

Utjecaj umjerene konzumacije vina i vodene otopine etanola na dinamiku proliferacijske faze cijeljenja srčanog infarkta na štakorskom modelu

Pijuk, Anđela

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:081019>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Anđela Pijuk

**UTJECAJ UMJERENE KONZUMACIJE VINA I VODENE OTOPINE ETANOLA
NA DINAMIKU PROLIFERACIJSKE FAZE CIJELJENJA SRČANOG INFARKTA
NA ŠTAKORSKOM MODELU**

Diplomski rad

Akadska godina:

2019./2020.

Mentor:

prof. dr. sc. Ivica Grković, dr. med.

Split, srpanj 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Anđela Pijuk

**UTJECAJ UMJERENE KONZUMACIJE VINA I VODENE OTOPINE ETANOLA
NA DINAMIKU PROLIFERACIJSKE FAZE CIJELJENJA SRČANOG INFARKTA
NA ŠTAKORSKOM MODELU**

Diplomski rad

Akadska godina:

2019./2020.

Mentor:

prof. dr. sc. Ivica Grković, dr. med.

Split, srpanj 2020.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Patogeneza srčanog infarkta	2
1.2. Cijeljenje srčanog infarkta	3
1.2.1. Akutna upalna faza	3
1.2.2. Proliferacijska faza	4
1.3. Biljezi za praćenje cijeljenja infarkta	5
1.3.1. Aktin glatkog mišićja kao marker miofibroblasta	5
1.3.2. CD68 kao biljeg makrofaga	6
1.4. Vino i etanol kao kardioprotektivni čimbenici	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Etička načela	12
3.2. Ustroj istraživanja	12
3.3. Pokusne životinje	13
3.4. Pokusno vino i vodena otopina etanola	13
3.5. Protokol pokusa	14
3.6. Transdijafragmalni pristup na štakorsko srce	15
3.6.1. Anestezija i priprema za operaciju	15
3.6.2. Operacijski zahvat	15
3.7. Protokol pripreme rezova	16
3.8. Tehnika imunofluorescencije	17
3.9. Mikroskopiranje uzoraka i fotografiranje reprezentativnih zona	17
3.10. Kvantificiranje podataka i statistička raščlamba	18
4. REZULTATI	20
4.1. Općenita opažanja	21
4.2. Izražaj α -SMA	21
4.3. Izražaj CD68	22
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČCI	31
7. SAŽETAK	33
8. SUMMARY	35
9. POPIS CITIRANE LITERATURE	37
10. ŽIVOTOPIS	41

ZAHVALA

Najveće hvala mom dragom mentoru, profesoru Ivici Grkoviću, premda ne postoje riječi hvale koje mogu odraziti njegovu dobrotu, predanost, znanje i profesionalnost koje unosi u sve što radi, pa tako ni ovaj diplomski rad nije bio iznimka. Dragi profesore, od mojih teških početaka na ovom fakultetu (anatomija) do bezbrižnog kraja (diplomski rad), za mene ste uvijek bili istinski primjer kakav čovjek treba biti.

Veliko hvala dr. Danici Boban, koja mi je pored svojih preparata udijelila i osnovno znanje o imunohistokemijskom bojanju. Hvala za sve sate provedene na 4. katu te za svaki savjet i lijepu riječ.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju na savjetima, pomoći te ljubaznoj dobrodošlici iskazanoj za vrijeme izrade eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima i braći na ljubavi i podršci za vrijeme cjelokupnog školovanja.

Hvala svim dragim prijateljima na svim trenucima ohrabrenja, podrške i smijeha za vrijeme ovih 6 godina, bez vas bi bilo nemoguće.

Hvala svim inspirativnim kolegama studentima, liječnicima i profesorima na motivaciji zašto ipak mnogo toga ima smisla u ovoj profesiji, osobito u trenucima sumnje.

Hvala Onome bez kojeg ne bi bilo ni mene, pa ni ovog postignuća.

1. UVOD

1.1. Patogeneza srčanog infarkta

Akutni infarkt miokarda najčešće je uzrokovan stvaranjem tromba u epikardijalnim arterijama srca koje opskrbljuju određeno područje srčanog mišića, uslijed čega dolazi do smanjenja ili potpunog prekida protoka krvi kroz taj dio srca, odnosno ishemije (1).

