim varijablama te o njihovoj raspodjeli (Gaussova distribucija ili distribucija koja odstupa od normale), podaci su prikazani kao frekvencija (n) i postotak (%), medijan i interkvartilni raspon (IQR, engl. interquartile range) ili kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija, engl. standard deviation). Testovi: χ^2 /Fisher za kategoričke; t-test/Mann-Whitney za kontinuirane. Statistički značajnom smatrana je vrijednost $P < 0.050.2$ korigirane prema Bonferroni korekciji za višestruke usporedbe ($P_c = 0.000625$). Kratice: AU – proizvoljne jedinice (engl. arbitrary units), BMI – indeks tjelesne mase (engl. body mass index), BSA – površina tijela (engl. body surface area), CAD – koronarna ateroskleroza (engl. coronary artery disease), PAD – periferna arterijska bolest (engl. peripheral artery disease), AF – fibrilacija atrijska (engl. atrial fibrillation), NOAC – antikoagulansi koji nisu antagonisti vitamina K (engl. non-vitamin K antagonist oral anticoagulants), GUK – glukoza u krvi (engl. blood glucose), IQR – interkvartilni raspon (engl. interquartile range), eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. estimated glomerular filtration rate), SD – standardna devijacija (engl. standard deviation), HDL – lipoproteini visoke gustoće (engl. high density lipoproteins), LDL – lipoproteini niske gustoće (engl. low density lipoproteins), CT – kompjutorizirana tomografija (engl. computed tomography), AST – aspartat-aminotransferaza (engl. aspartate aminotransferase), ALT – alanin-aminotransferaza (engl. alanine aminotransferase), ALP – alkalna fosfataza (engl. alkaline phosphatase), CRP – C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein), GGT – gama-glutamil transferaza (engl. gamma-glutamyl transferase), CK – kreatin kinaza (engl. creatine kinase), LDH – laktat dehidrogenaza (engl. lactate dehydrogenase), NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (engl. N-terminal pro-hormone of brain natriuretic peptide), LVIDd – unutarnji promjer lijevog ventrikula u dijastoli (engl. left ventricle internal dimension at diastole), LVIDs – unutarnji promjer lijevog ventrikula u sistoli (engl. left ventricle internal dimension at systole), IVSd – debljina interventrikularnog septuma u dijastoli (engl. interventricular septum thickness in diastole), LVPW – debljina stražnje stijenke lijevog ventrikula u dijastoli (engl. left ventricular posterior wall thickness in diastole), LVEDV – teledijastolički volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end diastolic volume), LVESV – telesistoliki volumen lijevog ventrikula (engl. left ventricular end systolic volume), LVEF – ejskijska frakcija lijevog ventrikula (engl. left ventricular ejection fraction), RWT – relativna debljina stijenke lijevog ventrikula (engl. relative wall thickness), Vmax – maksimalna brzina protoka preko aortalnog zaliska (engl. peak velocity), PGmax – maksimalni gradijent tlaka (engl. maximum pressure gradient), PGmean – srednji gradijent tlaka (engl. mean pressure gradient), AVA – površina aortalnog zaliska (engl. aortic valve area), AVAI – indeksirana površina aortalnog zaliska (engl. indexed aortic valve area), LVOT – izlazni trakt lijevog ventrikula (engl. left ventricular outflow tract), LVOT Vmax – maksimalna brzina protoka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum velocity), LVOT PGmax – maksimalni gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT maximum pressure gradient), LVOT PGmean – srednji gradijent tlaka u izlaznom traktu lijevog ventrikula (engl. LVOT mean pressure gradient), UZV – ultrazvuk srca (engl. echocardiography). Nakon Bonferroni korekcije, značajne spolne razlike zadržane su za BSA, GGT, Hb, LV dimenzije/volumene/masu, LVOT promjer (izraženije remodeliranje) i CT Ca score. Ostale varijable nisu dosegle korekcijski prag. P^a - usporedba ispitanika s teškim i blagim stadijem CAVS-a; P^b -- usporedba ispitanika s teškim i umjerenim stadijem CAVS-a

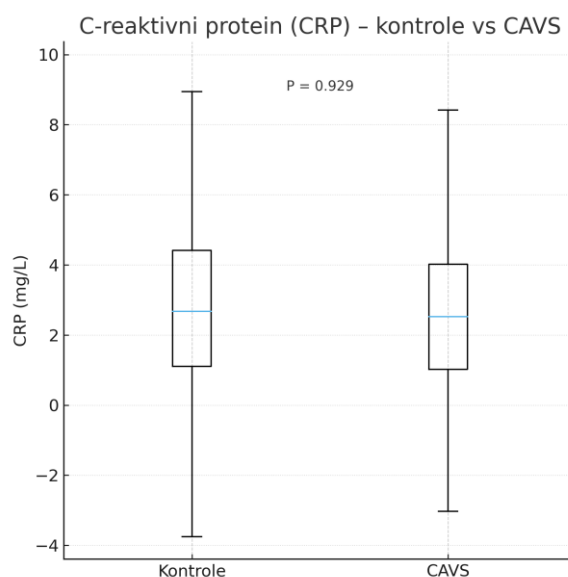
5.2. Razina CRP, troponina i NT-proBNP proteina u plazmi (ELISA) CAVS bolesnika i zdravih, kontrolnih ispitanika

Usporedbom koncentracija biomarkera određenih ELISA metodom između kontrolne i CAVS skupine nije pronađena statistički značajna razlika u razinama upalnog (CRP) i nekrotičnog (troponin) markera. Srednje vrijednosti C-reaktivnog proteina (CRP) bile su gotovo identične između skupina (medijan 2,6 mg/L; interkvartilni raspon [IQR] 1,1–4,2 u kontrolama prema 2,6 mg/L; IQR 1,3–4,2 u bolesnika s CAVS; $P = 0,929$) (Slika 29).

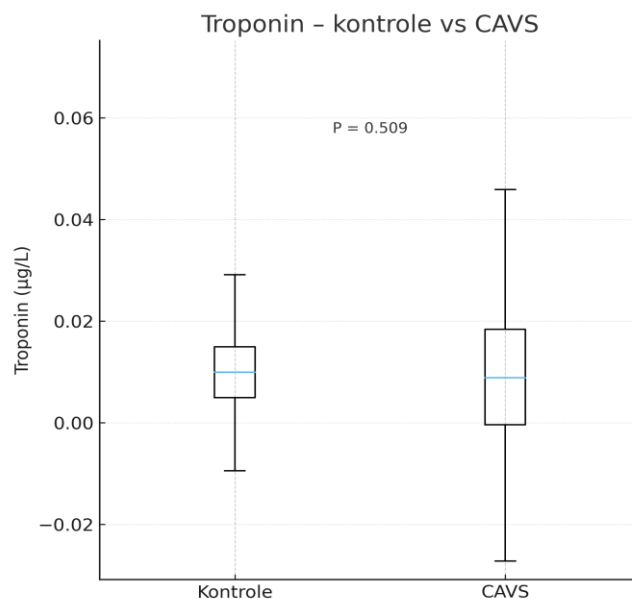
Slično tome, koncentracija troponina bila je niska i nije pokazivala značajnu razliku (medijan 0,01 $\mu\text{g/L}$; IQR 0,01–0,02 u kontrolnoj prema 0,01 $\mu\text{g/L}$; IQR 0,01–0,03 u CAVS skupini; $P = 0,509$) (Slika 30).

Nasuprot tome, vrijednosti NT-proBNP-a, markera hemodinamskog opterećenja i srčanog stresa, bile su višestruko više u bolesnika s CAVS-om (medijan 641,7 pg/mL; IQR 309,2–1705,0) nego u kontrolnoj skupini (98,1 pg/mL; IQR 76,9–119,2; $P < 0,001$) (Slika 31).

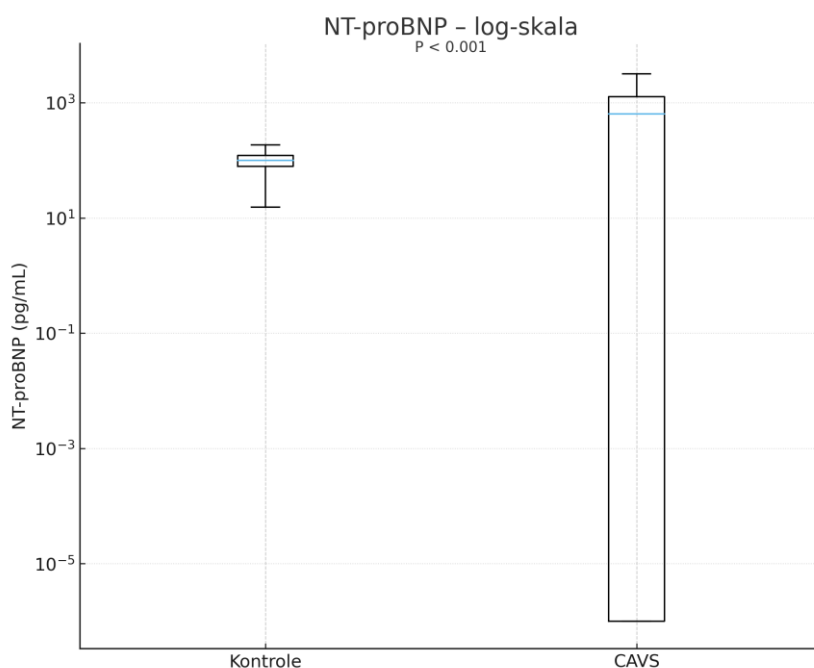
Dobiveni nalazi ukazuju da, iako sistemska upala (CRP) i subkliničko oštećenje miokarda (troponin) nisu bili značajno izraženi, NT-proBNP jasno odražava prisutno hemodinamsko opterećenje i dijastoličku disfunkciju karakterističnu za napredovalu kalcificiranu aortalnu stenozu.



Slika 29. Koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) u kontrolnoj i CAVS skupini. Box-plot prikaz koncentracija CRP-a u plazmi. Vrijednosti između skupina nisu pokazale statistički značajnu razliku ($P = 0,929$). Kratice: CRP – C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein);; CAVS – kalcificirana aortalna stenozu (engl. calcific aortic valve stenosis).



Slika 30. Koncentracija troponina u kontrolnoj i CAVS skupini. Box-plot prikaz vrijednosti troponina u plazmi. Iako su vrijednosti troponina bile nešto više u CAVS skupini, razlika nije bila statistički značajna ($P = 0.509$). Kratice: CAVS – kalcificirana aortalna stenozza (engl. calcific aortic valve stenosis); µg/L – mikrogram po litri.



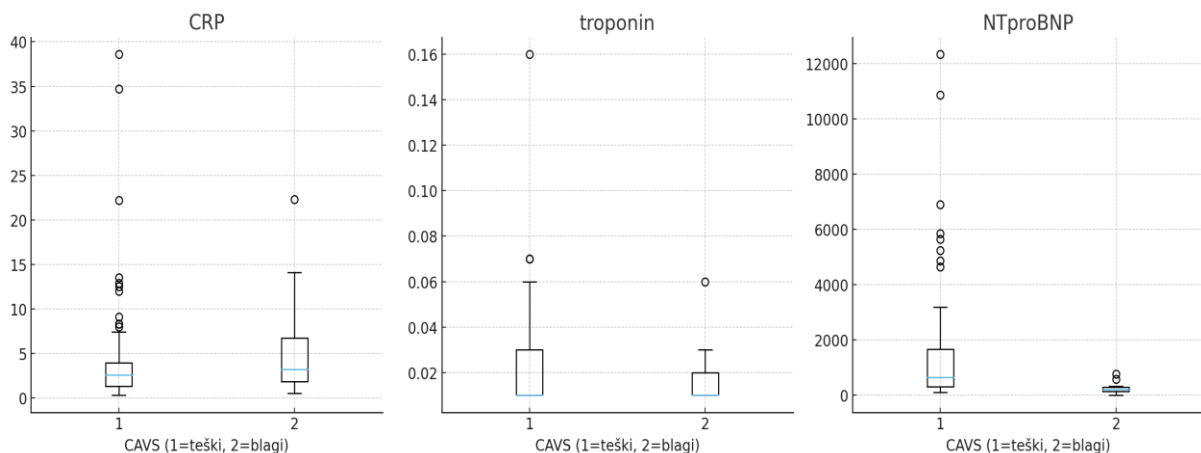
Slika 31. Koncentracije NT-proBNP u kontrolnoj i CAVS skupini (logaritamska skala). Box-plot prikaz NT-proBNP vrijednosti u plazmi (log-skala). CAVS bolesnici pokazuju višestruko više vrijednosti NT-proBNP (medijan 641,7 pg/mL) u odnosu na kontrole (98,1 pg/mL), što ukazuje na hemodinamsko opterećenje i dijastoličku disfunkciju lijeve klijetke ($P < 0,001$). Kratice: NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (engl. N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide); CAVS – kalcificirana aortalna stenozza; pg/mL – pikogram po mililitru; log-skala – logaritamska skala prikaza.

Usporedba laboratorijskih biomarkera između bolesnika s teškim i blagim stupnjem kalcificirajuće aortalne stenozе pokazala je različite obrasce raspodjele među analiziranim parametrima (Slika 32).

Koncentracije CRP-a bile su vrlo varijabilne u obje skupine, s brojnim outlierima, ali bez jasnog razdvajanja medijanskih vrijednosti, što sugerira da sistemska upala nije dominantno obilježje razlikovanja ranog i uznapredovalog CAVS-a. Za razliku od CRP-a, vrijednosti troponina bile su više kod bolesnika s teškim CAVS-om, uz prisutnost nekoliko izraženih povišenih vrijednosti, što je u skladu s većim opterećenjem miokarda i subkliničkim oštećenjem kardiomiocita.

Najizraženije razlike uočene su kod NT-proBNP-a. Skupina s teškim CAVS-om imala je znatno više koncentracije, kao i širu distribuciju vrijednosti, uključujući više ekstremnih outliera u usporedbi s blagim stadijem bolesti.

Ovaj nalaz odražava povećani intrakardijalni tlak, progresivno hemodinamsko opterećenje i izraženije remodeliranje lijeve klijetke karakteristično za uznapredovali oblik stenozе.

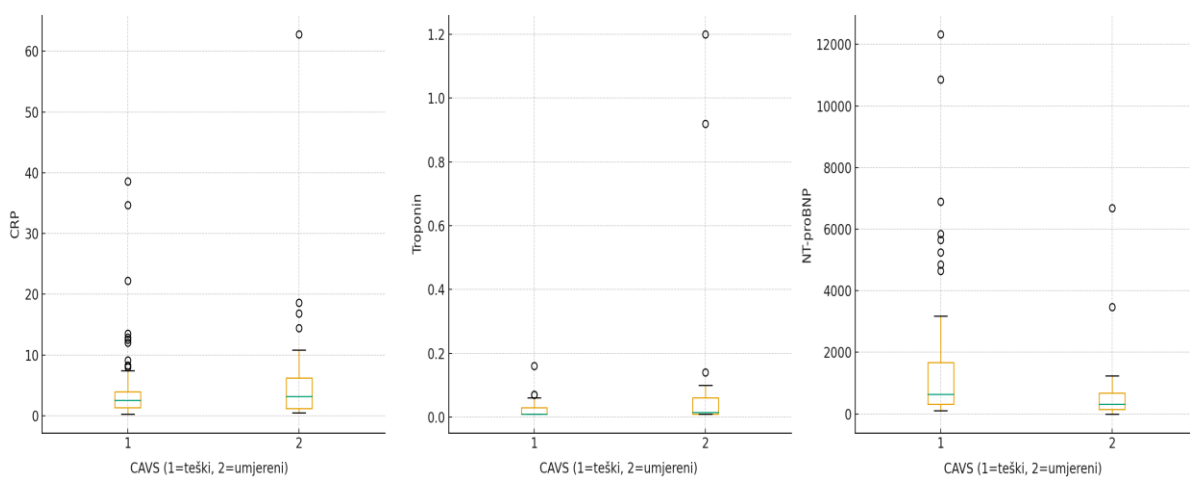


Slika 32. Box-plot prikaz koncentracija CRP-a (A), troponina (B) i NT-proBNP-a (C) u bolesnika s teškim (CAVS = 1) i blagim (CAVS = 2) stupnjem kalcificirajuće aortalne stenozе. Središnja linija u box-plotovima predstavlja medijan, okviri označavaju interkvartilni raspon (IQR), a „brkovi“ minimalne i maksimalne vrijednosti unutar 1,5 IQR-a. Pojedinačne točke označavaju outliere. Uočen je širi raspon vrijednosti CRP-a u obje skupine bez jasne razlike u medijanima, dok su vrijednosti troponina i osobito NT-proBNP-a bile više u skupini bolesnika s teškim CAVS-om, što odražava veći stupanj hemodinamskog opterećenja u uznapredovalom stadiju bolesti.

Analiza je također pokazala različite obrasce raspodjele CRP-a, troponina i NT-proBNP-a među bolesnicima s teškim i umjerenim stupnjem kalcificirajuće aortalne stenozе (Slika 33). Vrijednosti CRP-a pokazivale su široku varijabilnost u obje skupine, s više izraženih outliera u teškom CAVS-u, ali bez jasnog razdvajanja medijanskih vrijednosti.

Za razliku od CRP-a, koncentracije troponina bile su više u bolesnika s teškim CAVS-om, pri čemu su pojedini ispitanici imali izraženije povišene vrijednosti, što je vidljivo iz većeg broja outliera u ovoj skupini.

Najizrazitije razlike zabilježene su za NT-proBNP: bolesnici s teškim CAVS-om imali su znatno više koncentracije ovog biomarkera u odnosu na umjereni stadij bolesti, uz širu raspodjelu i veći broj ekstremnih vrijednosti, što odražava povećano hemodinamsko opterećenje i naprednije remodeliranje lijeve klijetke u teškom obliku bolesti.



Slika 33. Box-plot prikaz koncentracija CRP-a (A), troponina (B) i NT-proBNP-a (C) u bolesnika s teškim (CAVS = 1) i umjerenim stupnjem kalcificirajuće aortalne stenozе (CAVS = 2). Središnja linija unutar box-plotova označuje medijan, okviri interkvartilni raspon (IQR), a brkovi minimalne i maksimalne vrijednosti unutar 1,5 IQR-a. Pojedinačne točke predstavljaju outliere. Vidljivo je da su troponin i NT-proBNP povišeni u teškom CAVS-u u odnosu na umjereni, dok razine CRP-a pokazuju širu raspodjelu bez jasne razlike među skupinama.

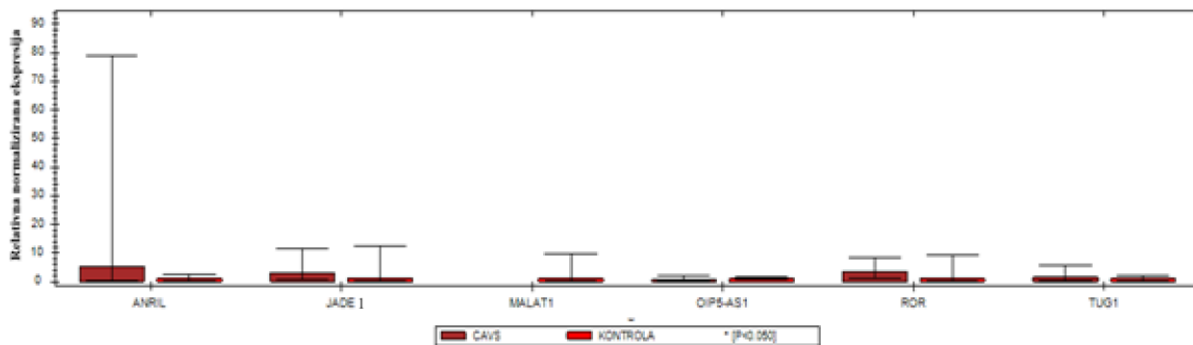
5.3. Ekspresija ciljanih lncRNA molekula u tkivu aortalnih zalistaka CAVS bolesnika i kontrolnih uzoraka tkiva

Analiza ekspresije ukupno dvadeset odabranih lncRNA transkripata u tkivu bolesnika s kalcificiranom aortalnom stenozom (CAVS) u usporedbi s morfološki urednim kontrolnim aortalnim zaliscima pokazala je različite obrasce transkripcijske aktivnosti između pojedinih skupina gena.

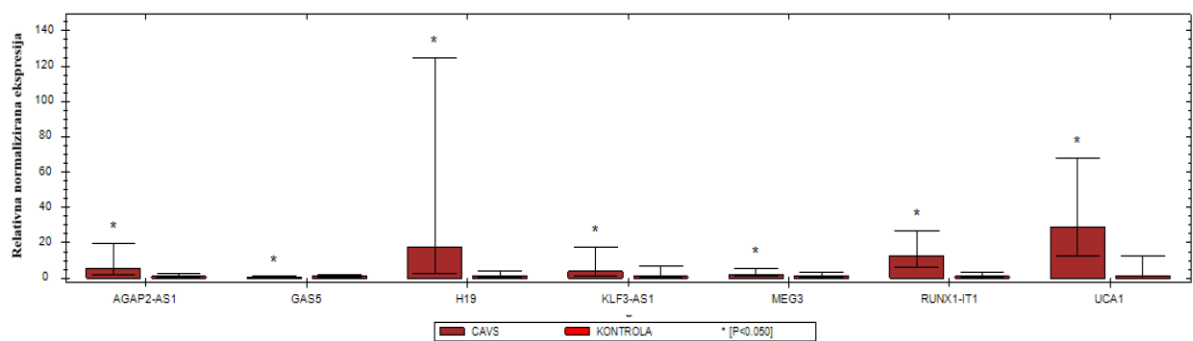
U prvoj skupini (ANRIL, JADE, MALAT1, OIP5-AS1, ROR i TUG1) nisu zabilježene statistički značajne razlike, no uočeni su trendovi povišene ekspresije za ANRIL (5.18; 95 % CI 0.34–78.79; $p = 0.205$), JADE (3.21; 95 % CI 0.89–11.61; $p = 0.136$), ROR (3.24; 95 % CI 1.23–8.52; $p = 0.072$) i TUG1 (1.50; 95 % CI 0.39–5.77; $p = 0.222$), dok je OIP5-AS1 pokazala tendenciju snižene ekspresije (0.61; 95 % CI 0.19–1.96; $p = 0.066$). Nasuprot tome ekspresija MALAT1 zabilježena je samo u kontrolnim uzorcima tkiva. Ovi rezultati ukazuju na moguću aktivaciju proliferativno-epigenetskih regulatornih osi (ANRIL–JADE–ROR–TUG1) u procesu valvularne fibroze i kalcifikacije (Slika 34).