Nastupom ishemije, dolazi do niza promjena, od kojih je većina povezana s dva glavna učinka ishemije: smanjenjem opskrbe kisikom (hipoksija) i nakupljanjem produkata anaerobnog metabolizma. Rezerva kisika, koja je prisutna kao oksihemoglobin u kapilarama i kao oksimoglobin u miocitima, iscrpljuje se nakon 8 do 10 sekundi (2). S obzirom na to da se srčane kontrakcije moraju odvijati neprekidno, zahtijevajući ogromne količine energije za optimalnu funkciju (3), te da se potreba za ATP-om može nadomjestiti samo aerobnim metabolizmom, nedostatak opskrbe kisikom dovodi do smanjenja unutar srčanog ATP-a, čineći miokard vrlo osjetljivim na ishemiju (4).

Nedostatak ATP-a odražava se na miozin ATP-azu miofibrila, Na/K pumpu, kalcijску ATP-azu na sarkolemi i sarkoplazmatskom retikulumu te druge ATP-aze. Posljedično tome, uskoro dolazi do prekida učinkovitih kontrakcija u miocitima koji su pogođeni ishemijom (2), čemu pridonosi i smanjenje unutarstaničnog pH zbog nakupljanja produkata anaerobne glikolize koji smanjuju kontraktilnost. Osim djelovanja na kontraktilnost, sniženje pH pospješuje ulazak natrija u stanicu putem Na/H crpke (4). Taj proces, zajedno s općenitim povišenjem katabolita u stanici, dovodi do povećanja unutarstanične osmolalnosti te bubrenja stanice. Kao odgovor na to, dolazi do pojačanog izlaska kalija iz stanice, što je osnova za rane elektrokardiografske promjene i moguću aritmogenezu (2).

Gledano vremenski, istraživanja pokazuju da do prekida kontrakcija u infarciranom području dolazi nekoliko minuta nakon ishemije, a prate ga bubrenje stanice i ruptura unutarstaničnih mikrostruktura u vremenu od 15 do 30 minuta (4). Iako stanice postaju akontraktilne, još uvijek nije došlo do stanične smrti, te je ta promjena reverzibilna, ukoliko se arterijski protok uspostavi tijekom prvih 15 minuta od nastanka ishemije. Taj period se označava kao reverzibilna faza ishemijske ozljede. Znakovi ireverzibilnih promjena pojavljuju se u rasponu od 40 do 60 minuta od nastupa ishemije te uključuju: smanjenje količine glikogena, marginalizaciju jezgrinog kromatina, edem mitohondrija s nakupljanjem amorfnih precipitata u njegovom matriksu te pukotine u staničnoj membrani.

Iako nije poznat točan i jedinstven mehanizam prelaska u ireverzibilnu fazu, smatra se da su značajan pad visokoenergetskih fosfata, nakupljanje nukleotida i teže oštećenje sarkoleme objektivni znakovi prisustnosti ireverzibilne promjene (5). Mehanizmi stanične smrti koji se pritom događaju su nekroza i apoptoza. Apoptoza prevladava u rubovima ishemičnog područja te neishemičnim dijelovima miokarda, dok nekroza prevladava u samoj zoni ishemije, što dijelom odražava i razlike u signalnim mehanizmima koji dovode do pojedinog mehanizma stanične smrti. Posljednja saznanja upućuju na to da nekroza prevladava onda kad razina kalcija u mitohondriju postane jako niska, isto kao i razina ATP-a u stanici (4).

Važnost nekroze, kao stanične smrti, je u činjenici da je ona okidač za jaku upalnu reakciju koja dovodi do infiltracije infarkta aktiviranim leukocitima (6). Ta upalna reakcija ujedno je i dio procesa cijeljenja infarkta te se izdvaja kao prva faza cijeljenja, obilježena jakom proteaznom aktivnosti i degradacijom matriksa te fagocitozom kojom se uklanja nekrotično tkivo. Cijeljenje infarkta može se podijeliti na tri faze koje se međusobno preklapaju: akutna upalna faza, proliferacijska faza i maturacijska faza, odnosno faza sazrijevanja ožiljka (7).

1.2. Cijeljenje srčanog infarkta

1.2.1. Akutna upalna faza

Kao posljedica infarkta, kako je ranije navedeno, dolazi do nekroze. Nekrotične stanice i oštećeni ekstracelularni matriks oslobađaju tvari koje se ponašaju kao signali opasnosti, odnosno DAMP-ovi (engl. *danger-associated molecular patterns*). U literaturi je opisano nekoliko različitih DAMP-ova koji aktiviraju upalnu kaskadu kod infarkta, a neki od njih su: heat shock proteini, niskomolekularna hijaluronska kiselina, ATP, molekula DNA i mnogi drugi. DAMP-ovi se vežu na receptore (engl. *TLR - Toll like receptor*) urođenog imunološkog sustava na preživjelim parenhimskim stanicama i to antigensko prepoznavanje je, uz aktivaciju komplementa, temelj za aktivaciju kaskade upalnih posrednika, uključujući upalne citokine, kemokine i adhezijske molekule (7).

Kisikovi radikali (engl. *ROS - reactive oxygen species*) također imaju važnu ulogu kod aktivacije upalnih signala jer potiču infiltraciju leukocita djelujući na sve korake regrutiranja upalnih stanica: induciraju ekspresiju citokina i kemokina, potiču aktivaciju leukocitnih integrina te induciraju sintezu adhezijskih molekula (8).

Neutrofili su prve upalne stanice koje infiltriraju ishemično srčano tkivo, obično u rasponu od 6 do 24 sata od nastanka infarkta (9). Osim njihove glavne uloge u odstranjivanju nekrotičnog tkiva (10), oni održavaju inicijalni akutni upalni odgovor na infarkt, a odgovorni su i za širenje upale na susjedna područja miokarda, što predstavlja neutrofilima induciranu ozljedu (9). Svojom degranulacijom oslobađaju proteaze te širok spektar upalnih čimbenika (kemokina i citokina) i reaktivnih kisikovih radikala. Također, koordiniraju aktivaciju i funkciju stanica prirođene i stečene imunosti, uključujući makrofage i limfocite (10). Pokazalo se da povišena količina cirkulirajućih neutrofila korelira s veličinom infarkta, funkcijom lijeve klijetke te kliničkim ishodima.

Nasuprot tome, smatra se da neutrofili ipak imaju i protektivnu ulogu u procesu cijeljenja jer mogu usmjeriti razvoj makrofaga u reparativni fenotip (9). Također, utvrdilo se da neutrofili, preko oslobađanja i ekspresije raznih medijatora te facilitacijom vlastite apoptoze, imaju kritičnu ulogu u prijelazu iz upalne u proliferacijsku fazu cijeljenja srčanog infarkta (7).

1.1.1. Proliferacijska faza

Nakon akutne upalne faze, slijedi antiupalna, reparativna faza, od 4. do 7. dana nakon infarkta, koja je uglavnom praćena antiupalnim makrofazima te je obilježena supresijom i rezolucijom inicijalnog upalnog odgovora, što dopušta cijeljenje i početak formacije ožiljka (9).

Formira se granulacijsko tkivo koje se sastoji od makrofaga, miofibroblasta, novih krvnih žila te novonastalog ekstracelularnog matriksa (11). S obzirom na to da su iz područja infarkta odstranjeni stanični detritus i fragmenti matriksa, upalni odgovor se stišava. Neutrofili podliježu apoptozi i fagocitozi od strane makrofaga. Pojavljuju se medijatori koji suprimiraju proupalne signale, od kojih su interleukin 10 (IL-10) i transformirajući čimbenik rasta (TGF- β) najznačajniji.

Dolazi do infiltracije fibroblastima i endotelnim stanicama. Diferencijacija fibroblasta u miofibroblaste koji sintetiziraju proteine matriksa i osiguravaju kontrakciju ožiljka, a time strukturnu stabilnost srca, jedna je od glavnih značajki ove faze. Angiotenzin II i TGF- β su važni reparacijski medijatori, s obzirom na to da stimuliraju diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste i potiču sintezu kolagena. Proliferacija fibroblasta dovodi i do jake angiogeneze koja osigurava kisik i nutrijente koji su važni za ožiljak u cijeljenju (12).

U kontekstu neoangiogeneze, dolazi do povećanja ekspresije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) i receptora za VEGF, kao i PDGF-a (engl. *platelet-derived growth factor*) u kasnijim fazama, koji je ključan za sazrijevanje krvnih žila i implementaciju pericita u stijenku krvne žile. Osim fibroblasta i makrofaga, studije pokazuju važnost uloge T-limfocita, osobito pomoćničkih T-limfocita i regulatornih T-limfocita, za poticanje cijeljenja, rezoluciju upale te optimalno odlaganje kolagena i formaciju ožiljka, na taj način limitirajući štetne učinke remodelacije infarkta (7).