U drugoj skupini (AGAP2-AS1, GAS5, H19, KLF3-AS1, MEG3, RUNX1-IT1, UCA1) utvrđene su značajne razlike između skupina. UCA1 (29.03; 95 % CI 12.42–67.85; $p < 0.001$), H19 (17.28; 95 % CI 2.40–124.39; $p < 0.001$), RUNX1-IT1 (12.61; 95 % CI 5.94–26.76; $p < 0.001$) i AGAP2-AS1 (5.63; 95 % CI 1.64–19.29; $p < 0.001$) pokazale su značajno povišenu ekspresiju u CAVS tkivu, dok je GAS5 bila značajno snižena (0.38; 95 % CI 0.13–1.12; $p = 0.001$). KLF3-AS1 (3.86; 95 % CI 0.86–17.39; $p = 0.041$) i MEG3 (2.23; 95 % CI 0.97–5.13; $p = 0.018$) također su pokazale umjereno povećanje ekspresije. Ovaj profil sugerira da je CAVS tkivo obilježeno deregulacijom lncRNA povezanih s proliferacijom, diferencijacijom i antiapoptotskim procesima, pri čemu povišeni transkripti H19, UCA1, RUNX1-IT1 i AGAP2-AS1, zajedno sa sniženim GAS5, ukazuju na postojanje aktivne lncRNA mreže povezane s valvularnim remodeliranjem (Slika 33).

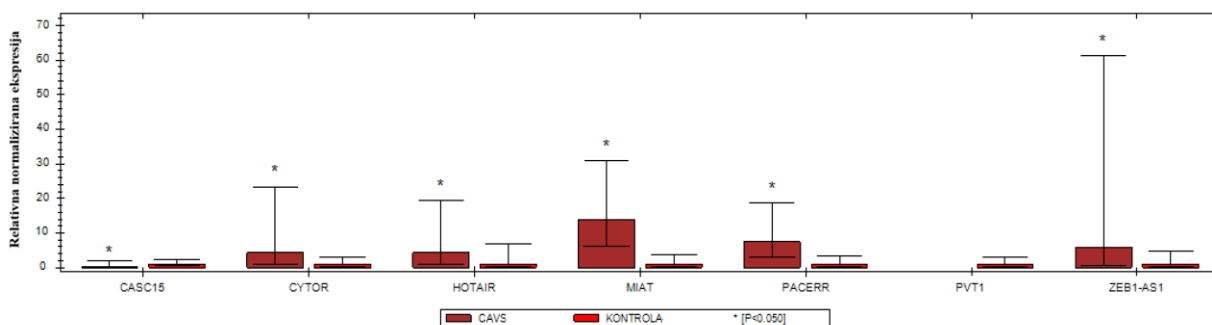
Treća skupina (CASC15, CYTOR, HOTAIR, MIAT, PACERR, PVT1, ZEB1-AS1) također je pokazala izražene razlike u ekspresiji. Najvišu razinu zabilježila je MIAT (13.93; 95 % CI 6.30–30.80; $p < 0.001$), zatim PACERR (7.41; 95 % CI 2.96–18.58; $p < 0.001$), CYTOR (4.26; 95 % CI 0.77–23.42; $p = 0.002$) i HOTAIR (4.27; 95 % CI 0.93–19.55; $p = 0.038$), dok je ZEB1-AS1 također bila povišena (5.84; 95 % CI 0.56–61.16; $p = 0.031$). Nasuprot tome, CASC15 je pokazala sniženu ekspresiju (0.15; 95 % CI 0.01–1.83; $p = 0.012$), dok je ekspresija PVT1 zabilježena samo u kontrolnim uzorcima tkiva (Slika 35).



Slika 34. Relativna ekspresija lncRNA ANRIL (CDKN2B-AS1), JADE1, MALAT1, OIP5-AS1 i ROR u aortnom tkivu bolesnika s kalcificiranom aortalnom stenozom (CAVS) u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Ekspresija je kvantificirana metodom qRT-PCR i normalizirana na referentni gen GAPDH, a rezultati su izraženi kao relativna normalizirana ekspresija. Vrijednosti su prikazane kao srednja relativna ekspresija \pm 1 SD, uz GAPDH kao referentni gen. Tamnocrveno su označeni rezultati za CAVS, a svjetlocrveno za kontrolnu skupinu. Statistička analiza provedena je Mann–Whitney U testom.

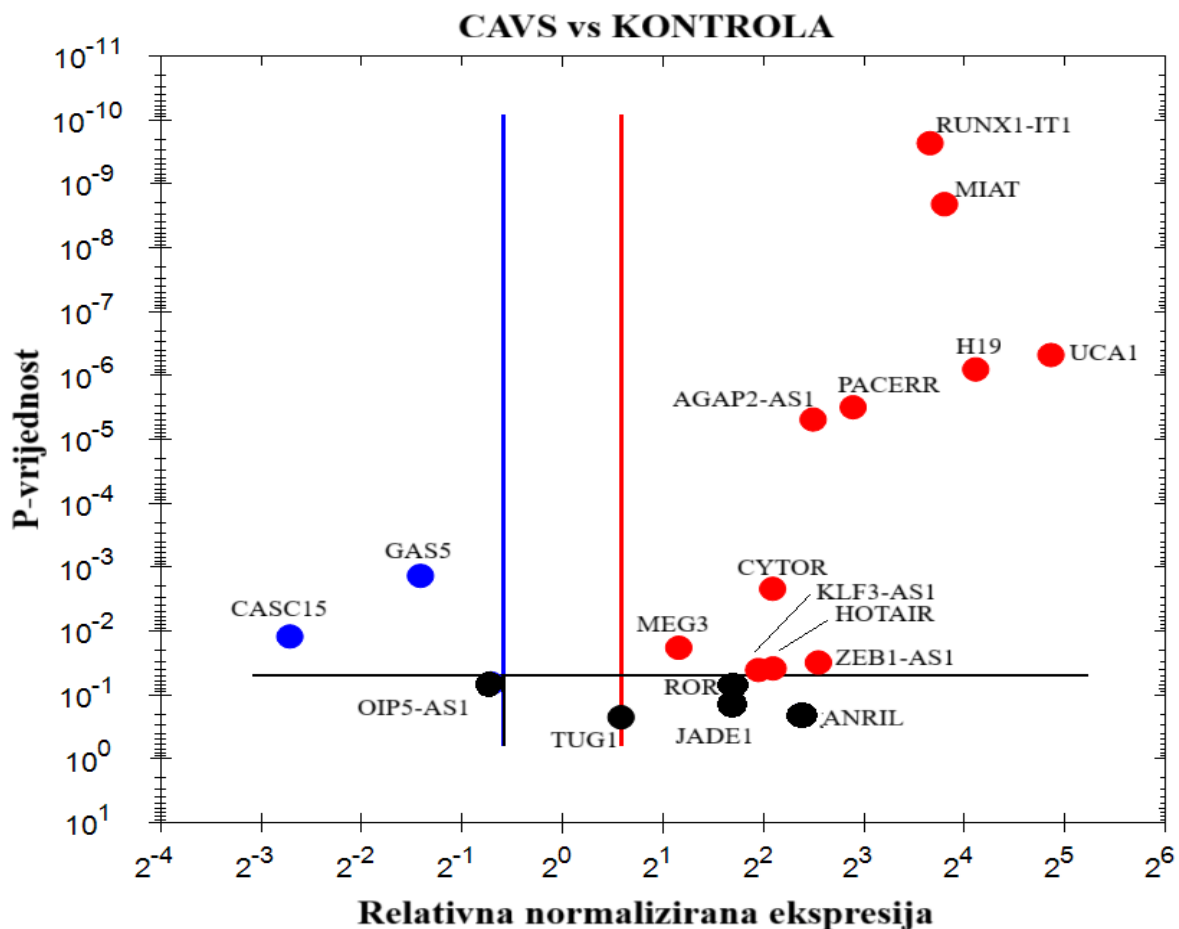


Slika 33. Relativnu normaliziranu ekspresiju lncRNA AGAP2-AS1, GAS5, H19, KLF3-AS1, MEG3, RUNX1-IT1 i UCA1 u uzorcima tkiva bolesnika s kalcificiranom aortalnom stenozom (CAVS; tamnocrveno) i u kontrolnim uzorcima morfološki urednih aortalnih zalistaka (KONTROLA; svjetlocrveno). Vrijednosti su izražene kao srednja relativna ekspresija \pm 1 SD, uz GAPDH kao referentni gen. Statistička analiza provedena je Mann–Whitney U testom. Značajne razlike ($p < 0.05$) označene su zvjezdicom (*).



Slika 35. Relativnu normaliziranu ekspresiju lncRNA CASC15, CYTOR, HOTAIR, MIAT, PACERR, PVT1 i ZEB1-AS1 u uzorcima tkiva bolesnika s kalcificiranom aortalnom stenozom (CAVS; tamnocrveno) i u kontrolnim uzorcima morfološki urednih aortalnih zalistaka (KONTROLA; svjetlocrveno). Vrijednosti su izražene kao srednja relativna ekspresija \pm 1 SD, uz GAPDH kao referentni gen. Statistička analiza provedena je Mann–Whitney U testom. Značajne razlike ($p < 0.05$) označene su zvjezdicom (*).

Kumulativno (Slika 36), svi rezultati ukazuju da je tkivo kalcificiranog aortnog zaliska obilježeno širokom deregulacijom lncRNA transkripata koji sudjeluju u epigenetskoj regulaciji, proliferaciji, oksidativnom stresu, transdiferencijaciji i apoptotskoj kontroli. Povećana ekspresija H19, UCA1, RUNX1-IT1, MIAT, PACERR i HOTAIR, uz smanjenu razinu GAS5 i CASC15, sugerira da u fibro-kalcificiranom mikrookruženju postoji koordinirana aktivacija lncRNA mreže koja potiče proliferativne i pro-upalne procese u valvularnim intersticijskim stanicama, pridonoseći remodeliranju i progresiji degenerativne bolesti aortnog zaliska.



Slika 36. Volcano dijagram diferencijalne ekspresije lncRNA transkripata između tkiva bolesnika s kalcificiranom aortnom stenozom (CAVS) i kontrolnih aortnih zalistaka. Prikazan je odnos između logaritamski prikazane relativne normalizirane ekspresije (x-osa, log₂) i razine statističke značajnosti izražene kao p-vrijednost (y-osa, log₁₀) za sve analizirane lncRNA transkripte u CAVS-tkivu u odnosu na kontrolne uzorke. Crvene točke označavaju povišene (“up-regulated”) transkripte, a plave snižene (“down-regulated”) transkripte u CAVS-tkivu. Crna horizontalna linija označava prag statističke značajnosti (p = 0.05), dok crvena i plava vertikalna linija označavaju granične vrijednosti promjene ekspresije (povećanje ili smanjenje, tj. fold change ±1,5). Značajno povišeni transkripti uključuju UCA1, RUNX1-IT1, MIAT, H19, PACERR, AGAP2-AS1, CYTOR, ZEB1-AS1, HOTAIR, KLF3-AS1 i MEG3, dok su CASC15 i GAS5 značajno sniženi u CAVS-tkivu. Crne točke predstavljaju nesignifikantnu promjenu ekspresije. Grafikon vizualno prikazuje globalni obrazac transkripcijske deregulacije, s prevladavajućim trendom povišene ekspresije lncRNA povezanih s proliferacijom, epigenetskom regulacijom i upalnim signalnim putovima u fibro-kalcificiranom tkivu aortnog zaliska.

5.4. Ekspresija ciljanih lncRNA molekula u perifernoj plazmi CAVS bolesnika i kontrolnih, zdravih ispitanika

Analiza ekspresije odabranih lncRNA transkripata u plazmi bolesnika s kalcificiranom aortnom stenozom (CAVS) u usporedbi s kontrolnim ispitanicima pokazala je da većina analiziranih transkripata nije pokazala statistički značajne razlike u ekspresiji između skupina. Vrijednosti relativne ekspresije bile su niske i homogenog raspona za obje skupine (Slika 37).

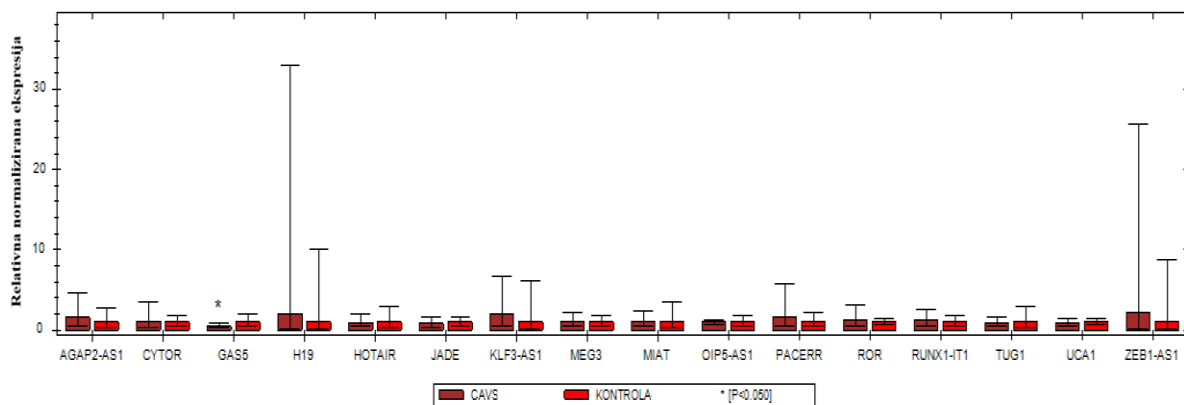
Jedini transkript s potvrđenom statistički značajnom razlikom bio je lncRNA GAS5, koja je pokazala sniženu ekspresiju u CAVS-plazmi (0.50; 95 % CI 0.27–0.92; $p = 0.0015$) u odnosu na kontrolne uzorke.

Ostale analizirane lncRNA nisu pokazale značajne promjene:

- AGAP2-AS1 (1.56; 95 % CI 0.52–4.66; $p = 0.145$),
- CYTOR (1.15; 95 % CI 0.37–3.56; $p = 0.641$),
- H19 (2.09; 95 % CI 0.13–32.91; $p = 0.319$),
- HOTAIR (0.95; 95 % CI 0.45–2.03; $p = 0.892$),
- JADE (0.79; 95 % CI 0.37–1.71; $p = 0.301$),
- KLF3-AS1 (1.94; 95 % CI 0.57–6.63; $p = 0.319$),
- MEG3 (1.10; 95 % CI 0.55–2.20; $p = 0.638$),
- MIAT (1.05; 95 % CI 0.45–2.46; $p = 0.895$),
- OIP5-AS1 (0.99; 95 % CI 0.74–1.32; $p = 0.934$),
- PACERR (1.55; 95 % CI 0.41–5.83; $p = 0.240$),
- ROR (1.26; 95 % CI 0.52–3.06; $p = 0.306$),
- RUNX1-IT1 (1.18; 95 % CI 0.56–2.49; $p = 0.438$),
- TUG1 (0.96; 95 % CI 0.59–1.57; $p = 0.884$),
- UCA1 (0.86; 95 % CI 0.53–1.39; $p = 0.247$) te
- ZEB1-AS1 (2.18; 95 % CI 0.19–25.63; $p = 0.356$).

Važno je istaknuti da u plazma uzorcima, neovisno o skupini, nije zabilježena ekspresija transkripata MALAT1, ANRIL, PVT1 i CASC15, što upućuje na njihovu tkivnu specifičnost i nedostatak cirkulirajućih kopija u perifernoj krvi.

Sveukupno, ovi rezultati pokazuju da plazmatski profil lncRNA u bolesnika s CAVS ne pokazuje izražene razlike u odnosu na kontrolne ispitanike, uz iznimku snižene ekspresije GAS5 (0.50; 95 % CI 0.27–0.92), koja može odražavati gubitak njezine poznate antiproliferativne i proapoptotske uloge u sistemskoj regulaciji valvularne kalcifikacije.



Slika 37. Relativna ekspresija odabranih lncRNA u plazmi bolesnika s kalcificiranom aortnom stenozom (CAVS) i kontrolnim uzorcima (KONTROLA). Graf prikazuje relativnu normaliziranu ekspresiju odabranih lncRNA transkripata (AGAP2-AS1, CYTOR, GAS5, H19, HOTAIR, JADE, KLF3-AS1, MEG3, MIAT, OIP5-AS1, PACERR, ROR, RUNX1-IT1, TUG1, UCA1 i ZEB1-AS1) u plazmi bolesnika s kalcificiranom aortnom stenozom (CAVS-KRV; tamnocrveno) i u kontrolnim uzorcima (DKK-KRV; svjetlocrveno). Vrijednosti su prikazane kao srednja relativna ekspresija \pm 1 SD, uz GAPDH kao referentni gen. Statistička analiza provedena je Mann–Whitney U testom, a značajne razlike označene su zvjezdicom (* $p < 0.05$). U usporedbi s kontrolnom skupinom, lncRNA GAS5 pokazala je značajno sniženu ekspresiju u CAVS-plazmi (0.50; 95 % CI 0.27–0.92; $p = 0.0015$), dok za ostale analizirane transkripte nije zabilježena statistički značajna razlika. Većina lncRNA, uključujući H19, PACERR, MIAT, UCA1 i ZEB1-AS1, pokazala je samo blagi trend povišenja bez značajne promjene. Ovi nalazi ukazuju da se sistemski profil cirkulirajućih lncRNA u plazmi bolesnika s kalcificiranom aortnom stenozom ne razlikuje bitno od kontrolne populacije, uz iznimku snižene ekspresije GAS5, koja može odražavati gubitak njezine poznate antiproliferativne i proapoptotske uloge u cirkulirajućim imunostanicama i vaskularnim komponentama u sklopu CAVS patogeneze.

5.5. Analiza povezanosti tkivne ekspresije ciljanih lncRNA s prisutnošću CAVS-a

U univarijantnoj logističkoj regresijskoj analizi ispitana je povezanost ekspresije pojedinih lncRNA s pojavom kalcificirane aortne valvularne stenoze (CAVS). Statistički značajna povezanost s prisutnošću bolesti zabilježena je za AGAP2-AS1 (OR = 2.79×10^{12} ; 95 % CI: 2.60×10^3 – 2.99×10^{24} ; P = 0.007), CYTOR (OR = 5.42×10^5 ; 95 % CI: 1.02 – 2.88×10^{11} ; P = 0.050), H19 (OR = 67.952; 95 % CI: 1.257–3672.264; P = 0.038), MIAT (OR = 4.08×10^{96} ; 95 % CI: 3.52×10^{26} – 4.74×10^{166} ; P = 0.007), PACERR (OR = 1.10×10^{15} ; 95 % CI: 4.621 – 2.61×10^{29} ; P = 0.040), RUNX1-IT1 (OR = 1.18×10^{15} ; 95 % CI: 1.10×10^5 – 1.26×10^{25} ; P = 0.003) i UCA1 (OR = 126.933; 95 % CI: 4.563–3531.325; P = 0.004), dok je GAS5 pokazala značajan protektivni učinak (OR = 7.95×10^{-8} ; 95 % CI: 2.23×10^{-14} –0.283; P = 0.034).

U multivarijantnim modelima, koji su uz svaku pojedinu lncRNA uključivali kovarijate dob, spol i BMI, dob se dosljedno pokazala značajnim neovisnim prediktorom prisutnosti CAVS-a (OR 1.24–1.32; 95 % CI: približno 1.05–1.64; P < 0.05). Značajnu neovisnu povezanost s pojavom CAVS-a zadržale su MIAT (B = 310.045; OR = 4.47×10^{134} ; 95 % CI: 2.66×10^5 – 7.51×10^{263} ; P = 0.041), RUNX1-IT1 (B = 35.769; OR = 3.42×10^{15} ; 95 % CI: 58.897 – 1.99×10^{29} ; P = 0.027) i UCA1 (B = 6.213; OR = 499.029; 95 % CI: 5.200–47,886.364; P = 0.008), dok je GAS5 zadržala protektivni učinak (B = –31.517; OR = 0.000; 95 % CI: 0.000–0.038; P = 0.029). Ostale lncRNA — AGAP2-AS1 (95 % CI: 0.006– 9.86×10^{18} ; P = 0.121), CYTOR (95 % CI: 0.429– 1.14×10^{15} ; P = 0.062), H19 (95 % CI: 0.334–8689.983; P = 0.124) i PACERR (95 % CI: 0.003– 1.37×10^{18} ; P = 0.136) pokazale su pozitivan, ali statistički nesignifikantan trend povezanosti.