Zaključno, za proliferacijsku fazu važno je da se uključe antiupalni mehanizmi jer izostanak stišavanja upale, bilo vremenski ili prostorno, može rezultirati ekstenzivnijom remodelacijom, što u konačnici može pogodovati razvoju zatajenja srca u pacijenata koji prebole infarkt (12). Buduća istraživanja trebala bi odrediti koji su upalni mehanizmi protektivni, a koji štetni, te utvrditi reprezentativne biomarkere koji bi mogli odraziti specifične promjene u upalnom odgovoru, što bi moglo poslužiti kao temelj za implementaciju individualiziranog pristupa u terapiji (13).

1.3. Biljezi za praćenje cijeljenja infarkta

1.3.1. Aktin glatkog mišićja kao marker miofibroblasta

Aktin glatkog mišićja (engl. *α -smooth muscle actin - α SMA*) dio je obitelji proteina aktina koja se kod sisavaca sastoji od više izoformi, od kojih su neke ubikvitarne, a druge se razlikuju ovisno o vrsti mišićnog tkiva u kojem su prisutne (14). Dok je u zdravom srcu izražaj α SMA prisutan samo u stijenci krvnih žila, brojne studije pokazale su prisustnost α SMA u miofibroblastima tijekom cijeljenja infarkta miokarda (15).

Miofibroblasti su prvi put zabilježeni kao stanice vretenastog oblika u granulacijskom tkivu (16). Njihov najbolje istražen prekursor su fibroblasti, iako postoje dokazi da nastaju iz drugih vrsta stanica (17). U cijeljenju infarkta prisutni su od 3. dana, a od 7. do 10. dana gube proliferacijsku aktivnost i ekspresiju α SMA, što implicira da te stanice, preko praćenja ekspresije α SMA, mogu biti pokazatelj dinamike cijeljenja infarkta miokarda (18). Njihova glavna uloga ostvaruje se u remodelaciji ožiljka jer sintetiziraju proteine izvanstaničnog matriksa (sličnost s fibroblastima) te utječu na kontraktilnost zbog citoskeletnih karakteristika sličnih stanicama glatkog mišićja (17).

Upravo ta mehanička uloga miofibroblasta, sposobnost kontrakcije ožiljka, smatra se ključnom u prevenciji rupture i daljnje remodelacije klijetki, a istraživanja pokazuju da je ekspresija α SMA u pozitivnoj korelaciji s kontraktilnosti miofibroblasta. No, s druge strane, pretjerana aktivacija miofibroblasta mogla bi dovesti do fibroze i posljedične disfunkcije srca te je i za te stanice u kontekstu cijeljenja infarkta važno da budu aktivne u točno određenom i ograničenom vremenskom periodu (19).

1.3.2. CD68 kao biljeg makrofaga

Makrofazi su važna heterogena populacija stanica koja se funkcionalno može podijeliti ovisno o podrijetlu (iz koštane srži ili žumanjčane vreće), odnosno o prostornoj raspodijeljenosti, kao tkivni, odnosno makrofazi ili kao stanice u perifernoj krvi, monociti (20). Biljeg koji se koristi za histokemijsku analizu i detekciju ovih stanica je CD68, teško glikozilirani glikoprotein, inače lizosomalni protein, sa sposobnošću prelaska na staničnu površinu (21).

Kod ishemijske ozljede srca, makrofazi su ključan dio imunološkog odgovora jer imaju nekoliko važnih funkcija u cijeljenju: fagocitoza mrtvih stanica, poticanje angiogeneze i formiranje ožiljka (22). Iako se prvotno isticala njihova uloga u procesu fagocitoze i destrukcije tkiva, u novije vrijeme spoznala se i njihova reparativna uloga te vremenski bifazičan nastup dviju različitih subpopulacija tih stanica. U tom se kontekstu makrofazi dijele na proinflamatorne (M1 subpopulacija), koji dominiraju od 1. do 4. dana nakon infarkta i sudjeluju u otklanjanju nekrotičnog detritusa, te reparativne (M2 subpopulacija), koji dominiraju tijekom rezolucije upale, od 4. do 8. dana, i potiču reparaciju poticanjem angiogeneze i sinteze kolagena.