Provedena bootstrap validacija s 1000 ponavljanja potvrdila je stabilnost većine modela. Statistička značajnost i uski intervali pouzdanosti zadržani su za MIAT (P = 0.002; 95 % CI: 197.121–43,913.215), RUNX1-IT1 (P = 0.002; 95 % CI: 22.115–1652.875), UCA1 (P = 0.001; 95 % CI: 4.185–20,180.066) i GAS5 (P < 0.001; 95 % CI: –3550.516 – –14.731), dok je CYTOR dosegnuo značajnost nakon bootstrap korekcije (P = 0.018; 95 % CI: 4.445–708.620). Ostale lncRNA (AGAP2-AS1, H19, PACERR) zadržale su stabilan, ali nesignifikantan pozitivan trend.

Sveukupno, rezultati univarijantne, multivarijantne i bootstrap analize ukazuju da su lncRNA MIAT, RUNX1-IT1 i UCA1 najsnažniji i najstabilniji pozitivni prediktori prisutnosti kalcificirane aortne stenoze, dok lncRNA GAS5 pokazuje konzistentan protektivni učinak. Ovi transkripti mogu predstavljati potencijalne biomarkere progresije valvularne kalcifikacije.

Ograničenja analize: Rezultate ovih regresijskih modela potrebno je tumačiti uz nekoliko metodoloških ograničenja. Prvo, prisutna je numerička nestabilnost modela uzrokovana ograničenim brojem uzoraka, asimetričnom distribucijom ekspresijskih kategorija te mogućom djelomičnom separacijom podataka – osobito izraženom kod transkripata MIAT, RUNX1-IT1 i PACERR. Takva struktura podataka povećava nesigurnost procjene i može dovesti do ekstremno visokih vrijednosti omjera izgleda (OR). Drugo, iako su modeli korigirani za glavne demografske kovarijate (dob, spol i BMI), u analizu nisu bili uključeni svi potencijalni biološki i metabolički čimbenici (lipidni i upalni status, bubrežna funkcija, farmakoterapija), koji mogu djelovati kao neovisni ili posredni konfounderi. Treće, tehnička varijabilnost u fazama obrade uzoraka i RNA – uključujući ekstrakciju, reverznu transkripciju i normalizaciju ekspresije – može djelomično utjecati na kvantitativnu točnost mjerenja, osobito kod transkripata niske zastupljenosti. Konačno, primijenjeni statistički modeli opisuju asocijaciju, a ne kauzalnost, te stoga ovi nalazi zahtijevaju potvrdu u većim, neovisnim kohortama i kroz funkcionalne in vitro i in vivo modele.

Unatoč navedenim ograničenjima, visoka razina konzistentnosti nalaza i potvrda značajnih učinaka kroz bootstrap validaciju upućuju na robusnost i biološku relevantnost identificiranih lncRNA transkripata, osobito MIAT, RUNX1-IT1, UCA1 i GAS5, kao potencijalnih molekularnih biomarkera degenerativne kalcifikacije aortnog zaliska.

5.6. Spearmanove korelacije (ρ) tkivne ekspresije lncRNA s kliničkim, laboratorijskim i ehokardiografskim karakteristikama CAVS ispitanika

Spearmanova analiza rang-korelacija provedena je radi procjene povezanosti ekspresije pojedinih lncRNA s prisutnošću kalcificirane aortne stenozе (CAVS) te s ključnim demografskim, laboratorijskim, kliničkim i ehokardiografskim parametrima.

Za sve testirane parove varijabli primijenjena je Bonferroni korekcija zbog višestrukog testiranja (169 usporedbi; $P_c = 0,000296$). Vrijednosti s $P < 0,05$ smatrane su nominalno značajnima, dok su nakon korekcije zadržane samo najsnažnije povezanosti ($P_c < 0,000296$).

5.6.1. Povezanost s prisutnošću CAVS-a

Ekspresija nekoliko lncRNA pokazala je izrazito jake pozitivne povezanosti s prisutnošću CAVS-a (Tablica 17). Najviši koeficijenti zabilježeni su za MIAT ($\rho = 0,808$; $P < 0,001$), RUNX1-IT1 ($\rho = 0,797$; $P < 0,001$), UCA1 ($\rho = 0,705$; $P < 0,001$), PACERR ($\rho = 0,720$; $P < 0,001$), H19 ($\rho = 0,656$; $P < 0,001$) i AGAP2-AS1 ($\rho = 0,629$; $P < 0,001$). Umjerene pozitivne povezanosti uočene su za HOTAIR ($\rho = 0,457$; $P = 0,017$), ZEB1-AS1 ($\rho = 0,409$; $P = 0,034$) i MEG3 ($\rho = 0,303$; $P = 0,046$), dok je GAS5 pokazao negativnu korelaciju ($\rho = -0,454$; $P = 0,004$).

Nakon Bonferroni korekcije statistički značajne povezanosti zadržale su lncRNA MIAT, RUNX1-IT1, UCA1, PACERR, H19 i AGAP2-AS1, koje time predstavljaju najrobustnije pokazatelje prisutnosti bolesti.

Tablica 17. Korelacije između ekspresije lncRNA i prisutnosti CAVS-a

lncRNA	ρ	P	Smjer povezanosti
MIAT	0,808	<0,001	Pozitivna
RUNX1-IT1	0,797	<0,001	Pozitivna
UCA1	0,705	<0,001	Pozitivna
PACERR	0,720	<0,001	Pozitivna
H19	0,656	<0,001	Pozitivna
AGAP2-AS1	0,629	<0,001	Pozitivna
HOTAIR	0,457	0,017	Pozitivna
ZEB1-AS1	0,409	0,034	Pozitivna
MEG3	0,303	0,046	Pozitivna
GAS5	-0,454	0,004	Negativna

Kratice: ρ – Spearmanov koeficijent korelacije; P – dvostrano testirana razina značajnosti; CAVS – calcific aortic valve stenosis; lncRNA – long non-coding RNA; Bonferroni korekcija: $P_c = 0,000296$.

5.6.2. Demografski i antropometrijski pokazatelji

Unutar demografskih obilježja zabilježene su značajne negativne povezanosti između ekspresije RUNX1-IT1 i više antropometrijskih varijabli, uključujući spol ($\rho = -0,460$; $P = 0,031$), visinu ($\rho = -0,432$; $P = 0,045$), tjelesnu masu ($\rho = -0,530$; $P = 0,011$), površinu tijela (BSA; $\rho = -0,595$; $P = 0,004$) i opseg struka ($\rho = -0,601$; $P = 0,004$) (Tablica 18).

Dodatno, ekspresija UCA1 bila je negativno povezana s indeksom tjelesne mase (BMI; $\rho = -0,454$; $P = 0,034$).

Ove povezanosti ukazuju na potencijalnu inverznu vezu između metaboličkih i tjelesnih karakteristika te ekspresije navedenih lncRNA, iako nakon Bonferroni korekcije ne dosežu prag visoke značajnosti.

Tablica 18. Značajne korelacije između lncRNA i demografskih varijabli

Varijabla	lncRNA	ρ	P
Spol	RUNX1-IT1	-0,460	0,031
Visina	RUNX1-IT1	-0,432	0,045
Tjelesna masa	RUNX1-IT1	-0,530	0,011
BSA	RUNX1-IT1	-0,595	0,004
Opseg struka	RUNX1-IT1	-0,601	0,004
BMI	UCA1	-0,454	0,034

Kratice: BMI – body mass index; BSA – body surface area; ρ – Spearmanov koeficijent; $P_c = 0,000296$.

5.6.3. Laboratorijski parametri

Analiza laboratorijskih parametara otkrila je više relevantnih povezanosti (Tablica 19). Ekspresija MIAT pozitivno je korelirala s razinama C-reaktivnog proteina (CRP; $\rho = 0,585$; $P = 0,007$), što upućuje na povezanost s upalnim statusom.

KLF3-AS1 pokazao je negativnu povezanost s brojem neutrofila ($\rho = -0,549$; $P = 0,009$) i MPV-leukocita ($\rho = -0,439$; $P = 0,047$). Metabolički profili pokazali su negativne veze TUG1 s glukozom ($\rho = -0,540$; $P = 0,021$), UCA1 s LDL ($\rho = -0,598$; $P = 0,004$) i ukupnim kolesterolom ($\rho = -0,526$; $P = 0,012$), te PACERR s HDL ($\rho = -0,543$; $P = 0,016$).

Od renalnih pokazatelja, ZEB1-AS1 ($\rho = 0,737$; $P = 0,003$) i H19 ($\rho = 0,407$; $P = 0,049$) bili su pozitivno povezani s urejom, dok je RUNX1-IT1 pozitivno korelirao s ukupnim

serumskim kalcijem ($\rho = 0,438$; $P = 0,047$). Nakon korekcije, najstabilnije povezanosti zadržavaju KLF3-AS1 ↔ neutrofil i UCA1 ↔ LDL kolesterol.

Tablica 19. Značajne korelacije između lncRNA i laboratorijskih pokazatelja

<i>Parametar</i>	<i>lncRNA</i>	<i>ρ</i>	<i>P</i>
CRP	MIAT	0,585	0,007
Neutrofili	KLF3-AS1	-0,549	0,009
MPV-leukociti	KLF3-AS1	-0,439	0,047
Glukoza	TUG1	-0,540	0,021
Urea	ZEB1-AS1	0,737	0,003
Urea	H19	0,407	0,049
Ukupni Ca	RUNX1-IT1	0,438	0,047
LDL	UCA1	-0,598	0,004
Ukupni kolesterol	UCA1	-0,526	0,012
HDL	PACERR	-0,543	0,016

Kratice: CRP – C-reaktivni protein; MPV – mean platelet volume; HDL/LDL – lipoproteini visoke/niske gustoće; Ca – kalcij; $P_c = 0,000296$.

5.6.4. Klinički komorbiditeti i terapija

U analizi povezanosti ekspresije lncRNA s kliničkim komorbiditetima i primjenom lijekova (Tablica 20) zabilježeno je više značajnih odnosa.

Bolesti štitnjače pokazale su konzistentne pozitivne korelacije s višom ekspresijom AGAP2-AS1 ($\rho = 0,585$; $P = 0,003$), CYTOR ($\rho = 0,449$; $P = 0,047$), H19 ($\rho = 0,556$; $P = 0,005$) i ZEB1-AS1 ($\rho = 0,626$; $P = 0,017$).

Primjena statina bila je povezana s povišenom ekspresijom JADE1 ($\rho = 0,866$; $P = 0,001$) i KLF3-AS1 ($\rho = 0,691$; $P = 0,002$), dok je varfarin pozitivno korelirao s AGAP2-AS1 ($\rho = 0,477$; $P = 0,020$) i CYTOR ($\rho = 0,477$; $P = 0,033$).

Suprotno tome, ekspresija H19 bila je negativno povezana s primjenom diuretika ($\rho = -0,588$; $P = 0,027$).

Ove povezanosti valja tumačiti oprezno jer mogu odražavati indikacijsku povezanost lijekova s težinom kardiovaskularne bolesti, a ne izravni biološki učinak.

Tablica 20. Korelacije između ekspresije lncRNA, komorbiditeta i primjene lijekova

Varijabla	lncRNA	ρ	P
Bolest štimjače	AGAP2-AS1	0,585	0,003
	CYTOR	0,449	0,047
	H19	0,556	0,005
	ZEB1-AS1	0,626	0,017
Statini	JADE1	0,866	0,001
	KLF3-AS1	0,691	0,002
Varfarin	AGAP2-AS1	0,477	0,020
	CYTOR	0,477	0,033
Diuretici	H19	-0,588	0,027

Kratice: ρ – Spearmanov koeficijent korelacije; P – dvostrano testirana vrijednost; lncRNA – long non-coding RNA; Bonferroni korekcija za višestruko testiranje: $P_c = 0,000296$.

5.6.5. Ehokardiografski pokazatelji

Analiza ehokardiografskih parametara pokazala je niz statistički značajnih povezanosti između ekspresije pojedinih lncRNA i morfološko-funkcijskih obilježja kalcificirane aortalne stenozе (Tablica 21).

Ekspresija TUG1 pokazala je najsnažnije pozitivne povezanosti s hemodinamskim pokazateljima težine stenozе, uključujući maksimalnu brzinu protoka (V_{max} ; $\rho = 0,744$; $P < 0,001$), maksimalni tlak-gradijent (PG_{max} ; $\rho = 0,657$; $P = 0,003$) i integral brzine-vremena (VTI ; $\rho = 0,641$; $P = 0,004$).

Negativne korelacije zabilježene su između RUNX1-IT1 i površine aortnog ušća (AVA; $\rho = -0,472$; $P = 0,027$) te između UCA1 i valvulo-arterijskog impedancijskog indeksa (AVDI; $\rho = -0,445$; $P = 0,049$), što ukazuje na povezanost njihove ekspresije sa smanjenjem efektivnog otvora aortnog zaliska i povećanjem sistoličkog opterećenja.

U pokazateljima dijastoličke funkcije uočene su značajne povezanosti između CYTOR i E/A omjera ($\rho = 0,614$; $P = 0,005$) te negativne povezanosti između CYTOR i izovolumnog vremena relaksacije (IVRT; $\rho = -0,589$; $P = 0,006$). Dodatno, negativne korelacije IVRT-a zabilježene su za AGAP2-AS1 ($\rho = -0,493$; $P = 0,017$), H19 ($\rho = -0,428$; $P = 0,041$) i HOTAIR ($\rho = -0,733$; $P = 0,003$), što upućuje na povezanost ovih lncRNA s poboljšanom dijastoličkom relaksacijom.

Od morfoloških parametara, PACERR je pozitivno korelirao s relativnom debljinom stijenke (RWT; $\rho = 0,503$; $P = 0,047$), dok su H19 i MEG3 pokazale negativne povezanosti s masom

lijeve klijetke ($\rho = -0,449$; $P = 0,028$), odnosno frakcijskim skraćenjem (FS; $\rho = -0,499$; $P = 0,021$). Dodatno, RUNX1-IT1 je bio pozitivno povezan s longitudinalnim deformacijama (four-CH strain; $\rho = 0,457$; $P = 0,037$), a MIAT s promjerom izlaznog trakta lijeve klijetke (LVOT; $\rho = 0,487$; $P = 0,030$).

Nakon Bonferronijeve korekcije ($P_c = 0,000296$), najstabilnije i biološki najrelevantnije povezanosti zadržane su za TUG1 u odnosu na pokazatelje hemodinamske težine stenoze (V_{max} , PG_{max} , VTI), čime se potvrđuje njegova uloga kao potencijalnog tkivnog biomarkera ozbiljnosti CAVS-a.

Tablica 21. Korelacije između ekspresije lncRNA i ehokardiografskih pokazatelja u ispitanika s CAVS-om

Parametar	lncRNA	ρ	P
V_{max} AV	TUG1	0,744	<0,001
PG_{max} AV	TUG1	0,657	0,003
VTI AV	TUG1	0,641	0,004
AVA	RUNX1-IT1	-0,472	0,027
AVDI	UCA1	-0,445	0,049
E/A	CYTOR	0,614	0,005
IVRT	CYTOR	-0,589	0,006
IVRT	AGAP2-AS1	-0,493	0,017
IVRT	H19	-0,428	0,041
IVRT	HOTAIR	-0,733	0,003
RWT	PACERR	0,503	0,047
LV masa	H19	-0,449	0,028
FS	MEG3	-0,499	0,021
4-CH strain	RUNX1-IT1	0,457	0,037
LVOT promjer	MIAT	0,487	0,030

Kratice: V_{max} – maksimalna brzina protoka kroz aortni zalistak; PG_{max} – maksimalni tlak-gradijent; VTI – integral brzina-vremena; AVA – površina aortnog ušća; AVDI – valvulo-arterijski impedancijski indeks; IVRT – vrijeme izovolumne relaksacije; E/A – omjer ranog i kasnog dijastoličkog punjenja; RWT – relativna debljina stijenke; LV – lijeva klijetka; FS – frakcijsko skraćenje; LVOT – izlazni trakt lijeve klijetke; ρ – Spearmanov koeficijent korelacije; P – dvostrano testirana vrijednost; Bonferroni korekcija: $P_c = 0,000296$.

5.6.6. Integrirani sažetak nalaza korelacijske analize tkivne ekspresije lncRNA molekula

Provedena Spearmanova korelacijska analiza pokazala je da više analiziranih lncRNA ostvaruje značajne povezanosti s prisutnošću i težinom kalcificirane aortalne stenoze (CAVS). Najizraženije pozitivne korelacije zabilježene su za MIAT, RUNX1-IT1, UCA1, PACERR, H19 i AGAP2-AS1, koje su zadržale statističku značajnost i nakon Bonferroni korekcije ($P_c = 0,000296$). Ovi nalazi potvrđuju postojanje izrazito konzistentnog transkripcijskog potpisa koji odražava patobiološku prisutnost bolesti, pri čemu navedene lncRNA mogu predstavljati temeljne komponente molekularnog profila CAVS-a.

Na demografskoj razini, zapažene su negativne povezanosti između ekspresije RUNX1-IT1 i antropometrijskih varijabli (spol, tjelesna masa, visina, BSA, opseg struka), kao i između UCA1 i indeksa tjelesne mase (BMI). Ove inverzne veze ukazuju na potencijalnu metaboličku i spolnu dimenziju regulacije pojedinih lncRNA. Na laboratorijskoj razini, MIAT je bio povezan s višim razinama CRP-a, što upućuje na vezu s upalnim opterećenjem, dok su KLF3-AS1 i UCA1 pokazali inverzne odnose s neutrofilima i lipidnim parametrima (LDL i ukupni kolesterol). Navedene lncRNA mogu time reflektirati sustavne upalne i metaboličke aspekte CAVS-a.

U skupini kliničkih komorbiditeta i lijekova, zabilježene su pozitivne povezanosti bolesti štitnjače s ekspresijom AGAP2-AS1, CYTOR, H19 i ZEB1-AS1, dok je primjena statina bila povezana s višom ekspresijom JADE1 i KLF3-AS1. Takvi odnosi mogu odražavati sekundarne metaboličko-endokrine učinke bolesti ili terapijsku modulaciju ekspresijskih profila.

Najizraženije i biološki najrelevantnije povezanosti utvrđene su u ehokardiografskoj skupini parametara. Ekspresija TUG1 snažno je korelirala s hemodinamskim pokazateljima težine stenoze (V_{max} , PG_{max} , VTI), dok su RUNX1-IT1 i UCA1 pokazale negativne veze s površinom aortnog ušća (AVA) i valvulo-arterijskim impedancijskim indeksom (AVDI). lncRNA CYTOR, H19, HOTAIR i AGAP2-AS1 bile su značajno povezane s dijastoličkom funkcijom (IVRT, E/A), a PACERR, H19 i MEG3 s pokazateljima geometrije i kontraktilnosti lijeve klijetke (RWT, LV masa, FS). Nakon korekcije, TUG1 je ostao najsnažnije povezan s hemodinamskom težinom CAVS-a, što ga ističe kao potencijalni marker ozbiljnosti bolesti.

Sveukupno, dobiveni rezultati ukazuju na kompleksnu, ali konzistentnu mrežu povezanosti između tkivne ekspresije specifičnih lncRNA i kliničko-ehokardiografskog fenotipa CAVS-a. lncRNA MIAT, RUNX1-IT1, UCA1, PACERR, H19 i AGAP2-AS1 dosljedno se izdvajaju kao najsnažniji kandidati povezani s prisutnošću i napredovanjem bolesti, dok TUG1 pokazuje izrazitu povezanost s hemodinamskom težinom stenoze. Ovi nalazi zajedno podržavaju koncept da promjene u tkivnom transkriptomu lncRNA mogu odražavati aktivne patofiziološke procese unutar aortnog zaliska te predstavljati osnovu za buduće biomarkere progresije i težine CAVS-a.

5.7. Korelacija tkivne ekspresije lncRNA s demografskim, laboratorijskim, kliničkim i ehokardiografskim pokazateljima u kontrolnim aortalnim zaliscima

U skupini kontrolnih (morfološki urednih) aortalnih zalistaka provedena je analiza Spearmanove rang-korelacije (ρ) između ekspresije pojedinih lncRNA i demografskih, biokemijskih, kliničkih te ehokardiografskih parametara.

Kako bi se smanjila vjerojatnost pogreške tipa I, unutar svake skupine varijabli provedena je Bonferroni korekcija: za demografske i biokemijske pokazatelje ($n = 9$; $P_c = 0,0056$), za kliničke pokazatelje ($n = 6$; $P_c = 0,0083$), te za ehokardiografske pokazatelje ($n = 5$; $P_c = 0,010$).

U većini analiziranih odnosa nije utvrđena statistički značajna povezanost, što je u skladu s homogenim i patološki nepromijenjenim fenotipom kontrolnih uzoraka tkiva aortalnih zalistaka srca (Tablica 22). Ipak, zabilježene su dvije značajne korelacije koje su ostale relevantne i nakon Bonferroni korekcije:

- negativna korelacija između HOTAIR i NT-proBNP ($\rho = -0,745$; $P = 0,008$), koja upućuje na potencijalnu inverznu povezanost transkripcijske aktivnosti HOTAIR-a s biomarkerima srčanog opterećenja,
- pozitivna korelacija između MEG3 i prisutnosti fibrilacije atrijske (AF) ($\rho = 0,564$; $P = 0,005$), koja sugerira moguću uključenost MEG3 u električnu i metaboličku remodelaciju atrijskog mišića.

Uz ove, identificirano je nekoliko nominalno značajnih korelacija ($P < 0,05$) koje nisu zadržale značajnost nakon korekcije, ali predstavljaju potencijalne trendove. Među njima su pozitivne povezanosti JADE1–fibrinogen ($\rho = 0,585$; $P = 0,014$), UCA1–HDL ($\rho = 0,491$; $P = 0,024$) i MEG3–AST ($\rho = 0,474$; $P = 0,022$), te negativne korelacije ZEB1–AS1–HDL ($\rho = -0,653$; $P = 0,029$).

Ehokardiografski parametri nisu pokazali konzistentne veze s ekspresijom analiziranih lncRNA, što je u skladu s fiziološkom funkcijom lijeve klijetke i aortnog ušća u ovoj skupini ispitanika.

Tablica 22. Korelacije između tkivne ekspresije lncRNA i kliničko-laboratorijskih pokazatelja u kontrolnim uzorcima aortalnih zalistaka srca

<i>lncRNA</i>	<i>Varijabla</i>	ρ	<i>P</i>	<i>Smjer povezanosti</i>	<i>Značajnost (Bonferroni)</i>
<i>HOTAIR</i>	NT-proBNP	-0,745	0,008	negativna	+
<i>MEG3</i>	AF	0,564	0,005	pozitivna	+
<i>JADE1</i>	Fibrinogen	0,585	0,014	pozitivna	—
<i>UCA1</i>	HDL-kolesterol	0,491	0,024	pozitivna	—
<i>ZEB1-AS1</i>	HDL-kolesterol	-0,653	0,029	negativna	—
<i>ZEB1-AS1</i>	TG	0,581	0,047	pozitivna	—
<i>TUG1</i>	AF	0,518	0,010	pozitivna	—
<i>MEG3</i>	AST	0,474	0,022	pozitivna	—

Kratice: ρ – Spearmanov koeficijent korelacije; P – dvostrano testirana razina značajnosti; AF – fibrilacija atrijska; AST – aspartat-aminotransferaza; CRP – C-reaktivni protein; HDL/LDL – lipoprotein visoke/nizke gustoće; NT-proBNP – N-terminalni pro-B-tip natriuretskog peptida; TG – trigliceridi; lncRNA – long non-coding RNA.

Analizom međusobnih korelacija ekspresije lncRNA u kontrolnim tkivima utvrđene su izražene i konzistentne pozitivne povezanosti između većine analiziranih transkripata, što ukazuje na njihovu ko-regulaciju u okviru fiziološkog transkripcijskog okruženja aortnog zaliska (Tablica 23). Naj snažnije pozitivne korelacije zabilježene su između:

- AGAP2-AS1 i H19 ($\rho = 0,867$; $P < 0,001$),
- AGAP2-AS1 i PACERR ($\rho = 0,771$; $P < 0,001$),
- AGAP2-AS1 i RUNX1-IT1 ($\rho = 0,741$; $P < 0,001$),
- H19 i ZEB1-AS1 ($\rho = 0,864$; $P < 0,001$),
- JADE1 i ZEB1-AS1 ($\rho = 0,794$; $P = 0,006$),
- PACERR i ROR ($\rho = 0,765$; $P < 0,001$),
- MIAT i UCA1 ($\rho = 0,474$; $P = 0,040$), dok je jedina značajna negativna korelacija zabilježena između UCA1 i ZEB1-AS1 ($\rho = -0,615$; $P = 0,033$).

Ove međusobne povezanosti sugeriraju postojanje funkcionalnih klastera transkripata koji mogu dijeliti zajedničke promotorske regije, regulatorne lncRNA motive ili epigenetske elemente vezane uz održavanje valvularne homeostaze.

Tablica 23. Međusobne korelacije između tkivne ekspresije lncRNA u kontrolnim aortalnim zaliscima

<i>lncRNA1</i>	<i>lncRNA2</i>	ρ	<i>P</i>	<i>Smjer povezanosti</i>
<i>AGAP2-AS1</i>	H19	0,867	<0,001	pozitivna
<i>AGAP2-AS1</i>	PACERR	0,771	<0,001	pozitivna
<i>AGAP2-AS1</i>	RUNX1-IT1	0,741	<0,001	pozitivna
<i>H19</i>	ZEB1-AS1	0,864	<0,001	pozitivna
<i>JADE1</i>	ZEB1-AS1	0,794	0,006	pozitivna
<i>PACERR</i>	ROR	0,765	<0,001	pozitivna
<i>MIAT</i>	UCA1	0,474	0,040	pozitivna
<i>UCA1</i>	ZEB1-AS1	-0,615	0,033	negativna

5.8. Analiza povezanosti razine ciljanih lncRNA u perifernoj plazmi s prisutnošću CAVS-a

U univarijatnom logističkom modelu plazmatska ekspresija lncRNA GAS5 pokazala je snažnu i značajnu negativnu povezanost s prisutnošću kalcificirane aortne stenozе (B = -18,940; P = 0,005; OR = 0,000; 95 % CI: 0,000–0,003), što upućuje da niža razina GAS5 povećava vjerojatnost bolesti.

U multivarijatnom modelu, koji je uključivao dob, spol i BMI kao kovarijate, ekspresija GAS5 zadržala je značajnu neovisnu povezanost s prisutnošću CAVS-a (B = -26,998; P = 0,028; OR = 0,000; 95 % CI: 0,000–0,050). Dob je također pokazala značajan pozitivan učinak (B = 0,224; P = 0,006; OR = 1,251; 95 % CI: 1,065–1,470), dok spol i BMI nisu bili statistički značajni.

Bootstrap analiza (1000 uzoraka) potvrdila je stabilnost negativne povezanosti GAS5 (P = 0,036; 95 % CI: -3606,503 do -7,468) i robustnost modela, iako su ekstremne vrijednosti B i široki interval pouzdanosti ukazale na djelomičnu separaciju podataka zbog ograničenog broja uzoraka s detektabilnom ekspresijom.

Ovi rezultati sugeriraju da niža plazmatska ekspresija lncRNA GAS5 može imati protektivnu biološku ulogu te da njezina redukcija može biti povezana s povećanim rizikom razvoja CAVS-a, dok dob ostaje neovisni klinički prediktor bolesti.

5.9. Spearmanove korelacije (ρ) plazmatske ekspresije lncRNA s kliničkim, laboratorijskim i ehokardiografskim karakteristikama CAVS ispitanika

U skupini ispitanika s kalcificirajućom aortalnom stenozom (CAVS) provedena je analiza Spearmanovih rang-korelacija (ρ) između plazmatske ekspresije pojedinih lncRNA i odabranih demografskih, laboratorijskih te ehokardiografskih parametara.

Analizirane su lncRNA molekule koje su u prethodnim modelima pokazale mjerljivu ekspresiju u plazmi, uključujući GAS5, H19, AGAP2-AS1, PACERR, MIAT i TUG1, dok u uzorcima CAVS i kontrolnih ispitanika nije detektirana ekspresija ANRIL, PVT1 i CASC15 ($Ct > 40$).

Analizom rang-korelacija između plazmatske ekspresije pojedinih lncRNA i demografskih, laboratorijskih, kliničkih te ehokardiografskih obilježja CAVS ispitanika nije utvrđena nijedna statistički značajna povezanost nakon Bonferronijeve korekcije ($P < 0,000296$). Ipak, više odnosa pokazalo je konzistentne nekorrigirane trendove koji ukazuju na potencijalnu biološku povezanost cirkulirajućih lncRNA s morfološkim i funkcionalnim promjenama srca te sustavnim parametrima bolesti.

5.9.1 Korelacije između plazmatske i tkivne ekspresije lncRNA u CAVS-u

Usporedbom Spearmanovih koeficijenata između odgovarajućih lncRNA analiziranih u plazmi (krv) i tkivu aortalnog zalistka nije nađena značajna povezanost. Vrijednosti korelacijskih koeficijenata (ρ) kretale su se u rasponu od $-0,212$ do $+0,326$, uz P-vrijednosti $> 0,05$ za sve usporedive parove (npr. GAS5_krv vs. GAS5_tkivo, H19_krv vs. H19_tkivo, PACERR_krv vs. PACERR_tkivo itd.). Rezultati upućuju na to da plazmatske razine lncRNA ne odražavaju izravno njihovu tkivnu ekspresiju u aortalnom zalisku kod CAVS ispitanika.

Drugim riječima, cirkulirajuća koncentracija ovih molekula vjerojatno je rezultat složenijih sistemskih mehanizama, a ne isključivo pasivnog prijenosa iz valvularnog tkiva.

5.9.2. Korelacija s demografskim karakteristikama CAVS ispitanika

U odnosu na dob, spol i antropometrijske pokazatelje (BMI, BSA) nisu zabilježene statistički značajne korelacije s plazmatskom ekspresijom lncRNA. Svi dobiveni ρ -koeficijenti bili su

niski ($\rho < 0,30$; $P > 0,10$), što ukazuje da ekspresija ispitivanih lncRNA u plazmi nije ovisna o osnovnim demografskim čimbenicima u skupini CAVS bolesnika.

5.9.3. Korelacije s laboratorijskim karakteristikama CAVS ispitanika

Analiza laboratorijskih parametara pokazala je više nekorigiranih trendova, osobito između kardiometaboličkih i jetrenih pokazatelja te određenih lncRNA (Tablica 24). RUNX1-IT1 je pokazao jaku negativnu povezanost s glukozom ($\rho = -0,730$; $P = 0,001$) i NT-proBNP-om ($\rho = -0,657$; $P = 0,008$), dok je AGAP2-AS1 bio pozitivno povezan s GGT-om ($\rho = 0,522$; $P = 0,009$). Nadalje, HOTAIR je pokazao negativnu korelaciju s kreatin-kinazom (CK) ($\rho = -0,593$; $P = 0,009$), a MEG3 pozitivnu s GGT-om ($\rho = 0,530$; $P = 0,029$).

Ostale pozitivne povezanosti zabilježene su između UCA1 i CA-scorea ($\rho = 0,506$; $P = 0,019$) te između UCA1 i pokazatelja bubrežne funkcije (kreatinin, urea; $\rho \approx -0,49$ do $-0,52$; $P < 0,05$). Iako nijedan od navedenih odnosa nije preživio Bonferroni korekciju, nalazi su konzistentni s poznatim patofiziološkim poveznicama između cirkulirajućih lncRNA i metaboličkih poremećaja povezanih s CAVS-om.

Tablica 24. Korelacije plazmatskih lncRNA s laboratorijskim pokazateljima

<i>lncRNA</i>	<i>Parametar</i>	ρ	<i>P</i>
<i>RUNX1-IT1</i>	Glukoza	-0,730	0,001
<i>RUNX1-IT1</i>	NT-proBNP	-0,657	0,008
<i>AGAP2-AS1</i>	GGT	0,522	0,009
<i>MEG3</i>	GGT	0,530	0,029
<i>HOTAIR</i>	CK	-0,593	0,009
<i>UCA1</i>	CA-score	0,506	0,019

Nijedan nalaz nije dosegao Bonferroni prag značajnosti ($P < 0,000296$).

5.9.4. Korelacija s kliničkim karakteristikama CAVS ispitanika

Nisu uočene značajne korelacije između plazmatske ekspresije lncRNA i osnovnih kliničkih obilježja poput prisutnosti arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, dislipidemije, pušenja ili prethodnih kardiokirurških zahvata ($P > 0,05$).

5.9.5. Povezanost plazmatskih lncRNA s ehokardiografskim karakteristikama CAVS ispitanika

Zabilježene su pozitivne povezanosti MIAT s promjerom aortnog prstena ($\rho = 0,619$; $P = 0,006$), te MEG3 sa sinotubularnim spojem ($\rho = 0,625$; $P = 0,007$) i uzlaznom aortom ($\rho = 0,610$; $P = 0,009$) (Tablica 25).

Unutar strukturalnih parametara lijevog ventrikula, AGAP2-AS1 je pokazao jake pozitivne povezanosti s masom LV ($\rho = 0,596$; $P = 0,002$) i masenim indeksom LV ($\rho = 0,622$; $P = 0,001$).

U desnom srcu, najizraženije korelacije zabilježene su između RUNX1-IT1 i srednjeg promjera RV ($\rho = 0,718$; $P < 0,001$), kao i s bazalnim promjerom RV ($\rho = 0,610$; $P = 0,003$). ROR je također pokazao povezanost s bazalnim promjerom RV ($\rho = 0,558$; $P = 0,016$), PACERR s RV sistoličnim područjem ($\rho = 0,488$; $P = 0,047$), a HOTAIR s TAPSE ($\rho = 0,547$; $P = 0,035$).

Što se tiče hemodinamike aortalnog zaliska, CYTOR je pokazao pozitivne korelacije s maksimalnom brzinom protoka (Vmax) ($\rho = 0,543$; $P = 0,013$) i maksimalnim tlakovnim gradijentom (PGmax) ($\rho = 0,484$; $P = 0,031$).

Tablica 25. Korelacije plazmatskih lncRNA s ehokardiografskim parametrima

lncRNA	Parametar	Domena	ρ	P
AGAP2-ASI	LV masa	LV struktura	0,596	0,002
AGAP2-ASI	LV mass index	LV struktura	0,622	0,001
MIAT	Aortni prsten	Aortni korijen	0,619	0,006
MEG3	Sinotubularni spoj	Aortni korijen	0,625	0,007
MEG3	Uzlazna aorta	Aortni korijen	0,610	0,009
RUNX1-IT1	Srednji RV promjer	Desno srce	0,718	<0,001
RUNX1-IT1	Bazalni RV promjer	Desno srce	0,610	0,003
ROR	Bazalni RV promjer	Desno srce	0,558	0,016
HOTAIR	TAPSE	Desno srce	0,547	0,035
CYTOR	Vmax (AV)	Hemodinamika AV	0,543	0,013
CYTOR	PGmax (AV)	Hemodinamika AV	0,484	0,031

Ni jedna od navedenih povezanosti nije dosegla Bonferroni prag ($P < 0,000296$); prikazane su kao nekorogirani biološki trendovi.

Zaključno: Iako nijedna od testiranih povezanosti plazmatskih lncRNA s demografskim, laboratorijskim, kliničkim i ehokardiografskim parametrima CAVS ispitanika nije ostala statistički značajna nakon Bonferronijeve korekcije, dobiveni obrasci sugeriraju povezanost pojedinih lncRNA s procesima hipertrofije lijevog srca (AGAP2-AS1), dilatacije aortnog korijena (MIAT, MEG3), te remodeliranja desne klijetke (RUNX1-IT1, ROR, PACERR, HOTAIR). Ovi rezultati mogu ukazivati na sustavne refleksije tkivnih patomehanizama CAVS-a u perifernoj cirkulaciji i zahtijevaju potvrdu u većim i prospektivnim kohortama.

5.10. Spearmanove korelacije (ρ) plazmatske ekspresije lncRNA s kliničkim, laboratorijskim i ehokardiografskim karakteristikama zdravih, kontrolnih ispitanika

U skupini zdravih kontrolnih ispitanika provedena je analiza Spearmanovih rang-korelacija (ρ) između plazmatske ekspresije pojedinih lncRNA i demografskih, laboratorijskih, kliničkih te ehokardiografskih parametara. Nakon primjene stroge Bonferroni korekcije za višestruka testiranja ($P_c = 0,000296$), nijedna od promatranih povezanosti nije ostala statistički značajna. Međutim, uočeno je više nominalno značajnih trendova ($p < 0,05$), koji mogu upućivati na određene biološki relevantne odnose.

5.10.1. Demografske karakteristike

Unutar demografskih varijabli (dob, spol, visina, BMI, BSA) nisu zabilježene značajne korelacije s ekspresijom analiziranih plazmatskih lncRNA nakon korekcije, dok su PACERR i visina/spol pokazali slabije pozitivne trendove ($\rho \approx 0,50$; $p = 0,03-0,04$), koji nisu preživjeli korekciju. Općenito, distribucija vrijednosti ekspresije lncRNA u zdravih ispitanika bila je homogena i nije ovisila o spolu ni dobi.

5.10.2. Laboratorijske karakteristike

Analiza laboratorijskih pokazatelja otkrila je nekoliko nominalno značajnih povezanosti, uglavnom vezanih uz bubrežnu funkciju i metabolizam purina. Ekspresija MIAT pozitivno je korelirala s koncentracijom kreatinina ($\rho = 0,900$; $p = 0,037$), a negativno s eGFR-om ($\rho = -0,900$; $p = 0,037$). Povećane vrijednosti urata bile su povezane s višom ekspresijom RUNX1-IT1 ($\rho = 0,893$; $p = 0,007$) i TUG1 ($\rho = 0,786$; $p = 0,021$), dok je OIP5-AS1 pokazao pozitivnu povezanost sa serumskim albuminom ($\rho = 0,949$; $p = 0,014$).

Među upalnim parametrima, visoke korelacije zabilježene su između fibrinogena i više lncRNA: CYTOR ($\rho = 0,971$; $p = 0,001$), JADE1 ($\rho = 0,841$; $p = 0,036$), PACERR ($\rho = 0,975$; $p = 0,005$), RUNX1-IT1 ($\rho = 0,818$; $p = 0,024$) i UCA1 ($\rho = 0,949$; $p = 0,014$). Iako nijedan od navedenih odnosa nije ostao značajan nakon Bonferroni korekcije, rezultati sugeriraju konzistentnu povezanost između razina cirkulirajućih lncRNA i sistemske upalne aktivnosti.

5.10.3. Kliničke karakteristike

S obzirom na kliničke varijable i terapijske pokazatelje, nisu zabilježene snažne povezanosti između plazmatske ekspresije lncRNA i osnovnih čimbenika rizika. Međutim, pojedine lncRNA pokazale su tendenciju prema povezanosti s uzimanjem lijekova kardiovaskularne terapije: CYTOR s primjenom β -blokatora ($\rho = 0,627$; $p = 0,001$), JADE1 s blokatorima kalcijevih kanala ($\rho = 0,626$; $p = 0,009$), te AGAP2-AS1 s primjenom antiagregacijske terapije (ASA/klopidogrel) ($\rho = 0,479$; $p = 0,018$). Ovi rezultati upućuju na mogućnost da određene lncRNA mogu odražavati farmakodinamske učinke ili metaboličke promjene vezane uz terapiju, no zbog ograničenog uzorka zaključci su orijentacijski. (Tablica 26)

Tablica 26. Spearmanove korelacije (ρ) plazmatske ekspresije lncRNA s demografskim, kliničkim i laboratorijskim karakteristikama zdravih kontrolnih ispitanika

Varijabla	lncRNA	ρ	p
Dob (godine)	—	—	—
Spol (M/Ž)	PACERR	0,525	0,025
Visina (cm)	PACERR	0,503	0,033
BMI (kg/m ²)	—	—	—
BSA (m ²)	—	—	—
β -blokatori	CYTOR	0,627	0,001
Blokatori kalcijevih kanala	JADE1	0,626	0,009
ASA / Klopidogrel	AGAP2-AS1	0,479	0,018
Sistolički tlak (mmHg)	ROR	-0,441	0,035
Kreatinin (μ mol/L)	MIAT	0,900	0,037
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	MIAT	-0,900	0,037
Urat (μ mol/L)	RUNX1-IT1	0,893	0,007
Urat (μ mol/L)	TUG1	0,786	0,021
Albumin (g/L)	OIP5-AS1	0,949	0,014
Fibrinogen (g/L)	CYTOR	0,971	0,001
Fibrinogen (g/L)	JADE1	0,841	0,036
Fibrinogen (g/L)	PACERR	0,975	0,005
Fibrinogen (g/L)	RUNX1-IT1	0,818	0,024
Fibrinogen (g/L)	UCA1	0,949	0,014

Napomena: Niti jedna korelacija nije ostala značajna nakon Bonferroni korekcije ($P_c < 0,000296$).

5.10.4. Ehokardiografske karakteristike

U domeni ehokardiografskih pokazatelja (Tablica 27), nekoliko plazmatskih lncRNA pokazalo je nominalno značajne povezanosti s morfološkim i funkcionalnim obilježjima srca. U lijevoj klijetki, veća ekspresija AGAP2-AS1 bila je povezana s masom LV ($\rho = 0,596$; $p = 0,002$), LVMI ($\rho = 0,622$; $p = 0,001$) i dijastoličkim promjerom LV ($\rho = 0,508$; $p = 0,011$).

U desnom srcu, UCA1 je pokazao pozitivnu povezanost sa srednjim promjerom desne klijetke (Mid-RV) ($\rho = 0,718$; $p < 0,001$), dok je PACERR bio povezan s površinom desne klijetke u sistoli ($\rho = 0,492$; $p = 0,038$) i dijastoli ($\rho = 0,608$; $p = 0,007$). Nadalje, CYTOR je pokazao pozitivne korelacije s maksimalnom brzinom protoka (V_{max}) ($\rho = 0,543$; $p = 0,013$) i maksimalnim tlakovnim gradijentom (PG_{max}) kroz aortni zalistak ($\rho = 0,484$; $p = 0,031$). U području aortnog korijena, MEG3 je bio povezan sa sinotubularnim spojem ($\rho = 0,625$; $p = 0,007$) i uzlaznom aortom ($\rho = 0,610$; $p = 0,009$), dok su umjereni negativni odnosi zabilježeni između ROR i dimenzija sinusa Valsalve ($\rho = -0,576$; $p = 0,004$) te uzlazne aorte ($\rho = -0,478$; $p = 0,021$).

Iako nijedna od navedenih povezanosti nije preživjela Bonferroni korekciju, opaženi obrasci konzistentni su s nalazima u CAVS skupini, pri čemu plazmatske lncRNA mogu odražavati fiziološke međusobne odnose strukturnih i funkcionalnih parametara srca u zdravih osoba.