Upravo iz te podjele proizlazi jedno od objašnjenja uloge makrofaga u procesu optimalnog cijeljenja, s obzirom na to da se u istraživanjima pronalazila i pozitivna i negativna korelacija između broja makrofaga i učinkovitosti cijeljenja. Sukladno tome, osim o optimalnoj snazi upalnog odgovora posredovanog makrofazima i njihovoj ekspresiji u tkivu, pozitivan ishod cijeljenja uvelike ovisi i o pravovremenoj ekspresiji dviju subpopulacija tih stanica (23).

1.4. Vino i etanol kao kardioprotektivni čimbenici

Vino je vodena otopina sastavljena od niza kemijskih spojeva, poglavito alkohola, uz prisutnost aldehida, estera, ketona, lipida, minerala, organskih kiselina, fenola, šećera i vitamina (24).

Brojne studije dokazale su blagotvorne učinke umjerene konzumacije alkohola na zdravlje, posebice vina. Posebno se naglašava korist crnog vina za prevenciju kardiovaskularnih bolesti, metaboličkog sindroma, kognitivnog propadanja, depresije i karcinoma. Što se tiče kardiovaskularnog sustava, opažajna istraživanja pokazala su pozitivan učinak na neželjene događaje i smrtnost u pacijenata s postojećom kardiovaskularnom bolesti, a intervencijska istraživanja utvrdila su kako umjerena konzumacija crnog vina snižava LDL kolesterol, kao i postprandijalnu agregaciju trombocita i triglicerida (25).

Protektivni učinci u većini studija snažnije se pripisuju crnom vinu, zbog posebnosti njegovih fitokemijskih komponenti, od kojih se kao jedna od značajnijih izdvajaju polifenoli, koji su više zastupljeni u crnom u odnosu na bijelo vino (26). Jedna od najistraživanijih polifenolskih komponenti, rezervatol, pokazuje snažne antioksidativne učinke te smanjenje morbiditeta i mortaliteta zbog kardiovaskularnih bolesti. Međutim, postoje kontroverze oko činjenice da se polifenoli opsežno metaboliziraju tijekom apsorpcije u glukuronidirane, sulfatirane i metilirane produkte za koje nisu dokazani protektivni učinci.

Štoviše, aktualna istraživanja pokazuju da etanol doprinosi blagotvornim učincima, neovisno o vrsti alkoholnog pića. Ti se učinci najjasnije povezuju sa smanjenjem kardiovaskularnog rizika od 30 do 35 %. No, gotovo sve studije pokazuju da se to odnosi na blagu do umjerenu konzumaciju (jedno do dva pića dnevno), dok tri do četiri pića dnevno predstavljaju povišenje rizika. S obzirom na razlike u nastanku oštećenja jetre uzrokovanog alkoholom, vezane za spol, smatra se da se povišenje smrtnosti događa kod dnevnog unosa više od dva pića za žene, te više od tri za muškarce (27).

Što se tiče bijelog vina, njegove komponente su manje istražene, no smatra se da je vjerojatno siromašnije polifenolima od crnog vina, zbog načina proizvodnje. Od poznatih spojeva za koje su pokazani antioksidativni i antiupalni učinci, izdvajaju se monofenoli kao što su tirozol i kafeična kiselina (28).

Utjecaj bijelog vina na cijeljenje infarkta miokarda, iako još uvijek nedovoljno istražen, ispitan je u nedavno objavljenom istraživanju grupe autora s Medicinskog fakulteta u Splitu, u kojem je pronađeno da prekondicioniranje standardnom i maceriranom graševinom smanjuje izražaj monocitno-makrofagne loze u peri-infarktним zonama srca 24 sata od infarkta ($P<0,001$) (29). U kontekstu tog istraživanja i dosadašnjih saznanja iz literature, naš cilj bio je istražiti utjecaj bijelog vina na proliferacijsku fazu infarkta miokarda i usporediti taj učinak s etanolom.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj konzumacije vodene otopine etanola i bijelog vina na cijeljenje akutnog infarkta miokarda 4. dana od nastanka, u odnosu na kontrolnu skupinu koja je konzumirala vodu. Fokus istraživanja bio je ispitati dinamiku cijeljenja proliferacijske faze akutnog infarkta miokarda kvalitativnom analizom, a kvantitativnom analizom peri-infarktne zone ispitati izražaj α -SMA kao markera miofibroblasta i CD68 kao markera makrofaga, te moguće razlike u izražaju tih markera između kontrolne i pokusnih skupina.