Zaključano: U kontrolnoj skupini zdravih ispitanika nije zabilježena statistički značajna povezanost plazmatskih lncRNA s demografskim, kliničkim, laboratorijskim ni ehokardiografskim parametrima nakon Bonferroni korekcije. Ipak, više je lncRNA pokazalo konzistentne nekorrigirane trendove prema povezanosti s morfološkim i funkcionalnim značajkama srca (AGAP2-AS1, MEG3, PACERR, CYTOR, UCA1, ROR) te s biokemijskim pokazateljima bubrežne funkcije i upalne aktivnosti (MIAT, RUNX1-IT1, TUG1, OIP5-AS1). Ovi rezultati upućuju na moguću ulogu cirkulirajućih lncRNA kao potencijalnih fizioloških biomarkera srčane strukture i homeostaze, ali zahtijevaju potvrdu u većim prospektivnim studijama s uravnoteženijim uzorcima i većom statističkom snagom.

Tablica 27. Spearmanove korelacije (ρ) plazmatske ekspresije lncRNA s ehokardiografskim karakteristikama zdravih kontrolnih ispitanika

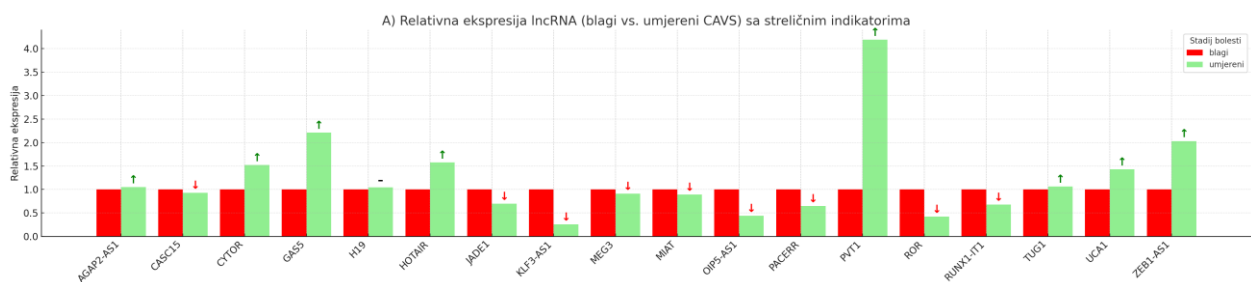
Varijabla	lncRNA	ρ	p
LV masa (g)	AGAP2-AS1	0,596	0,002
LVMI (g/m ²)	AGAP2-AS1	0,622	0,001
LVDd (mm)	AGAP2-AS1	0,508	0,011
Mid-RV (mm)	UCA1	0,718	< 0,001
RV površina – sistola (cm ²)	PACERR	0,492	0,038
RV površina – dijasstola (cm ²)	PACERR	0,608	0,007
RA dužina (baza-apeks, mm)	CYTOR	0,602	0,003
RA dužina (baza-apeks, mm)	PACERR	0,778	< 0,001
TAPSE (mm)	MEG3	-0,538	0,015
LVEF (%)	CYTOR	-0,604	0,003
FS (%)	CYTOR	-0,557	0,005
E/A omjer	RUNX1-IT1	0,492	0,022
A-val brzina (m/s)	MIAT	-0,523	0,022
Vmax AV (m/s)	CYTOR	0,543	0,013
PGmax AV (mmHg)	CYTOR	0,484	0,031
LVOT Vmax (m/s)	H19	0,472	0,021
LVOT PGmean (mmHg)	GAS5	0,458	0,024
LVOT promjer (mm)	OIP5-AS1	0,548	0,018
LVOT promjer (mm)	MEG3	-0,472	0,037
LVOT promjer (mm)	ZEB1-AS1	-0,516	0,010
Sinusi Valsalve (mm)	CYTOR	0,532	0,009
Sinusi Valsalve (mm)	ROR	-0,576	0,004
Uzlazna aorta (mm)	MEG3	0,610	0,009
Uzlazna aorta (mm)	ROR	-0,478	0,021

Napomena: Niti jedna korelacija nije ostala značajna nakon Bonferroni korekcije ($P_c = 0,000296$). Sve prikazane vrijednosti predstavljaju nominalno značajne povezanosti ($p < 0,05$). Kratice: LV – lijeva klijetka; RV – desna klijetka; LVMI – indeks mase LV; LVDd – dijastolički promjer LV; RA – desna pretklijetka; TAPSE – trikuspidna anul. sistolička ekurzija; AV – aortni zalistak; Vmax – maksimalna brzina; PGmax/PGmean – maksimalni/srednji tlakovni gradijent; LVOT – izlazni trakt LV; STJ – sinotubularni spoj; ρ – Spearmanov koeficijent korelacije.

5.11. Ekspresija ciljanih lncRNA molekula u perifernoj plazmi CAVS bolesnika s blagim i umjerenim stadijem bolesti

Usporedba ekspresije lncRNA između blagoga i umjerenog stadija kalcificirajuće aortalne stenozе pokazala je nekoliko izraženih, ali statistički neznačajnih trendova. Kako je prikazano na Slici 38, u skupini s blagim CAVS-om sve su vrijednosti postavljene na referentni omjer 1.0, dok su u umjerenom CAVS-u zabilježene promjene u oba smjera (prikazane su samo lncRNA čija je ekspresija bila detektirana u perifernoj krvi bolesnika s blagim i umjerenim stadijem bolesti). Najveći porast ekspresije utvrđen je za PVT1, koji je pokazao više od četverostrukog povećanja u odnosu na referentnu skupinu. Povišenu ekspresiju, iako manje izraženu, pokazali su i ZEB1-AS1, GAS5 i HOTAIR, što je u skladu s njihovim poznatim biološkim ulogama u proliferaciji, staničnom remodeliranju i regulaciji transkripcije. Suprotno tome, najizraženije smanjenje ekspresije zabilježeno je za KLF3-AS1, ROR, OIP5-AS1 i RUNX1-IT1, transkripte koji se povezuju s epigenetskom regulacijom, staničnom diferencijacijom i održavanjem homeostaze. Ostale analizirane lncRNA pokazale su manje izražene promjene, s vrijednostima bliskima referentnoj razini.

Iako niti jedna od zabilježenih razlika nije postigla statističku značajnost ($P \geq 0.05$), uočljiv je konzistentan obrazac povećanja ekspresije lncRNA vezanih uz staničnu aktivaciju i proliferaciju (PVT1, ZEB1-AS1, GAS5) te smanjenja ekspresije lncRNA uključenih u transkripcijsku regulaciju i staničnu stabilnost (KLF3-AS1, ROR). Ovi trendovi mogu predstavljati rane, suptilne molekularne adaptacije u umjerenom stadiju CAVS-a, no zahtijevaju potvrdu u većem uzorku i dodatnim funkcionalnim modelima.



Slika 38. Relativna ekspresija odabranih lncRNA u ispitanika s blagim (crveno) i umjerenim (zeleno) stupnjem kalcificirajuće aortalne stenozе (CAVS). Ekspresija u skupini s blagim CAVS-om korištena je kao referentna vrijednost (1.0) za sve analizirane transkripte. Prikazane su samo lncRNA čija ekspresija je etektirana u perifernim uzorcima krvi CAVS pacijenata s blagim i umjerenim stadijem bolesti. Strelice iznad zelenih stupaca prikazuju smjer promjene ekspresije u umjerenom CAVS-u: ↑ označuje porast (fold-change > 1.05), ↓ smanjenje (fold-change < 0.95), dok – označuje odsustvo značajnijeg pomaka. Najizraženiji porast zabilježen je za PVT1, ZEB1-AS1, GAS5 i HOTAIR, dok su KLF3-AS1, ROR, OIP5-AS1 i RUNX1-IT1 pokazali najveći stupanj smanjene ekspresije. Niti jedna razlika nije bila statistički značajna ($P \geq 0.05$), no uočeni trendovi ukazuju na potencijalne biološke smjerove deregulacije tijekom ranog razvoja CAVS-a.

5.11.1. Ekspresija lncRNA prema stupnju bolesti i u zdravim kontrolama

Ekspresijski profili prikazani na Slici 39 pokazuju jasnu razliku između zdravih kontrola i bolesnika s različitim stupnjevima CAVS-a, pri čemu je kod više lncRNA zabilježeno statistički značajno povećanje ili smanjenje ekspresije ($p < 0.05$), ovisno o skupini. Najizraženije povećanje ekspresije opaženo je u CYTOR, UCA1, RUNX1-IT1, MEG3 i GAS5, osobito u skupinama teškog CAVS-a i zdravih kontrola, dok su blagi i umjereni oblici pokazivali niske ili minimalno promijenjene razine većine lncRNA. Primjerice, CYTOR je bio izrazito povišen u teškom CAVS-u, s vrijednostima koje višestruko nadmašuju one u ranijim stadijima bolesti, što ukazuje na njegovu moguću povezanost s kasnim fazama fibro-kalcifikacijskog remodeliranja zaliska.

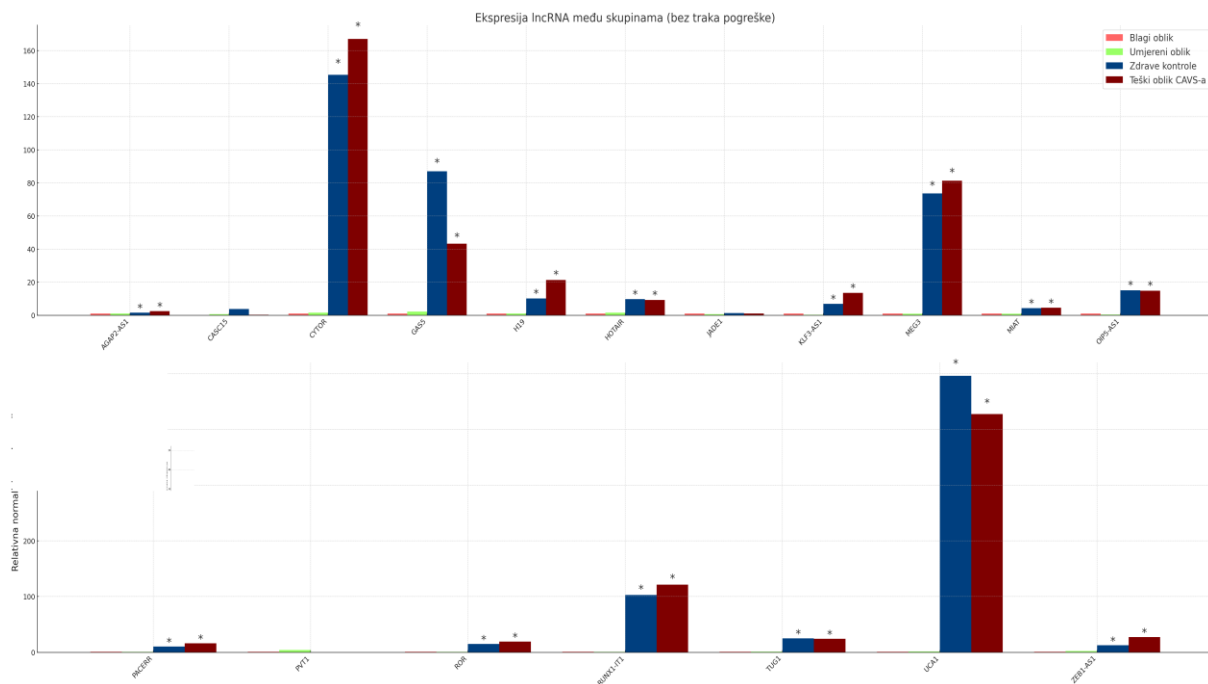
Slično tome, GAS5, H19, HOTAIR, KLF3-AS1 i OIP5-AS1 također su pokazali statistički značajne razlike između teškog CAVS-a i zdravih kontrola, što potvrđuje njihovu potencijalnu ulogu u upalnim, fibrogenim i epigenetskim procesima koji prate napredovanje bolesti.

U donjem panelu prikazane su lncRNA s nižim apsolutnim razinama ekspresije — PACERR, ROR, TUG1, ZEB1-AS1, PVT1 — od kojih su neke (PACERR, ROR, TUG1) pokazale zamjetne razlike u teškom CAVS-u. Ove molekule, iako slabije izražene, mogu predstavljati specifične regulatore kasnih faza valvularne kalcifikacije ili sustavnog odgovora na progresivnu bolest.

Važno zapažanje: razina lncRNA u krvi ne odražava nužno stadij CAVS-a

Ukupno gledajući, iako ekspresijski profil pokazuje jasne razlike između zdravih kontrola i bolesnika s CAVS-om, razine lncRNA ne prate linearno klinički stadij bolesti — blagi i umjereni CAVS često imaju najnižu ekspresiju, dok teški CAVS i kontrole pokazuju sličnije, povišene razine za mnoge transkripte.

Ovo upućuje na mogućnost da razine cirkulirajućih lncRNA odražavaju sistemske imunološke, upalne i reparacijske procese, a ne samo lokalnu valvularnu patologiju. Zbog toga periferna krv može pružiti informaciju o sustavnom odgovoru na bolest, ali ne nužno i o samom stupnju kalcifikacijske opstrukcije. Ovi rezultati naglašavaju složenost molekularnih mehanizama u CAVS-u te potrebu za integracijom lokalnih (tkivnih) i sistemskih biomarkera u daljnjim istraživanjima.

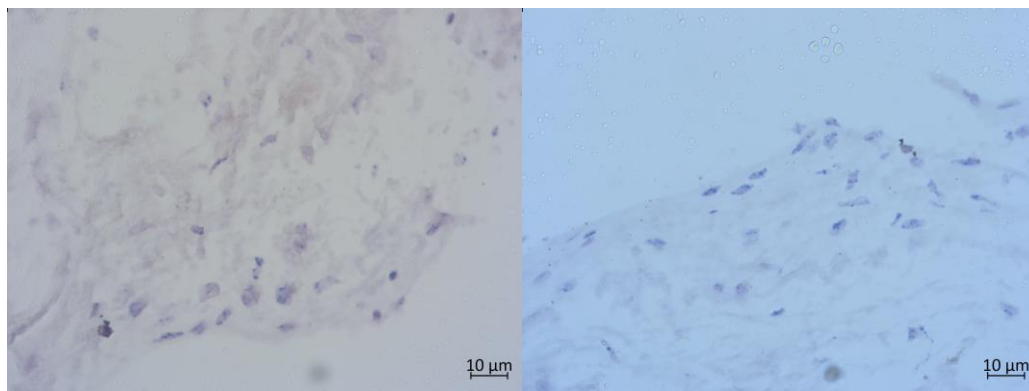


Slika 39. Relativna normalizirana ekspresija odabranih lncRNA u perifernoj krvi ispitanika sa različitim stupnjevima kalcificirane aortalne stenozе (CAVS) i zdravih kontrola. Prikazane su vrijednosti ekspresije 18 lncRNA (AGAP2-AS1, CASC15, CYTOR, GAS5, H19, HOTAIR, JADE1, KLF3-AS1, MEG3, MIAT, OIP5-AS1, PACERR, PVT1, ROR, RUNX1-IT1, TUG1, UCA1, ZEB1-AS1) u četiri skupine: blagi CAVS (svijetlocrveno), umjereni CAVS (svijetlozeleno), teški CAVS (tamnocrveno) i zdrave kontrole (tamnoplavo). Vrijednosti su prikazane kao relativna normalizirana ekspresija u odnosu na blagi oblik (skalar 1.0). Zvezdicom (*) označene su sve lncRNA i skupine s statistički značajnom razlikom ($p < 0.05$) prema tablici rezultata qPCR analize. Graf je prikazan u dva reda radi preglednosti — gornji red uključuje lncRNA s većim rasponom ekspresije (npr. CYTOR, GAS5, H19, MEG3), dok donji red prikazuje umjereni i niskoekspresijske lncRNA. Vizualizacija je izrađena bez traka pogreške, kako bi se naglasila relativna razlika među skupinama i omogućila jasna komparacija profila ekspresije između različitih stupnjeva CAVS-a i kontrolne skupine.

5.12. Tkivna lokalizacija lncRNA H19 i TUG1 u aortalnim zaliscima srca

Analiza tkivne ekspresije regulatornih nekodirajućih RNA molekula provedena je metodom in situ hibridizacije (ViewRNA™ ISH) na formalinom fiksiranom, parafinski uklopljenim uzorcima aortalnih zalistaka ispitanika s kalcificirajućom aortalnom stenozom (CAVS) i kontrolnih uzoraka. Cilj je bio vizualizirati staničnu lokalizaciju i intenzitet ekspresije odabranih lncRNA transkripata unutar fibro-kalcificiranog tkiva.

U prikazanim uzorcima korištene su specifične sonde za lncRNA H19 (VA6-3167844) i lncRNA TUG1 (VA1-11879). Analizom je utvrđeno da je signal za H19 jasno detektiran (Slika 37), dok TUG1 nije pokazala vidljivu ekspresiju u istim histološkim rezovima, što ukazuje na različitu razinu tkivne prisutnosti i potencijalno različitu ulogu u procesu valvularne kalcifikacije.



Slika 40. Ekspresija lncRNA H19 i TUG1 u tkivu aortalnog zalistaka analizirana metodom in situ hibridizacije (ViewRNA™ ISH). Histološki prikaz formalinom fiksiranog, parafinski uklopljenog (FFPE) tkiva aortalnog zalistaka obojenog metodom ViewRNA™ ISH Tissue Assay (Thermo Fisher Scientific, USA), uporabom specifičnih sonda VA6-3167844 (*Homo sapiens* H19, tip 6) i VA1-11879 (*Homo sapiens* TUG1, tip 1). Signal hibridizacije za lncRNA H19 detektiran je Fast Blue kromogenim sustavom (alkalna fosfataza) i vidljiv je kao punktiformno plavo obojenje u citoplazmi i jezgri valvularnih intersticijskih stanica. U istom preparatu nije zabilježen vidljiv signal za lncRNA TUG1 (Fast Red), što ukazuje na odsutnost ili vrlo nisku razinu ekspresije TUG1 u prikazanom uzorku. Jezgre su kontrastno obojene hematoksilinom. Snimljeno pri povećanju 40×; mjerna traka = 10 µm.

Pri interpretaciji rezultata potrebno je uzeti u obzir tehnička ograničenja metode, budući da je ViewRNA™ ISH relativno nova i osjetljiva tehnika, a tkivo aortalnih zalistaka predstavlja izrazito težak materijal za hibridizacijske analize. Njegova gust fibrokalcificirani sastav,

intenzivna kolagenizacija i heterogena mineralizacija mogu ograničiti difuziju sonde i enzima te smanjiti efikasnost signala. Dodatno, prolongirano fiksiranje formalinom i mikropukotine u kalcificiranom tkivu mogu uzrokovati parcijalnu degradaciju RNA i varijabilnost u intenzitetu bojenja. Unatoč navedenim izazovima, metoda je omogućila specifičnu detekciju transkripta H19, čime je potvrđena njezina primjenjivost za analizu lncRNA u srčanom valvularnom tkivu uz pažljivu optimizaciju protokola.

6. RASPRAVA

Kalcificirajuća aortalna stenoza (CAVS) jedan je od najčešćih uzroka valvularne bolesti i mortaliteta u starijoj populaciji, obilježena progresivnim fibro-kalcificirajućim remodeliranjem aortnog zaliska i kompleksnim međudjelovanjem mehaničkih, upalnih, imunoloških i epigenetskih čimbenika (1,6,23,31,39). Premda se CAVS dugo smatrala pasivnim degenerativnim procesom, danas je jasno da je riječ o aktivnoj biološkoj bolesti s izraženim upalno-proliferativnim signalnim putevima, staničnim transdiferencijacijama i značajnom epigenetskom regulacijom (11,39,206–212).

Rezultati ove studije potvrdili su poznate kliničke i ehokardiografske obrasce CAVS-a te pružili nova uvida u transkriptomski profil lncRNA u tkivu i perifernoj cirkulaciji, uključujući njihovu povezanost s prisutnošću i težinom bolesti.

6.1. Klinički i ehokardiografski profil CAVS-a u skladu je s poznatim obrascima progresije bolesti

Ehokardiografska obilježja ispitanika u ovoj studiji potvrdila su očekivana hemodinamska obilježja CAVS-a, uključujući značajan porast maksimalne brzine protoka (V_{max}), maksimalnog i srednjeg gradijenta tlaka (PG_{max} i PG_{mean}) te izraženo smanjenje površine aortnog ušća (AVA). Ovi nalazi u potpunosti su u skladu s aktualnim ESC/EACTS i ACC/AHA smjericama (111,118) te ranijim studijama o prirodnom tijeku CAVS-a (31,32,58).

Dodatno, bolesnici su pokazali klasični obrazac koncentrične hipertrofije lijeve klijetke, povišen LAVI, povećanu LV masu te povišene vrijednosti NT-proBNP-a, što je u skladu s dokazima da CAVS dovodi do progresivnog opterećenja tlakom i dijasboličke disfunkcije (104,139,140).

Usporedba blagih, umjerenih i teških stadija jasno je pokazala progresivno pogoršanje hemodinamike i strukture srca — ključni nalaz koji potvrđuje opservacijske studije poput COFRASA i PROGRESSA (71,74,75).

6.2. Patobiologija CAVS-a: uloga endotela, intersticijskih stanica i mekanobiologije

Patogeneza CAVS-a uključuje dva ključna stanična tipa: valvularne endotelne stanice (VEC) i valvularne intersticijske stanice (VIC).

VEC reagiraju na mehaničke sile i turbulentni protok pretvarajući se u pro-kalcifikacijske fenotipove (13,17), pri čemu je izvorna endotelna „zaštitna“ funkcija narušena (3,9,10).