Hipoteze

1. Izražaj α -SMA kao markera miofibroblasta u peri-infarktним zonama razlikovat će se kod skupina koje su konzumirale vino i vodenu otopinu etanola u usporedbi sa skupinom koja je konzumirala vodu.
2. Izražaj CD68 kao markera makrofaga u peri-infarktним zonama bit će manji 4. dana cijeljenja infarkta miokarda u odnosu na 1. dan nakon infarkta.
3. Izražaj CD68 u peri-infarktним zonama bit će različit kod skupine koja je konzumirala vino u odnosu na kontrolnu skupinu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Etička načela

Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, na temelju članka 21. Zakona o zaštiti životinja, donijelo je rješenje (Klasa: UP/I-322-01/15-01/38, Ur.broj: 525-10/0255-16-7) kojim se odobrilo provođenje dijela glavnog projekta koji se odnosi na eksperimentalno istraživanje (prethodno obavljeno) iz kojeg su dobiveni uzorci koji su temelj ovog diplomskog rada. Etičko povjerenstvo gore navedene institucije temeljem članka 34. Zakona o zaštiti životinja (Klasa: 322-01/15-01/853, UR. Broj 525-15-3) i Poslovnika o radu etičkog povjerenstva donijelo je pozitivno mišljenje o provođenju i znanstvenoj utemeljenosti projekta.

Za sva istraživanja unutar glavnog projekta izneseno je i pozitivno mišljenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te je istraživanje provedeno u skladu sa smjernicama za rukovanje laboratorijskim životinjama (European Communities Council Directive 24.11.1986.). Svi postupci i eksperimentalni protokoli usklađeni su s ARRIVE smjernicama i s Direktivom Europske Unije 2010/63/EU za pokuse na životinjama.

3.2. Ustroj istraživanja

Ovo istraživanje je prospektivni, randomizirani pokus u kojem se procjenjuje utjecaj prekondicioniranja bijelim vinom i vodenom otopinom etanola (volumne koncentracije 13%) na razvoj infarkta miokarda u štakora.

Istraživanje je dio znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod naslovom: Biološki učinci vina, utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina (Bio-wine), broj 8652. Istraživanje je provedeno pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, ustanovi koja je nositelj projekta. Koordinator i voditelj projekta je prof. dr. sc. Mladen Boban.

Pokusi su bili provedeni u Nastambi za eksperimentalne životinje Sveučilišta u Splitu, a uzorci istih su imunohistokemijski obrađeni i kvantificirani u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju, pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

3.3. Pokusne životinje

U ovom istraživanju korišteni su Sprague-Dawley štakori (*Rattus norvegicus*) muškog spola, starosti 9 – 11 tjedana, tjelesne mase 150 +/- grama na početku pokusa. Životinje su za vrijeme trajanja pokusa boravile u Nastambi u kontroliranim uvjetima (primjerena vlažnost i temperatura sobe, s 12-satnim izmjenama svjetla i tame). Hranjene su standardnom hranom za štakore (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija). U svakom kavezu boravila je po jedna životinja, a stelja im je mijenjana jednom tjedno.

U pokus je bilo uključeno po 10 životinja u svaku skupinu. Za potrebe ovog diplomskog rada, odabrano je ukupno 9 životinja i randomizirano u 3 skupine:

1. Voda
2. Etanol
3. Vino

3.4. Pokusno vino i vodena otopina etanola

Vino koje je korišteno, proizvedeno je od grožđa sorte graševina 2015. godine (13% alkohola) iz Krauthaker vinarije iz Kutjeva, Hrvatska. Sorta graševina je bijelo grožđe s područja srednje i istočne Europe, ujedno i najraširenija hrvatska sorta bijelog grožđa. Vino je bilo proizvedeno standardnim vinifikacijskim postupkom u kojem se tijekom fermentacije uklanjaju kruti dijelovi grožđa od groždanog soka.

Vodena otopina etanola pripravljala se u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju na Medicinskom fakultetu u Splitu, tako što bi se volumen etanola poznate koncentracije razrijedio volumenom vode da se dobije vodena otopina etanola (13%).

3.5. Protokol pokusa

Pokus se odvijao na način da su se dnevno u pokus uvodile po dvije životinje te je za svaku trajanje pokusa bilo 28 dana. Opis postupaka:

1. Skupina Voda pila je samo vodu koja je bila dostupna 24 sata. Svježa voda (50 ml) prilagala se u posebnoj pojilici svakog dana u 15:00 sati, a tada se mjerio volumen popijene vode u prethodna 24 sata.
2. Skupina Vino imala je vino dostupno kroz 24 sata. Standardno vino ostavljalo se u količini od 30 ml svakog dana u 15:00 sati, kada se mjerio volumen popijenog vina u prethodna 24 sata. Ovim skupinama se voda, u količini od 50 ml u posebnim bočicama, ostavljala svakog dana ujutro u 9:00 sati i uklanjala u 15:00 sati, kada se mjerio volumen popijene vode kroz tih 6 sati.
3. Skupina Etanol imala je vodenu otopinu etanola (30 ml) dostupnu 24 sata. Otopina se prilagala u posebnoj pojilici svakog dana u 15:00 sati, kada se mjerio volumen iste popijene u prethodna 24 sata. Voda se donosila svakog dana ujutro u 9:00 sati i uklanjala u 15:00 sati, kada se mjerio volumen popijene vode u prethodnih 6 sati.
4. Napitci su se pohranjivali u označenim bocama u hladnjaku na 4 °C.
5. Životinje su se hranile ad libitum. Svakoj životinji bila je dostupna jednaka količina hrane. Hrana se stavljala jednom tjedno u 9:00 sati, u količini od 300 g, a tada se vagala masa preostale hrane. Vaganje životinja obavljalo se na početku uvođenja u pokus i svakih 7 dana nakon toga, dakle jednom tjedno, u 15:00 sati.
6. Svaki postupak bilježio se u kartonu za pojedinu životinju koji se nalazio u prostoriji s pokusnim životinjama tijekom trajanja pokusa, a iznosio se kada je životinja pristupala kriruškom dijelu pokusa.

3.6. Transdijafragmalni pristup na štakorsko srce

3.6.1. Anestezija i priprema za operaciju

Prije samog postupka anesteziranja životinje, utvrđena je točna tjelesna masa zbog određivanja optimalne doze anestetika prema tablici koja se koristi pri Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju. Kombinacija ketamina (Ketaminol 10, 1,4 ml/kg, Intervet International, Nizozemska) i ksilazina (Xylapan, 0,6 ml/kg, Vetoquintol, Švicarska) primijenjena je u stražnju skupinu mišića desne natkoljenice štakora.

Nakon anesteziranja, brijaćim aparatom i britvicom pripremljeno je operacijsko polje u području gornjeg abdomena, do 1 centimetar iznad ksifoidnog nastavka prsne kosti. Endotrahealna intubacija provedena je arterijskim kateterima od 16 G i 17 G. Nakon intubacije, na životinje su se spajale elektrode te se snimao kontrolni EKG (Delta 1), nakon čega se pristupilo izvođenju operacijskog zahvata.

3.6.2. Operacijski zahvat

Pristup koji je korišten je transabdominalni pristup prednjoj interventrikularnoj grani lijeve koronarne arterije (LAD - engl. *Left anterior descending*). Pomoću kirurškog mikroskopa (Leica, M520 MC1, Švicarska) medijano-sagitalnim rezom kože i potkožja, prikazu se mišići trbušne stijenke. Prereže se linea alba te je peritonealna šupljina otvorena. Tupom disekcijom oslobodi se ksifoidni nastavak prsne kosti čijim se podizanjem prikaže donja površina ošita.

Postave se retraktori da se postigne bolji prikaz te se potom učini incizija na ošitu u medijanoj liniji, koja se proteže svojom 1/3 kroz tetivni dio ošita, a s ostale 2/3 kroz mišićni dio. Odmah po inciziji ošita, životinja se spoji na respirator koji se postavi na 58 udisaja u minuti i udisajni tlak do 14 cmH₂O. Da bi se bolje prikazala prsna šupljina, u inciziju ošita se postave retraktori te se incizija raširi. Potom se pažljivo odljušti perikard da bi se jasnije prikazala površina srca.