VIC, dominantni stanični tip u zalisku, prolaze mijofibroblastnu i osteoplastnu diferencijaciju pod utjecajem TGF- β , oksidativnog stresa i poremećaja u signalizaciji NOTCH1 (8,14,16,39).

Dobiveni rezultati, uključujući povišenu tkivnu ekspresiju H19, RUNX1-IT1, UCA1 i MIAT, u skladu su s navedenim procesima. Ove lncRNA povezane su s proliferacijom, upalom, osteogenezom i ECM remodeliranjem — procesima ključnim za fibro-kalcifikacijski napredak CAVS-a (24,182,206–212).

6.3. Tkivni transkriptom lncRNA otkriva snažnu deregulaciju u CAVS-u

Analiza ekspresije lncRNA u tkivu aortalnog zaliska otkrila je veliki broj značajno promijenjenih transkripata. Povišena ekspresija MIAT, RUNX1-IT1, UCA1, H19, PACERR, AGAP2-AS1, CYTOR, ZEB1-AS1, HOTAIR, KLF3-AS1 i MEG3, te snižena ekspresija GAS5 i CASC15, potvrđuju aktivnu epigenetsku regulaciju unutar fibro-kalcificiranog mikrokoliša.

H19, čiji je signal potvrđen i in situ hibridizacijom, povezan je s NOTCH1 inaktivacijom i osteogenom transdiferencijacijom VIC-ova, što je temeljni mehanizam CAVS-a (212).

MIAT i UCA1, ranije opisane u kardiovaskularnom remodeliranju, pokazale su najjaču vezu s prisutnošću bolesti u našim regresijskim modelima, dok je GAS5, poznata po svojoj pro-apoptotskoj ulozi, dosljedno snižena, sugerirajući njen protektivni učinak (144,164).

Ovi nalazi nadopunjuju postojeće dokaze da je CAVS duboko epigenetski regulirana bolest, a lncRNA glavni modulatori celularne disfunkcije (206–209).

6.4. Plazmatske lncRNA ne odražavaju tkivnu ekspresiju niti stadij bolesti

Za razliku od nalaza u tkivu, većina plazmatskih lncRNA nije pokazala značajne razlike između CAVS bolesnika i kontrola. Jedini dosljedno promijenjeni transkript bila je GAS5, koja je bila snižena u plazmi.

Važan nalaz ove studije jest da:

- plazmatske lncRNA ne koreliraju s tkivnom ekspresijom
- ne prate stupanj CAVS-a
- često odražavaju sistemske, a ne lokalne procese (upala, metabolizam, stres)

Ovo je u skladu s dostupnim dokazima da je većina cirkulirajućih lncRNA slabo povezana s lokalnim valvularnim patomehanizmima (134,138), dok tkivni lncRNA profili precizno odražavaju epigenetsku aktivnost unutar zaliska (206–212).

6.5. Korelacijska analiza potvrđuje povezanost tkivnih lncRNA s hemodinamskom težinom CAVS-a

Najizraženije korelacije s kliničko-ehokardiografskim značajkama zabilježene su za:

TUG1 – snažno povezan s Vmax, PGmax i VTI

RUNX1-IT1 – negativna korelacija s AVA

UCA1 – povezanost s AVDI i remodelacijom

CYTOR, H19, HOTAIR – povezanosti s dijastoličkim funkcijama (E/A, IVRT)

Ovi rezultati potvrđuju da tkivni lncRNA transkriptom nije samo indikator prisutnosti bolesti, već i kvantitativni odraz njezine hemodinamske težine, što je nedavno predloženo u integrativnim studijama epigenoma CAVS-a (24,212).

6.6. Integracija nalaza: CAVS je epigenetski vođena bolest s lokalno specifičnim transkriptomom

Naši rezultati jasno pokazuju da je:

- tkivni transkriptom lncRNA snažno povezan s patobiologijom i težinom CAVS-a,
- cirkulirajući lncRNA profil nije pouzdan indikator bolesti,
- CAVS predstavlja lokaliziranu epigenetsku patologiju, a ne sistemsku bolest.

Ovo je u skladu s recentnim radovima koji opisuju CAVS kao rezultat „molekularnih petlji povratne sprege“ koje uključuju NOTCH1 inaktivaciju, TGF- β aktivaciju, inflamatorne signale, remodeliranje matriksa, osteogenezu i epigenetsku reprogramaciju VIC-ova (26,39,68,212).

6.7. Kliničke implikacije i translacijski potencijal lncRNA profila

6.7.1. Potencijal tkivnih lncRNA kao biomarkera

Naši nalazi ističu MIAT, RUNX1-IT1, UCA1 i GAS5 kao najrobusnije tkivne biomarkere prisutnosti CAVS-a, dok TUG1 predstavlja najbolji biomarker hemodinamske težine bolesti.

6.7.2. Terapijski potencijal lncRNA

lncRNA sve više ulaze u fokus terapijskog razvoja (206,221). Modulacija ekspresije određenih transkripata (npr. inhibicija H19, MIAT ili stimulacija GAS5) mogla bi postati novi terapijski pristup u budućnosti.

6.7.3. Plazma nije adekvatna zamjena za tkivo

Rezultati snažno ukazuju da cirkulirajuće lncRNA nisu klinički primjenjiv biomarker u CAVS-u — važan doprinos literaturi.

6.8. Ograničenja studije

U ograničenja studije ubrajaju se:

- relativno mali broj tkivnih uzoraka
- heterogenost kalcificiranog tkiva
- djelomična separacija podataka u modelima
- nemogućnost korekcije svih farmakoterapijskih čimbenika
- presječni dizajn bez longitudinalne procjene progresije

Usprkos tome, konzistentni nalazi u regresiji, korelacijama i ISH analizi znatno povećavaju snagu dokaza.

6.9. Opći zaključak

Ova studija potvrđuje da je CAVS snažno epigenetski regulirana bolest u kojoj lncRNA transkriptom u tkivu precizno odražava patofiziološke procese, dok cirkulirajući transkriptom u plazmi ne prati ni prisutnost ni težinu bolesti.

Identifikacija MIAT, RUNX1-IT1, UCA1 i GAS5 kao ključnih tkivnih biomarkera te TUG1 kao pokazatelja hemodinamske progresije predstavlja važan znanstveni doprinos i temelj za buduće translacijske i terapijske strategije.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju sveobuhvatne analize kliničkih, laboratorijskih, ehokardiografskih i molekularnih podataka dobivenih u ovoj studiji, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Kliničko-ehokardiografski profil CAVS bolesnika potvrđuje progresivno hemodinamsko i strukturno opterećenje srca

Bolesnici s kalcificiranom aortalnom stenozom (CAVS) pokazali su izražene razlike u hemodinamici aortalnog zaliska u odnosu na zdrave kontrole ($p < 0,001$), uključujući visoko povišene vrijednosti V_{max} , PG_{max} , PG_{mean} , uz značajno smanjenu AVA/AVA_I .

Ehokardiografski nalazi potvrdili su koncentričnu hipertrofiju lijeve klijetke, povećan LAVI te značajno povišen NT-proBNP, što zajedno odražava napredovalu valvularnu opstrukciju i posljedičnu kardijalnu remodelaciju.

Usporedba različitih stadija bolesti (blagi–umjereni–teški) potvrdila je jasno progresivan hemodinamski gradijent bolesti uz odgovarajući porast LV mase i indeksa naprezanja.

2. Tkivo kalcificiranog aortnog zaliska pokazuje široku i snažnu deregulaciju lncRNA transkripata

Analiza ekspresije u tkivu identificirala je izrazito povišene transkripte H19, UCA1, RUNX1-IT1, MIAT, PACERR, AGAP2-AS1, CYTOR, ZEB1-AS1, HOTAIR, KLF3-AS1 i MEG3, te snižene GAS5 i CASC15 u CAVS-u u odnosu na kontrole ($p < 0,05$).

Ovaj profil ukazuje na aktivaciju epigenetsko-proliferativnih i pro-upalnih signalnih mreža u fibro-kalcificiranom tkivu zaliska.

Volcano analiza dodatno je potvrdila dominantan „up-regulated“ transkripcijski obrazac, s tek nekoliko inhibiranih lncRNA (osobito GAS5 i CASC15).

ISH analiza validirala je robustnu tkivnu ekspresiju H19 u valvularnim intersticijskim stanicama.

3. Najvažniji tkivni prediktori CAVS-a su MIAT, RUNX1-IT1, UCA1 i GAS5

Univarijantni modeli pokazali su vrlo visoke OR-vrijednosti za više transkripata, ali su multivarijantni modeli identificirali MIAT, RUNX1-IT1 i UCA1 kao najstabilnije pozitivne prediktore prisutnosti CAVS-a, dok je GAS5 dosljedno pokazala protektivni učinak ($p < 0,05$).

Bootstrap analiza potvrdila je stabilnost ovih transkripata, čime se MIAT, RUNX1-IT1, UCA1 i GAS5 izdvajaju kao najpouzdaniji tkivni biomarkeri CAVS-a.

4. Ekspresija plazmatskih lncRNA znatno se razlikuje od tkivne ekspresije i ne odražava stupanj bolesti

Većina lncRNA nije pokazala statistički značajne razlike u plazmi između CAVS i kontrola.

Jedina značajno smanjena lncRNA u plazmi bila je GAS5 (0.50; $p=0.0015$).

Ključno zapažanje:

Plazmatske razine lncRNA ne koreliraju s tkivnom ekspresijom niti sa stupnjem CAVS-a, što ukazuje da cirkulirajuće lncRNA odražavaju sistemske imunološke, metaboličke i reparacijske procese, a ne primarno valvularnu patologiju.

5. Korelacijska analiza pokazuje da tkivne lncRNA snažno odražavaju morfologiju i hemodinamiku bolesti

Najčvršće korelacije s CAVS-om zabilježene su za:

MIAT, RUNX1-IT1, UCA1, PACERR, H19, AGAP2-AS1 ($\rho > 0.60$; $p < 0,001$).

Najjače poveznice s hemodinamskim parametrima bile su za:

TUG1 \leftrightarrow $V_{max}/PG_{max}/VTI$,

RUNX1-IT1 \leftrightarrow AVA,

UCA1 \leftrightarrow AVDI,

CYTOR \leftrightarrow E/A i IVRT,

PACERR / H19 / MEG3 \leftrightarrow LV morfologija.

Ovi nalazi pokazuju da je tkivni transkriptom lncRNA izravno povezan s kliničko-ehokardiografskim fenotipom bolesti, i može služiti kao biološka osnova za klasifikaciju težine CAVS-a.

6. U zdravim kontrolnim zaliscima lncRNA pokazuju snažnu ko-regulaciju, ali ne i veze s kliničkim parametrima

U kontrolnim uzorcima tkiva uočene su izrazite pozitivne međusobne korelacije između više transkripata (AGAP2-AS1 ↔ H19, PACERR ↔ ROR, JADE1 ↔ ZEB1-AS1), što upućuje na stabilnu fiziološku ko-regulaciju.

Nisu pronađene čvrste povezanosti s laboratorijskim ili ehokardiografskim pokazateljima, što naglašava fiziološku homeostazu tkiva.

7. Biološka interpretacija: CAVS je obilježen aktivacijom lncRNA mreža i razlikom između lokalnog i sistemskog transkriptoma

Kumulativni podaci ukazuju da:

Tkivni CAVS transkriptom je bogat, intenzivno deregularan i snažno povezan s progresijom bolesti.

Plazmatski lncRNA profil je slabije informativan i ne odražava stupanj bolesti.

Ove razlike ukazuju na lokalnu specifičnost patofizioloških mehanizama i na to da je većina lncRNA „zatvorena“ unutar fibro-kalcificiranog valvularnog mikrokruženja.

8. Glavni zaključak studije

CAVS je karakteriziran širokom i koordiniranom deregulacijom tkivnih lncRNA transkripata koji odražavaju fibro-kalcificirane, upalne i epigenetske procese unutar aortnog zaliska, dok cirkulirajuće lncRNA u plazmi ne odražavaju pouzdano stupanj bolesti.

Najvažniji tkivni biomarkeri prisutnosti bolesti su MIAT, RUNX1-IT1, UCA1 i GAS5, dok TUG1 najjače korelira s hemodinamskom težinom stenoze.

Rezultati podržavaju koncept da je tkivni lncRNA potpis specifičan i biološki relevantan pokazatelj valvularne patologije, dok plazma odražava više sistemske nego lokalne procese.

8. LITERATURA

1. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. 2003;24(13):1231–43.
2. Thaden JJ, Nkomo VT, Enriquez-Sarano M. The global burden of aortic stenosis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;56(6):565–71.
3. Yutzey KE, Demer LL, Body SC, Huggins GS, Towler DA, Giachelli CM, et al. Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(11):2387–93.
4. Gošev I, Zeljko M, Đurić Ž, Nikolić I, Gošev M, Ivčević S, et al. Epigenome alterations in aortic valve stenosis and its related left ventricular hypertrophy. *Clin Epigenetics*. 2017;9:106.
5. Osnabrugge RL, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, et al. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(11):1002–12.
6. Goldberg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(13):1205–13.
7. Yi B, Zeng W, Lv L, Hua P. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(9):12710–32.
8. Iung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(3):162–72.
9. Gohlke-Bärwolf C, Minners J, Jander N, Gerds E, Wachtell K, Ray S, et al. Natural history of mild and of moderate aortic stenosis-new insights from a large prospective European study. *Curr Probl Cardiol*. 2013;38(9):365–409.
10. Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med*. 2014;371(8):744–56.

11. Sathyamurthy I, Alex S. Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis? *Indian Heart J.* 2015;67(5):503–6.
12. Pawade TA, Newby DE, Dweck MR. Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(5):561–77.
13. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res.* 2011;108(11):1392–412.
14. Towler DA. Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circ Res.* 2013;113(2):198–208.
15. Li C, Xu S, Gotlieb AI. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(1):1–8.
16. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(4-5):242–68.
17. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1407–18.
18. Rattazzi M, Pauletto P. Valvular endothelial cells: guardians or destroyers of aortic valve integrity? *Atherosclerosis.* 2015;242(2):396–8.
19. Gössl M, Khosla S, Zhang X, Higano N, Jordan KL, Loeffler D, et al. Role of circulating osteogenic progenitor cells in calcific aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(19):1945–53.
20. Chen JH, Yip CY, Sone ED, Simmons CA. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol.* 2009;174(3):1109–19.
21. Coffey S, Cox B, Williams MJ. The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(25 Pt A):2852–61.
22. Pasipoularides A. Calcific Aortic Valve Disease: Part 1--Molecular Pathogenetic Aspects, Hemodynamics, and Adaptive Feedbacks. *J Cardiovasc Transl Res.* 2016;9(2):102–18.

23. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(22):2438–88.
24. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16006.
25. Yurek LA, Jakub KE, Menacho MM. Severe Symptomatic Aortic Stenosis in Older Adults: Pathophysiology, Clinical Manifestations, Treatment Guidelines, and Transcatheter Aortic Valve Replacement (TAVR). *J Gerontol Nurs*. 2015;41(6):8–13.
26. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):10–3.
27. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. *Science*. 2010;330(6004):612–6.
28. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(4):596–612.
29. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12(12):861–74.
30. Zink LM, Hake SB. Histone variants: nuclear function and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2016;37:82–9.
31. Rizki G, Boyer LA. Lncing epigenetic control of transcription to cardiovascular development and disease. *Circ Res*. 2015;117(2):192–206.
32. Narlikar GJ, Sundaramoorthy R, Owen-Hughes T. Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell*. 2013;154(3):490–503.
33. Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(5):384–400.
34. Murr R. Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet*. 2010;70:101–41.
35. Winter S, Fischle W. Epigenetic markers and their cross-talk. *Essays Biochem*. 2010;48(1):45–61.

36. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet.* 2016;17(1):47–62.
37. Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(2):96–118.
38. Grote P, Herrmann BG. Long noncoding RNAs in organogenesis: making the difference. *Trends Genet.* 2015;31(6):329–35.
39. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell.* 2011;43(6):904–14.
40. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012;22(9):1775–89.
41. Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:145–66.
42. Jaé N, Heumüller AW, Fouani Y, Dimmeler S. Long non-coding RNAs in vascular biology and disease. *Vascul Pharmacol.* 2019;114:13–22.
43. Shen S, Jiang H, Bei Y, Xiao J, Li X. Long Non-Coding RNAs in Cardiac Remodeling. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(5):1830–7.
44. Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res.* 2017;77(15):3965–81.
45. Camacho CV, Choudhari R, Gadad SS. Long noncoding RNAs and cancer, an overview. *Steroids.* 2018;133:93–5.
46. Brandt A, Kopp F. Long Noncoding RNAs in Diet-Induced Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2024;25(11).
47. Kopp F. Molecular functions and biological roles of long non-coding RNAs in human physiology and disease. *J Gene Med.* 2019;21(8):e3104.
48. Shen Y, Li J, Zhao Z, Chen X. Progress on long non-coding RNAs in calcific aortic valve disease. *Front Cardiovasc Med.* 2025;12:1522544.

49. Ni WJ, Wu YZ, Ma DH, Leng XM. Noncoding RNAs in Calcific Aortic Valve Disease: A Review of Recent Studies. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2018;71(5):317–23.
50. Gupta SK, Kumari S, Singh S, Barthwal MK, Singh SK, Thum T. Non-coding RNAs: Regulators of valvular calcification. *J Mol Cell Cardiol*. 2020;142:14–23.
51. Zheng Y, Wen S, Jiang S, He S, Qiao W, Liu Y, et al. CircRNA/lncRNA-miRNA-mRNA network and gene landscape in calcific aortic valve disease. *BMC Genomics*. 2023;24(1):419.
52. Chen L, Wei K, Li J, Li Y, Cao H, Zheng Z. Integrated Analysis of LncRNA-Mediated ceRNA Network in Calcific Aortic Valve Disease. *Cells*. 2022;11(14).
53. Cook-Calvete A, Moreta S, Delgado-Marin M, Fernandez-Rodriguez B, Zaragoza C, Saura M. Integrated biomarker landscape for the early detection and management of calcific aortic valve disease. *Eur J Clin Invest*. 2025:e70147.
54. Song L, Wang Y, Feng Y, Peng H, Wang C, Duan J, et al. Bioinformatics-Based Identification of CircRNA-MicroRNA-mRNA Network for Calcific Aortic Valve Disease. *Genet Res (Camb)*. 2023;2023:8194338.
55. Hosen DR. Aortic valve stenosis augments long noncoding RNA H19 to govern angiogenic responses and phenotypes of valvular endothelial cell through endothelial to mesenchymal transition. *European Heart Journal*. 2025;46(Supplement_1).
56. Sivan S, Vijayakumar G, Pillai IC. Non-coding RNAs mediating the regulation of genes and signaling pathways in aortic valve calcification. *Gene*. 2025;936:149117.
57. Carrion K, Dyo J, Patel V, Sasik R, Mohamed SA, Hardiman G, et al. The long non-coding HOTAIR is modulated by cyclic stretch and WNT/ β -CATENIN in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes. *PLoS One*. 2014;9(5):e96577.
58. Loganathan T, Doss CG. Non-coding RNAs in human health and disease: potential function as biomarkers and therapeutic targets. *Funct Integr Genomics*. 2023;23(1):33.
59. Poller W, Dimmeler S, Heymans S, Zeller T, Haas J, Karakas M, et al. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *Eur Heart J*. 2018;39(29):2704–16.

60. O'Donnell A, Yutzey KE. Mechanisms of heart valve development and disease. *Development*. 2020;147(13).
61. Wal P, Rathore S, Aziz N, Singh YK, Gupta A. Aortic stenosis: a review on acquired pathogenesis and ominous combination with diabetes mellitus. *Egypt Heart J*. 2023;75(1):26.
62. Leask RL, Jain N, Butany J. Endothelium and valvular diseases of the heart. *Microsc Res Tech*. 2003;60(2):129–37.
63. Verhemel S, Nuis RJ, van den Dorpel M, Adrichem R, de Sá Marchi MF, Hirsch A, et al. Computed tomography to predict pacemaker need after transcatheter aortic valve replacement. *J Cardiovasc Comput Tomogr*. 2024;18(6):597–608.
64. Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:161–83.
65. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation*. 2008;118(18):1864–80.
66. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stensløkken KO, et al. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(9).
67. Mongkoldhumrongkul N, Yacoub MH, Chester AH. Valve Endothelial Cells - Not Just Any Old Endothelial Cells. *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;14(2):146–54.
68. Blancas AA, Balaoing LR, Acosta FM, Grande-Allen KJ. Identifying Behavioral Phenotypes and Heterogeneity in Heart Valve Surface Endothelium. *Cells Tissues Organs*. 2016;201(4):268–76.
69. Driscoll K, Cruz AD, Butcher JT. Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease. *Circ Res*. 2021;128(9):1344–70.
70. Tao G, Kotick JD, Lincoln J. Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells. *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:203–32.
71. Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362(1484):1445–57.

72. Hjortnaes J, Shapero K, Goettsch C, Hutcheson JD, Keegan J, Kluin J, et al. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2015;242(1):251–60.
73. Theodoropoulou T, Mourouzis I, Katsaouni A, Pantos C, Tsioufis K, Toutouzas K. Valvular interstitial cells as a novel therapeutic target for preventing calcific aortic valve disease. *Eur J Pharmacol*. 2025;1003:177985.
74. Deb N, Lacerda CMR. Valvular Endothelial Cell Response to the Mechanical Environment-A Review. *Cell Biochem Biophys*. 2021;79(4):695–709.
75. Boskovski MT, Gleason TG. Current Therapeutic Options in Aortic Stenosis. *Circ Res*. 2021;128(9):1398–417.
76. Grbac AJ, Lee MGY, Chye D, Zhou JY, Batchelor RJ, Steinfert MLE, et al. Management of asymptomatic severe aortic stenosis: A critical review of guidelines and clinical outcomes. *Am Heart J*. 2025;288:28–40.
77. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*. 2006;368(9540):1005–11.
78. Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Ovcharenko EA, Kutikhin AG. Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials? *J Mol Cell Cardiol*. 2019;132:189–209.
79. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Gentile F, et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(4):e25–e197.
80. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005;111(24):3316–26.
81. Gharacholou SM, Karon BL, Shub C, Pellikka PA. Aortic valve sclerosis and clinical outcomes: moving toward a definition. *Am J Med*. 2011;124(2):103–10.

82. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(3):630–4.
83. Ngo DT, Sverdlov AL, Willoughby SR, Nightingale AK, Chirkov YY, McNeil JJ, et al. Determinants of occurrence of aortic sclerosis in an aging population. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2009;2(8):919–27.
84. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med.* 1999;341(3):142–7.
85. Aronow WS, Ahn C, Shirani J, Kronzon I. Comparison of frequency of new coronary events in older subjects with and without valvular aortic sclerosis. *Am J Cardiol.* 1999;83(4):599–600, a8.
86. Büttner P, Feistner L, Lurz P, Thiele H, Hutcheson JD, Schlotter F. Dissecting Calcific Aortic Valve Disease-The Role, Etiology, and Drivers of Valvular Fibrosis. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:660797.
87. Aggarwal A, Ferrari G, Joyce E, Daniels MJ, Sainger R, Gorman JH, 3rd, et al. Architectural trends in the human normal and bicuspid aortic valve leaflet and its relevance to valve disease. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(5):986–98.
88. Moncla LM, Briend M, Bossé Y, Mathieu P. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(8):546–59.
89. Masri A, Svensson LG, Griffin BP, Desai MY. Contemporary natural history of bicuspid aortic valve disease: a systematic review. *Heart.* 2017;103(17):1323–30.
90. Mordi I, Tzemos N. Bicuspid aortic valve disease: a comprehensive review. *Cardiol Res Pract.* 2012;2012:196037.
91. Mathieu P, Bossé Y, Huggins GS, Della Corte A, Pibarot P, Michelena HI, et al. The pathology and pathobiology of bicuspid aortic valve: State of the art and novel research perspectives. *J Pathol Clin Res.* 2015;1(4):195–206.
92. Ward C. Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart.* 2000;83(1):81–5.

93. Kim K, Kim DY, Seo J, Cho I, Hong GR, Ha JW, et al. Temporal Trends in Diagnosis, Treatments, and Outcomes in Patients With Bicuspid Aortic Valve. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:766430.
94. Passik CS, Ackermann DM, Pluth JR, Edwards WD. Temporal changes in the causes of aortic stenosis: a surgical pathologic study of 646 cases. *Mayo Clin Proc.* 1987;62(2):119–23.
95. Anwar AM, Alshawkani HH, Albakri I, Almatrafi SJ. Congenital unicuspid aortic valve in adults: Minireview and case series. *Ann Pediatr Cardiol.* 2024;17(4):243–9.
96. Gulyasy B, López-Candales A, Reis SE, Levitsky S. Quadricuspid aortic valve: an unusual echocardiographic finding and a review of the literature. *Int J Cardiol.* 2009;132(2):e68–71.
97. Saith S, Saith S, Murthy A. Quadricuspid Aortic Valve: An Introduction for Clinicians. *Cardiol Res.* 2022;13(1):2–10.
98. Saito Y, Takaoka H, Funabashi N, Ozawa K, Tamura Y, Saito M, et al. A case of very severe aortic stenosis due to unicuspid aortic valve mimicking bicuspid aortic valve with calcification on cardiac computed tomography. *Int J Cardiol.* 2016;215:516–8.
99. Konstantinov IE, Moscoso B, Ishigami S, Zubritskiy A, Marliau R. Aortic valve repair in a low-birth-weight neonate with poor ventricular function: staged tricuspization of the unicuspid valve. *Multimed Man Cardiothorac Surg.* 2023;2023.
100. Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K. Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves. *Am J Cardiol.* 1993;71(4):322–7.
101. Iribarren AC, AlBadri A, Wei J, Nelson MD, Li D, Makkar R, et al. Sex differences in aortic stenosis: Identification of knowledge gaps for sex-specific personalized medicine. *Am Heart J Plus.* 2022;21.
102. Ferreira-González I, Pinar-Sopena J, Ribera A, Marsal JR, Cascant P, González-Alujas T, et al. Prevalence of calcific aortic valve disease in the elderly and associated risk factors: a population-based study in a Mediterranean area. *Eur J Prev Cardiol.* 2013;20(6):1022–30.

103. Novaro GM, Katz R, Aviles RJ, Gottdiener JS, Cushman M, Psaty BM, et al. Clinical factors, but not C-reactive protein, predict progression of calcific aortic-valve disease: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(20):1992–8.
104. Kamath AR, Pai RG. Risk factors for progression of calcific aortic stenosis and potential therapeutic targets. *Int J Angiol*. 2008;17(2):63–70.
105. Eveborn GW, Schirmer H, Lunde P, Heggelund G, Hansen JB, Rasmussen K. Assessment of risk factors for developing incident aortic stenosis: the Tromsø Study. *Eur J Epidemiol*. 2014;29(8):567–75.
106. Huang N, Zhuang Z, Liu Z, Huang T. Observational and Genetic Associations of Modifiable Risk Factors with Aortic Valve Stenosis: A Prospective Cohort Study of 0.5 Million Participants. *Nutrients*. 2022;14(11).
107. Pan W, Zhou L, Han R, Du X, Chen W, Jiang T. Causal associations between kidney function and aortic valve stenosis: a bidirectional Mendelian randomization analysis. *Ren Fail*. 2024;46(2):2417742.
108. Schnitzler JG, Ali L, Groenen AG, Kaiser Y, Kroon J. Lipoprotein(a) as Orchestrator of Calcific Aortic Valve Stenosis. *Biomolecules*. 2019;9(12).
109. Youssef A, Clark JR, Koschinsky ML, Boffa MB. Lipoprotein(a): Expanding our knowledge of aortic valve narrowing. *Trends Cardiovasc Med*. 2021;31(5):305–11.
110. O'Brien KD. Epidemiology and genetics of calcific aortic valve disease. *J Investig Med*. 2007;55(6):284–91.
111. Rajamannan NM. Calcific aortic stenosis: lessons learned from experimental and clinical studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(2):162–8.
112. Linefsky JP, O'Brien KD, Sachs M, Katz R, Eng J, Michos ED, et al. Serum phosphate is associated with aortic valve calcification in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 2014;233(2):331–7.
113. Bortnick AE, Xu S, Kim RS, Kestenbaum B, Ix JH, Jenny NS, et al. Biomarkers of mineral metabolism and progression of aortic valve and mitral annular calcification: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2019;285:79–86.

114. Hekimian G, Boutten A, Flamant M, Duval X, Dehoux M, Benessiano J, et al. Progression of aortic valve stenosis is associated with bone remodelling and secondary hyperparathyroidism in elderly patients--the COFRASA study. *Eur Heart J*. 2013;34(25):1915–22.
115. Rattazzi M, Bertacco E, Del Vecchio A, Puato M, Faggin E, Pauletto P. Aortic valve calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(12):2968–76.
116. Capoulade R, Mahmut A, Tastet L, Arsenault M, Bédard É, Dumesnil JG, et al. Impact of plasma Lp-PLA2 activity on the progression of aortic stenosis: the PROGRESSA study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015;8(1):26–33.
117. Tastet L, Capoulade R, Shen M, Clavel MA, Côté N, Mathieu P, et al. ApoB/ApoA-I Ratio is Associated With Faster Hemodynamic Progression of Aortic Stenosis: Results From the PROGRESSA (Metabolic Determinants of the Progression of Aortic Stenosis) Study. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(4).
118. Capoulade R, Chan KL, Yeang C, Mathieu P, Bossé Y, Dumesnil JG, et al. Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(11):1236–46.
119. Capoulade R, Yeang C, Chan KL, Pibarot P, Tsimikas S. Association of Mild to Moderate Aortic Valve Stenosis Progression With Higher Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipid Levels: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*. 2018;3(12):1212–7.
120. Shen M, Tastet L, Capoulade R, Bédard É, Arsenault M, Clavel MA, et al. Determinants of Aortic Stenosis Progression in Bicuspid and Tricuspid Aortic Valves. *CJC Pediatr Congenit Heart Dis*. 2022;1(4):184–92.
121. Ueland T, Gullestad L, Dahl CP, Aukrust P, Aakhus S, Solberg OG, et al. Undercarboxylated matrix Gla protein is associated with indices of heart failure and mortality in symptomatic aortic stenosis. *J Intern Med*. 2010;268(5):483–92.
122. Ortlepp JR, Pillich M, Schmitz F, Mevissen V, Koos R, Weiss S, et al. Lower serum calcium levels are associated with greater calcium hydroxyapatite deposition in native aortic valves of male patients with severe calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis*. 2006;15(4):502–8.

123. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437(7056):270–4.
124. Garg V. Molecular genetics of aortic valve disease. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21(3):180–4.
125. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmi AW, Hagemann C, Wrobel S, et al. Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(4):1460–5.
126. Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Skowasch D, Schild H, Bauriedel G. p21WAF1/CIP1 and 14-3-3 sigma gene expression in degenerated aortic valves: a link between cell cycle checkpoints and calcification. *Amino Acids*. 2006;31(3):309–16.
127. Ortlepp JR, Hoffmann R, Ohme F, Lauscher J, Bleckmann F, Hanrath P. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart*. 2001;85(6):635–8.
128. Kutikhin AG, Yuzhalin AE, Brusina EB, Ponasenkov AV, Golovkin AS, Barbarash OL. Genetic predisposition to calcific aortic stenosis and mitral annular calcification. *Mol Biol Rep*. 2014;41(9):5645–63.
129. An Y, Wang YT, Ma YT, Wulasihan M, Huang Y, Adi D, et al. IL-10 genetic polymorphisms were associated with valvular calcification in Han, Uygur and Kazak populations in Xinjiang, China. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128965.
130. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013;368(6):503–12.
131. Perrot N, Thériault S, Dina C, Chen HY, Boekholdt SM, Rigade S, et al. Genetic Variation in LPA, Calcific Aortic Valve Stenosis in Patients Undergoing Cardiac Surgery, and Familial Risk of Aortic Valve Microcalcification. *JAMA Cardiol*. 2019;4(7):620–7.
132. Perrot N, Thériault S, Rigade S, Chen HY, Dina C, Martinsson A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, genetics and calcific aortic valve stenosis in humans. *Heart*. 2020;106(18):1407–12.

133. Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, Sprecher DL, Griffin BP. Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. *Circulation*. 2003;108(15):1804–8.
134. Ortlepp JR, Pillich M, Mevissen V, Krantz C, Kimmel M, Autschbach R, et al. APOE alleles are not associated with calcific aortic stenosis. *Heart*. 2006;92(10):1463–6.
135. Anger T, Ekici AB, Daniel WG, Garlachs CD. [Gene polymorphisms leading to calcified and stenotic aortic valves]. *Herz*. 2006;31(7):635–43.
136. Ortlepp JR, Schmitz F, Mevissen V, Weiss S, Huster J, Dronskowski R, et al. The amount of calcium-deficient hexagonal hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis. *Eur Heart J*. 2004;25(6):514–22.
137. Avakian SD, Annicchino-Bizzacchi JM, Grinberg M, Ramires JA, Mansura AP. Apolipoproteins AI, B, and E polymorphisms in severe aortic valve stenosis. *Clin Genet*. 2001;60(5):381–4.
138. Wang YT, Li Y, Ma YT, Yang YN, Ma X, Li XM, et al. Association between apolipoprotein B genetic polymorphism and the risk of calcific aortic stenosis in Chinese subjects, in Xinjiang, China. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):40.
139. Nordström P, Glader CA, Dahlén G, Birgander LS, Lorentzon R, Waldenström A, et al. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women. *J Intern Med*. 2003;254(2):140–6.
140. Schmitz F, Ewering S, Zerres K, Klomfass S, Hoffmann R, Ortlepp JR. Parathyroid hormone gene variant and calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis*. 2009;18(3):262–7.
141. Dorn GW, 2nd. Shared genetic risk for sclerosis of valves and vessels. *N Engl J Med*. 2013;368(6):569–70.
142. Thanassoulis G. Lipoprotein (a) in calcific aortic valve disease: from genomics to novel drug target for aortic stenosis. *J Lipid Res*. 2016;57(6):917–24.
143. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dubé MP, Rhéaume E, Wareham NJ, Khaw KT, et al. Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(3):304–10.

144. Gaudreault N, Ducharme V, Lamontagne M, Guauque-Olarte S, Mathieu P, Pibarot P, et al. Replication of genetic association studies in aortic stenosis in adults. *Am J Cardiol.* 2011;108(9):1305–10.
145. Thériault S, Gaudreault N, Lamontagne M, Rosa M, Boulanger MC, Messika-Zeitoun D, et al. A transcriptome-wide association study identifies PALMD as a susceptibility gene for calcific aortic valve stenosis. *Nat Commun.* 2018;9(1):988.
146. Smith JG, Luk K, Schulz CA, Engert JC, Do R, Hindy G, et al. Association of low-density lipoprotein cholesterol-related genetic variants with aortic valve calcium and incident aortic stenosis. *Jama.* 2014;312(17):1764–71.
147. Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. *Lancet.* 2009;373(9667):956–66.
148. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;42(4):S1–44.
149. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;42(4):S1–44.
150. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2022;75(6):524.
151. Inanc IH, Cilingiroglu M, Iliescu C, V NI, Matar F, Ates I, et al. Comparison of American and European Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. *Cardiovasc Revasc Med.* 2023;47:76–85.
152. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Edvardsen T, Goldstein S, et al. Recommendations on the Echocardiographic Assessment of Aortic Valve Stenosis: A Focused

Update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2017;30(4):372–92.

153. Baumgartner HC, Hung JC-C, Bermejo J, Chambers JB, Edvardsen T, Goldstein S, et al. Recommendations on the echocardiographic assessment of aortic valve stenosis: a focused update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2017;18(3):254–75.

154. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2022;75(6):524.

155. Lancellotti P, Davin L, Dulgheru R. Aortic Stenosis Grading and Outcome: New Categories, New Therapeutic Challenges. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2016;9(11):1264–6.

156. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J.* 2022;43(7):561–632.

157. Rana M. Aortic Valve Stenosis: Diagnostic Approaches and Recommendations of the 2021 ESC/EACTS Guidelines for the Management of Valvular Heart Disease -A Review of the Literature. *Cardiol Cardiovasc Med.* 2022;6(3):315–24.

158. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, et al. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *Eur J Echocardiogr.* 2009;10(1):1–25.

159. Kanwar A, Thaden JJ, Nkomo VT. Management of Patients With Aortic Valve Stenosis. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(4):488–508.

160. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J.* 2017;38(36):2739–91.

161. Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, et al. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2000;343(9):611–7.

162. Otto CM. Timing of aortic valve surgery. *Heart*. 2000;84(2):211–8.
163. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1343–56.
164. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation*. 2010;121(2):306–14.
165. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2005;352(23):2389–97.
166. van der Linde D, Yap SC, van Dijk AP, Budts W, Pieper PG, van der Burgh PH, et al. Effects of rosuvastatin on progression of stenosis in adult patients with congenital aortic stenosis (PROCAS Trial). *Am J Cardiol*. 2011;108(2):265–71.
167. Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, Carpenter S, Chang HY, Chen LL, et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2023;24(6):430–47.
168. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*. 2007;316(5830):1484–8.
169. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet*. 2014;15(1):7–21.
170. Sharma A, Singh NK. Long Non-Coding RNAs and Proliferative Retinal Diseases. *Pharmaceutics*. 2023;15(5).
171. Chodurska B, Kunej T. Long non-coding RNAs in humans: Classification, genomic organization and function. *Noncoding RNA Res*. 2025;11:313–27.
172. Chang CP, Han P. Epigenetic and lncRNA regulation of cardiac pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(7 Pt B):1767–71.

173. Wang Z, Zhang XJ, Ji YX, Zhang P, Deng KQ, Gong J, et al. The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2016;22(10):1131–9.
174. Viereck J, Thum T. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circ Res.* 2017;120(2):381–99.
175. de Gonzalo-Calvo D, Kenneweg F, Bang C, Toro R, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, et al. Circulating long-non coding RNAs as biomarkers of left ventricular diastolic function and remodelling in patients with well-controlled type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2016;6:37354.
176. Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res.* 2014;114(10):1569–75.
177. Xuan L, Sun L, Zhang Y, Huang Y, Hou Y, Li Q, et al. Circulating long non-coding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure. *J Cell Mol Med.* 2017;21(9):1803–14.
178. de Gonzalo-Calvo D, Veá A, Bär C, Fiedler J, Couch LS, Brotons C, et al. Circulating non-coding RNAs in biomarker-guided cardiovascular therapy: a novel tool for personalized medicine? *Eur Heart J.* 2019;40(20):1643–50.
179. Ibrahim NE, Januzzi JL, Jr. Established and Emerging Roles of Biomarkers in Heart Failure. *Circ Res.* 2018;123(5):614–29.
180. Meijers WC, Bayes-Genis A, Mebazaa A, Bauersachs J, Cleland JGF, Coats AJS, et al. Circulating heart failure biomarkers beyond natriuretic peptides: review from the Biomarker Study Group of the Heart Failure Association (HFA), European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail.* 2021;23(10):1610–32.
181. Wang Y, Sun X. The functions of LncRNA in the heart. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;168:108249.
182. Boeckel JN, Perret MF, Glaser SF, Seeger T, Heumüller AW, Chen W, et al. Identification and regulation of the long non-coding RNA Heat2 in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;126:13–22.

183. Boros J, Arnoult N, Stroobant V, Collet JF, Decottignies A. Polycomb repressive complex 2 and H3K27me3 cooperate with H3K9 methylation to maintain heterochromatin protein 1 α at chromatin. *Mol Cell Biol*. 2014;34(19):3662–74.
184. Deng H, Ouyang W, Zhang L, Xiao X, Huang Z, Zhu W. LncRNA GASL1 is downregulated in chronic heart failure and regulates cardiomyocyte apoptosis. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24:41.
185. Zhang Y, Sun L, Xuan L, Pan Z, Hu X, Liu H, et al. Long non-coding RNA CCRR controls cardiac conduction via regulating intercellular coupling. *Nat Commun*. 2018;9(1):4176.
186. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014;129(8):837–47.
187. Mei B, Liu H, Yang S, Liang MY, Yue Y, Huang SQ, et al. Long non-coding RNA expression profile in permanent atrial fibrillation patients with rheumatic heart disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(20):6940–7.
188. Shen C, Kong B, Liu Y, Xiong L, Shuai W, Wang G, et al. YY1-induced upregulation of lncRNA KCNQ1OT1 regulates angiotensin II-induced atrial fibrillation by modulating miR-384b/CACNA1C axis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;505(1):134–40.
189. Qu X, Du Y, Shu Y, Gao M, Sun F, Luo S, et al. MIAT Is a Pro-fibrotic Long Non-coding RNA Governing Cardiac Fibrosis in Post-infarct Myocardium. *Sci Rep*. 2017;7:42657.
190. Huang ZP, Ding Y, Chen J, Wu G, Kataoka M, Hu Y, et al. Long non-coding RNAs link extracellular matrix gene expression to ischemic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2016;112(2):543–54.
191. Li Z, Wang X, Wang W, Du J, Wei J, Zhang Y, et al. Altered long non-coding RNA expression profile in rabbit atria with atrial fibrillation: TCONS_00075467 modulates atrial electrical remodeling by sponging miR-328 to regulate CACNA1C. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;108:73–85.
192. Calò L, Rebecchi M, Sciarra L, De Luca L, Fagagnini A, Zuccaro LM, et al. Catheter ablation of right atrial ganglionated plexi in patients with vagal paroxysmal atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5(1):22–31.

193. Wang W, Wang X, Zhang Y, Li Z, Xie X, Wang J, et al. Transcriptome analysis of canine cardiac fat pads: involvement of two novel long non-coding RNAs in atrial fibrillation neural remodeling. *J Cell Biochem.* 2015;116(5):809–21.
194. Yari M, Bitarafan S, Broumand MA, Fazeli Z, Rahimi M, Ghaderian SMH, et al. Association between Long Noncoding RNA ANRIL Expression Variants and Susceptibility to Coronary Artery Disease. *Int J Mol Cell Med.* 2018;7(1):1–7.
195. Zhang J, Gao C, Meng M, Tang H. Long Noncoding RNA MHRT Protects Cardiomyocytes against H₂O₂-Induced Apoptosis. *Biomol Ther (Seoul).* 2016;24(1):19–24.
196. Zhang N, Meng X, Mei L, Hu J, Zhao C, Chen W. The Long Non-Coding RNA SNHG1 Attenuates Cell Apoptosis by Regulating miR-195 and BCL2-Like Protein 2 in Human Cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(3):1029–40.
197. Luo H, Wang J, Liu D, Zang S, Ma N, Zhao L, et al. The lncRNA H19/miR-675 axis regulates myocardial ischemic and reperfusion injury by targeting PPAR α . *Mol Immunol.* 2019;105:46–54.
198. Zhang Z, Gao W, Long QQ, Zhang J, Li YF, Liu DC, et al. Increased plasma levels of lncRNA H19 and LIPCAR are associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Sci Rep.* 2017;7(1):7491.
199. Yan Y, Zhang B, Liu N, Qi C, Xiao Y, Tian X, et al. Circulating Long Noncoding RNA UCA1 as a Novel Biomarker of Acute Myocardial Infarction. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8079372.
200. Wu H, Zhao ZA, Liu J, Hao K, Yu Y, Han X, et al. Long noncoding RNA Meg3 regulates cardiomyocyte apoptosis in myocardial infarction. *Gene Ther.* 2018;25(8):511–23.
201. Wang X, Yong C, Yu K, Yu R, Zhang R, Yu L, et al. Long Noncoding RNA (lncRNA) n379519 Promotes Cardiac Fibrosis in Post-Infarct Myocardium by Targeting miR-30. *Med Sci Monit.* 2018;24:3958–65.
202. Zhang J, Yu L, Xu Y, Liu Y, Li Z, Xue X, et al. Long noncoding RNA upregulated in hypothermia treated cardiomyocytes protects against myocardial infarction through improving mitochondrial function. *Int J Cardiol.* 2018;266:213–7.

203. Shu L, Zhang W, Huang C, Huang G, Su G, Xu J. lncRNA ANRIL protects H9c2 cells against hypoxia-induced injury through targeting the miR-7-5p/SIRT1 axis. *J Cell Physiol.* 2020;235(2):1175–83.
204. Du J, Yang ST, Liu J, Zhang KX, Leng JY. Silence of LncRNA GAS5 Protects Cardiomyocytes H9c2 against Hypoxic Injury via Sponging miR-142-5p. *Mol Cells.* 2019;42(5):397–405.
205. Sun F, Zhuang Y, Zhu H, Wu H, Li D, Zhan L, et al. LncRNA PCFL promotes cardiac fibrosis via miR-378/GRB2 pathway following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;133:188–98.
206. Huang S, Tao W, Guo Z, Cao J, Huang X. Suppression of long noncoding RNA TTTY15 attenuates hypoxia-induced cardiomyocytes injury by targeting miR-455-5p. *Gene.* 2019;701:1–8.
207. Chen J, Hu Q, Zhang BF, Liu XP, Yang S, Jiang H. Long noncoding RNA UCA1 inhibits ischaemia/reperfusion injury induced cardiomyocytes apoptosis via suppression of endoplasmic reticulum stress. *Genes Genomics.* 2019;41(7):803–10.
208. Zangrando J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, et al. Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction. *BMC Genomics.* 2014;15(1):460.
209. Tu G, Zou L, Liu S, Wu B, Lv Q, Wang S, et al. Long noncoding NONRATT021972 siRNA normalized abnormal sympathetic activity mediated by the upregulation of P2X7 receptor in superior cervical ganglia after myocardial ischemia. *Purinergic Signal.* 2016;12(3):521–35.
210. Zou L, Tu G, Xie W, Wen S, Xie Q, Liu S, et al. LncRNA NONRATT021972 involved the pathophysiologic processes mediated by P2X7 receptors in stellate ganglia after myocardial ischemic injury. *Purinergic Signal.* 2016;12(1):127–37.
211. Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circ Res.* 2014;115(7):668–77.
212. Gao L, Liu Y, Guo S, Yao R, Wu L, Xiao L, et al. Circulating Long Noncoding RNA HOTAIR is an Essential Mediator of Acute Myocardial Infarction. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(4):1497–508.

213. Boon RA, Jaé N, Holdt L, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(10):1214–26.
214. Li X, Wang H, Yao B, Xu W, Chen J, Zhou X. lncRNA H19/miR-675 axis regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting VDAC1 in diabetic cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2016;6:36340.
215. Zhou X, Zhang W, Jin M, Chen J, Xu W, Kong X. lncRNA MIAT functions as a competing endogenous RNA to upregulate DAPK2 by sponging miR-22-3p in diabetic cardiomyopathy. *Cell Death Dis.* 2017;8(7):e2929.
216. Zhang M, Gu H, Chen J, Zhou X. Involvement of long noncoding RNA MALAT1 in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2016;202:753–5.
217. Li X, Dai Y, Yan S, Shi Y, Han B, Li J, et al. Down-regulation of lncRNA KCNQ1OT1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;491(4):1026–33.
218. Jiang Y, Du W, Chu Q, Qin Y, Tuguzbaeva G, Wang H, et al. Downregulation of Long Non-Coding RNA Kcnq1ot1: An Important Mechanism of Arsenic Trioxide-Induced Long QT Syndrome. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(1):192–202.
219. Coto E, Calvo D, Reguero JR, Morís C, Rubín JM, Díaz-Corte C, et al. Differential methylation of lncRNA KCNQ1OT1 promoter polymorphism was associated with symptomatic cardiac long QT. *Epigenomics.* 2017;9(8):1049–57.
220. Ren K, Xu R, Huang J, Zhao J, Shi W. Knockdown of long non-coding RNA KCNQ1OT1 depressed chemoresistance to paclitaxel in lung adenocarcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;80(2):243–50.
221. Gao X, Ge J, Li W, Zhou W, Xu L. LncRNA KCNQ1OT1 ameliorates particle-induced osteolysis through inducing macrophage polarization by inhibiting miR-21a-5p. *Biol Chem.* 2018;399(4):375–86.
222. Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *Bioessays.* 2010;32(6):473–80.
223. Zhuo C, Jiang R, Lin X, Shao M. LncRNA H19 inhibits autophagy by epigenetically silencing of DIRAS3 in diabetic cardiomyopathy. *Oncotarget.* 2017;8(1):1429–37.

224. Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(2).
225. Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2003;22(39):8031–41.
226. Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, Chess A. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics.* 2007;8:39.
227. Zhang M, Gu H, Xu W, Zhou X. Down-regulation of lncRNA MALAT1 reduces cardiomyocyte apoptosis and improves left ventricular function in diabetic rats. *Int J Cardiol.* 2016;203:214–6.
228. Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, Susumu S, Takahashi A, et al. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet.* 2006;51(12):1087–99.
229. Kanduri C. Kcnq1ot1: a chromatin regulatory RNA. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(4):343–50.
230. Yang F, Qin Y, Wang Y, Li A, Lv J, Sun X, et al. LncRNA KCNQ1OT1 Mediates Pyroptosis in Diabetic Cardiomyopathy. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(4):1230–44.
231. Dorn GW, 2nd. LIPCAR: a mitochondrial lnc in the noncoding RNA chain? *Circ Res.* 2014;114(10):1548–50.
232. Seferović PM, Paulus WJ. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J.* 2015;36(27):1718–27, 27a–27c.
233. Aneja A, Tang WH, Bansilal S, Garcia MJ, Farkouh ME. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. *Am J Med.* 2008;121(9):748–57.
234. Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, et al. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature.* 2008;451(7175):202–6.

235. Rahimi E, Ahmadi A, Boroumand MA, Mohammad Soltani B, Behmanesh M. Association of ANRIL Expression with Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetic Patients. *Cell J*. 2018;20(1):41–5.
236. Sun L, Zhang Y, Zhang Y, Gu Y, Xuan L, Liu S, et al. Expression profile of long non-coding RNAs in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol*. 2014;177(1):73–5.
237. Wang K, Liu F, Zhou LY, Long B, Yuan SM, Wang Y, et al. The long noncoding RNA CHRFB regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circ Res*. 2014;114(9):1377–88.
238. Viereck J, Kumarswamy R, Foinquinos A, Xiao K, Avramopoulos P, Kunz M, et al. Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling. *Sci Transl Med*. 2016;8(326):326ra22.
239. Han P, Li W, Lin CH, Yang J, Shang C, Nuernberg ST, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*. 2014;514(7520):102–6.
240. Zhang Q, Wang F, Wang F, Wu N. Long noncoding RNA MAGI1-IT1 regulates cardiac hypertrophy by modulating miR-302e/DKK1/Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2020;235(1):245–53.
241. Jing L, Li S, Wang J, Zhang G. Long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 7 facilitates cardiac hypertrophy via stabilization of SDA1 domain containing 1 mRNA. *J Cell Biochem*. 2019;120(9):15089–97.
242. Correia CCM, Rodrigues LF, de Avila Pelozin BR, Oliveira EM, Fernandes T. Long Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases: Potential Function as Biomarkers and Therapeutic Targets of Exercise Training. *Noncoding RNA*. 2021;7(4).
243. Ismail N, Abdullah N, Abdul Murad NA, Jamal R, Sulaiman SA. Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) in Cardiovascular Disease Complication of Type 2 Diabetes. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(1).
244. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
245. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.

9. POPIS KRATICA

- α -SMA** – alfa-glatkomišićni aktin (*engl. alpha-smooth muscle actin*)
- ACE** – angiotenzin konvertirajući enzim (*engl. angiotensin-converting enzyme*)
- AGTR1** – gen za angiotenzin II receptor tipa 1 (*engl. angiotensin II receptor type 1 gene*)
- AngII** – angiotenzin II (*engl. angiotensin II*)
- apoA-I** – apolipoprotein A-I (*engl. apolipoprotein A-I*)
- apoB** – apolipoprotein B (*engl. apolipoprotein B*)
- apoE** – apolipoprotein E (*engl. apolipoprotein E*)
- AV** – aortalni zalistak (*engl. aortic valve*)
- AVA** – površina aortalnog ušća (*engl. aortic valve area*)
- AVAi** – indeksirana površina aortalnog ušća (*engl. indexed aortic valve area*)
- AVSc** – aortalna skleroza (*engl. aortic valve sclerosis*)
- AVS** – aortalna stenoza (*engl. aortic valve stenosis*)
- BAVS** – bikuspidalna aortalna stenoza (*engl. bicuspid aortic valve stenosis*)
- BMI** – indeks tjelesne mase (*engl. body mass index*)
- BMP** – koštni morfogenetski protein (*engl. bone morphogenetic protein*)
- CAVS** – kalcificirajuća aortalna stenoza (*engl. calcific aortic valve stenosis*)
- CCT** – kompjutorizirana tomografija srca (*engl. cardiac computed tomography*)
- CCR5** – kemokinski receptor tip 5 (*engl. C-C motif chemokine receptor 5*)
- CMR** – magnetska rezonancija srca (*engl. cardiac magnetic resonance*)
- CNP** – C-tip natriuretski peptid (*engl. C-type natriuretic peptide*)
- CTGF** – čimbenik rasta vezivnog tkiva (*engl. connective tissue growth factor*)
- CAD** – koronarna arterijska bolest (*engl. coronary artery disease*)
- ΔP** – srednji gradijent tlaka (*engl. mean pressure gradient*)
- ECM** – izvanstanični matriks (*engl. extracellular matrix*)
- ELN** – elastin (*engl. elastin gene*)
- EMT** – epitelno-mezenhimalna tranzicija (*engl. epithelial-to-mesenchymal transition*)
- EOA** – efektivna površina aortalnog ušća (*engl. effective orifice area*)
- EACTS** – Europska udruga za kardiotorakalnu kirurgiju (*engl. European Association for Cardio-Thoracic Surgery*)
- ESC** – Europsko kardiološko društvo (*engl. European Society of Cardiology*)
- ET-1** – endotelin-1 (*engl. endothelin-1*)
- FGF2** – fibroblastni čimbenik rasta 2 (*engl. fibroblast growth factor 2*)

GAG – glikozaminoglikani (*engl. glycosaminoglycans*)

HF – zatajenje srca (*engl. heart failure*)

ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula 1 (*engl. intercellular adhesion molecule 1*)

IL-6 – interleukin-6 (*engl. interleukin-6*)

IL-β – interleukin-beta (*engl. interleukin-beta*)

IL-10 – interleukin 10 (*engl. interleukin 10*)

IVS – interventrikularni septum (*engl. interventricular septum*)

LCC – lijevi koronarni kuspis (*engl. left coronary cusp*)

LDL – lipoproteini niske gustoće (*engl. low-density lipoproteins*)

LDL-c – kolesterol lipoproteina niske gustoće (*engl. low-density lipoprotein cholesterol*)

Lp(a) – lipoprotein(a) (*engl. lipoprotein(a)*)

LA – lijevi atrij (*engl. left atrium*)

LV – lijeva klijetka (*engl. left ventricle*)

LVEF – e젝cijska frakcija lijeve klijetke (*engl. left ventricular ejection fraction*)

MCP-1 – protein kemotaksije monocita 1 (*engl. monocyte chemoattractant protein 1*)

MGP – protein Gla matriksa (*engl. matrix Gla protein*)

MMPs – metaloproteinaze matriksa (*engl. matrix metalloproteinases*)

MV – mitralni zalistak (*engl. mitral valve*)

NFκB – nuklearni čimbenik kapa B (*engl. nuclear factor kappa B*)

NO – dušikov oksid (*engl. nitric oxide*)

NCC – stražnji / nekoronarni kuspis (*engl. non-coronary cusp*)

Notch – signalni put Notch (*engl. Notch signaling pathway*)

oxLDL – oksidirani LDL (*engl. oxidized low-density lipoprotein*)

PA – plućna arterija (*engl. pulmonary artery*)

PTH – paratiroidni hormon (*engl. parathyroid hormone*)

PV – plućni zalistak (*engl. pulmonary valve*)

qVIC – mirujuće valvularne intersticijske stanice (*engl. quiescent valvular interstitial cells*)

RA – desni atrij (*engl. right atrium*)

RANKL – ligand receptora aktivatora nuklearnog faktora kapa B (*engl. receptor activator of nuclear factor κB ligand*)

RBB – desna grana snopa (*engl. right bundle branch*)

RCC – desni koronarni kuspis (*engl. right coronary cusp*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (*engl. reactive oxygen species*)

RV – desna klijetka (*engl. right ventricle*)

Runx2 – runt-srodni transkripcijski faktor 2 (*engl. runt-related transcription factor 2*)

SAVR – kirurška zamjena aortalnog zaliska (*engl. surgical aortic valve replacement*)

SMAD6 – signalni posrednik SMAD6 (*engl. SMAD family member 6*)

SOX9 – transkripcijski faktor SOX9 (*engl. SRY-box transcription factor 9*)

SVi – indeks udarnog volumena (*engl. stroke volume index*)

STJ – sinotubularni spoj (*engl. sinotubular junction*)

TAVR/TAVI – transkateterska implantacija aortalnog zaliska (*engl. transcatheter aortic valve replacement / implantation*)

TGF- β – transformirajući čimbenik rasta beta (*engl. transforming growth factor beta*)

TIMPs – tkivni inhibitori metaloproteinaza (*engl. tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TNF- α – tumorski nekrotični čimbenik alfa (*engl. tumor necrosis factor alpha*)

TV – trikuspidalni zalistak (*engl. tricuspid valve*)

VDR – receptor vitamina D (*engl. vitamin D receptor*)

VE-kadherin – vaskularni endotelni kadherin (*engl. vascular endothelial cadherin*)

VEC – valvularne endotelne stanice (*engl. valvular endothelial cells*)

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (*engl. vascular endothelial growth factor*)

VIC – valvularne intersticijske stanice (*engl. valvular interstitial cells*)

aVIC – aktivirane valvularne intersticijske stanice (*engl. activated valvular interstitial cells*)

obVIC – osteoblastične valvularne intersticijske stanice (*engl. osteoblastic valvular interstitial cells*)

eVIC – endotelno-porijeklom valvularne intersticijske stanice (*engl. endothelial-derived valvular interstitial cells*)

Vmax – vršna brzina transvalvularnog protoka (*engl. peak transvalvular velocity*)

Wnt/ β -katenin – signalni put Wnt/ β -katenin (*engl. Wnt/ β -catenin signaling pathway*)

DNMT – DNA metiltransferaze (*engl. DNA methyltransferases*)

CBX3 – kromoboks 3 (*engl. chromobox protein homolog 3*)

CLOCK – cirkadijalni regulator sata (*engl. clock circadian regulator*)

DPF3A – (*engl. double PHD fingers 3a*)

5hmC – 5-hidroksimetilcitozin (*engl. 5-hydroxymethylcytosine*)

HAT1 – histon acetiltransferaza 1 (*engl. histone acetyltransferase 1*)

HMT – histon metiltransferaza (*engl. histone methyltransferase*)

ING2 – (*engl. inhibitor of growth family member 2*)

KMT2A – lizin metiltransferaza 2a (*engl. lysine methyltransferase 2A*)

MeCP2 – metil-CpG vezujući protein 2 (*engl. methyl-CpG binding protein 2*)

MBD1 – (*engl. methyl-CpG-binding domain protein 1*)

MLL1–5 – obitelj lizin metiltransferaza (*engl. mixed-lineage leukemia 1–5, lysine methyltransferases*)

MYSTs – obitelj histon acetiltransferaza (*engl. MYST family histone acetyltransferases*)

p300 – histon acetiltransferaza P300 (*engl. histone acetyltransferase p300*)

PRMT1 – protein arginin metiltransferaza 1 (*engl. protein arginine methyltransferase 1*)

p160 – MYB vezujući protein 1a (*engl. MYB binding protein 1a*)

SAM – S-adenozil metionin (*engl. S-adenosylmethionine*)

SET1/ASH2 – histon-metiltransferazni kompleks (*engl. SET1/ASH2 histone methyltransferase complex*)

SUV39H1 – histon-lizin-N-metiltransferaza (*engl. suppressor of variegation 3–9 homolog 1, histone-lysine N-methyltransferase*)

AU – proizvoljne jedinice (*engl. arbitrary units*)

BSA – površina tijela (*engl. body surface area*)

PAD – periferna arterijska bolest (*engl. peripheral artery disease*)

AF – fibrilacija atrijsa (*engl. atrial fibrillation*)

NOAC – antikoagulansi koji nisu antagonisti vitamina K (*engl. non-vitamin K antagonist oral anticoagulants*)

GUK – glukoza u krvi (*engl. blood glucose*)

IQR – interkvartilni raspon (*engl. interquartile range*)

eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije (*engl. estimated glomerular filtration rate*)

SD – standardna devijacija (*engl. standard deviation*)

HDL – lipoproteini visoke gustoće (*engl. high-density lipoproteins*)

CT – kompjutorizirana tomografija (*engl. computed tomography*)

AST – aspartat-aminotransferaza (*engl. aspartate aminotransferase*)

ALT – alanin-aminotransferaza (*engl. alanine aminotransferase*)

ALP – alkalna fosfataza (*engl. alkaline phosphatase*)

CRP – C-reaktivni protein (*engl. C-reactive protein*)

GGT – gama-glutamyl transferaza (*engl. gamma-glutamyl transferase*)

CK – kreatin kinaza (*engl. creatine kinase*)

LDH – laktat dehidrogenaza (*engl. lactate dehydrogenase*)

NT-proBNP – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (*engl. N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide*)

LVIDd – unutarnji promjer lijevog ventrikula u dijastoli (*engl. left ventricle internal dimension at diastole*)

LVIDs – unutarnji promjer lijevog ventrikula u sistoli (*engl. left ventricle internal dimension at systole*)

IVSd – debljina interventrikularnog septuma u dijastoli (*engl. interventricular septum thickness in diastole*)

LVPW – debljina stražnje stijenke lijevog ventrikula u dijastoli (*engl. left ventricular posterior wall thickness in diastole*)

LVEDV – teledijastolički volumen lijevog ventrikula (*engl. left ventricular end-diastolic volume*)

LVESV – telesistolički volumen lijevog ventrikula (*engl. left ventricular end-systolic volume*)

RWT – relativna debljina stijenke lijevog ventrikula (*engl. relative wall thickness*)

PGmax – maksimalni gradijent tlaka (*engl. maximum pressure gradient*)

PGmean – srednji gradijent tlaka (*engl. mean pressure gradient*)

LVOT – izlazni trakt lijevog ventrikula (*engl. left ventricular outflow tract*)

LVOT Vmax – maksimalna brzina protoka u izlaznom traktu (*engl. LVOT maximum velocity*)

LVOT PGmax – maksimalni gradijent tlaka u izlaznom traktu (*engl. LVOT maximum pressure gradient*)

LVOT PGmean – srednji gradijent tlaka u izlaznom traktu (*engl. LVOT mean pressure gradient*)

UZV – ultrazvuk srca (*engl. echocardiography*)

10. ŽIVOTOPIS

Jasenska Grgurić rođena je 7. listopada 1980. u Varaždinu, Republici Hrvatskoj. Diplomirala je medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku na Medicinskom fakultetu i Fakultetu zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci, a prvostupnica je istog područja sa Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu.

Znanstveni rad Jasenke Grgurić usmjeren je na istraživanje ekspresijskog obrasca i biomarkerskog potencijala molekula lncRNA u perifernoj krvi pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka. Njezina istraživanja doprinose razumijevanju molekularnih mehanizama kardiovaskularnih bolesti i razvoju novih dijagnostičkih pristupa temeljenih na biomarkerima.

Profesionalno iskustvo stječe u Kliničkom bolničkom centru Zagreb na Odjelu za laboratorijsku imunologiju, gdje sudjeluje u provođenju analitičkih postupaka, obradi biološkog materijala i istraživačkim projektima. Prije toga radila je u Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a Zagreb te više od petnaest godina u privatnom sektoru, gdje je bila uključena u mikrobiološke, biokemijske i molekularne analize, uključujući PCR, izolaciju DNA/RNA i validaciju novih metoda.

Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima, na kojima je predstavljala rezultate istraživanja iz područja molekularne biologije i biomarkera. Članica je Hrvatske komore zdravstvenih radnika i Hrvatskog biološkog društva. Aktivno sudjeluje u povjerenstvima za međunarodnu suradnju, etiku i deontologiju.

Stručne kompetencije obuhvaćaju molekularnu biologiju, kliničku biokemiju, imunologiju, mikrobiologiju te upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Aktivno se služi engleskim jezikom i informatičkim alatima.