Polazište LAD prikaže se podizanjem lijeve aurikule, a smješteno je na polovici linije između lijeve aurikule i početka plućnog debla. Arterija nije vidljiva na površini srca, no vena iznad nje se jasno prikazuje. Mjesto podvezivanja uvijek je isto te se nalazi u razini donjeg ruba lijeve aurikule (otprilike 2-3 mm od početka krvne žile).

Za podvezivanje je korišten neresorptivni, atraumatski konac, Prolene 8-0. Pri podvezivanju, formira se trostruki čvor te se makroskopski promatra srce kako bi se uočilo površinsko bljedilo, što je znak uspješnog podvezivanja (Slika 1A). Nakon fotografiranja tog prikaza, ukloni se retraktor kojim je raširen ošit te se ošit šiva neresorptivnim koncem, najčešće Prolene 7-0 ili 8-0, počevši od mišićnog prema tetivnom dijelu.

Prije učvršćivanja posljednjeg šava, napravi se reekspanzija pluća tako da se evakuira preostali zrak iz prsišta sukcijskom špricom. Nakon toga, životinja se odvoji od respiratora te krene samostalno disati nakon desetak sekundi. Trbušni zid se šiva jednostavnim produženim šavom, neresorptivnim koncem, a isto tako i koža. Provjere se kvaliteta šava i moguće krvarenje rane, pa se potom životinja prebacuje u svježe pripremljen kavez. Nakon toga se prati postoperativni oporavak tijekom 3 - 4 sata. Kao zadnji dio, snima se još jedan EKG nalaz koji potvrđuje definitivnu dijagnozu infarkta.

3.7. Protokol pripreme rezova

72 sata nakon izvođenja kirurškog postupka i izazivanja infarkta, životinje su žrtvovane. Srca su eksplantirana te fiksirana standardnim postupkom u 4% paraformaldehidu, otopljenom u 0.01 M fosfatnom puferu (engl. *AbCam fixation protocol for IHC*). Poslije tri dana fiksiranja, srca su isprana PBS-om te makroskopski fotografirana (Canon PowerShot A480, Canon, Japan, Slika 1B) i izrezana po horizontalnoj ravnini u tri dijela. Prvi rez izvodio se 2 mm ispod donjeg ruba lijeve aurikule, a drugi rez 4 mm ispod prvog reza (Slika 1C).

Od tako dobivena 3 dijela, srednji dio koristio se za uklapanje u parafinske blokove i analizu uzoraka. Proces uklapanja srca odvijao se najprije dehidriranjem uzoraka u uzlaznom gradijentu alkohola, potom ispiranjem u ksilolu te uklapanjem u parafinske blokove. Tako uklopljeni preparati rezali su se mikrotomom Leica RM 2155 (Leica Microsystems AG, Njemačka), na način da bismo dobili 20 - 25 rezova debljine 4 - 6 mikrometara po bloku. Potom bi se rezovi postavljali na silazirana stakla, a kod odabira reprezentativnih rezova uzimali su se u obzir oni rezovi na kojima se vidio cijeli infarkt.

Takvi rezovi potom su obojani rutinskim histološkim metodama (H&E i bojanje po Malloryju) po standardnom protokolu Laboratorija za eksperimentalnu neurokardiologiju. To je bilo potrebno da bi se uzorci mogli detaljno pregledati pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX40 Olympus, Japan) opremljenim fotografskim aparatom (Canon Powershot A480, Canon, Japan).

Uočeno je da je peri-infarktno područje bogato eritrocitnim infiltratom, a samo infarktno područje oskudno infiltrirano ili bez infiltracije, što je bilo korisno za daljnju demarkaciju kod obrade uzoraka. Također, bili su prisutni i ostali morfološki znakovi infarkta: promjene jezgara, gubitak poprečnog pruganja, upalna infiltracija, nekroza te hipereozinofilija citoplazme.

3.8. Tehnika imunofluorescencije

Prije imunofluorescencijskog bojanja, uzorci su deparafinirani u ksilolu po standardnom postupku, zatim dehidrirani u silaznom gradijentu alkohola, isprani u destiliranoj vodi te skuhani u citratnom puferu (pH=6.0). Nakon hlađenja te ispiranja, inkubirani su s primarnim protutijelima preko noći.

Primarna protutijela koja su korištena:

1. Mišje monoklonalno protutijelo na α SMA (ab7817, Abcam, UK) 1:500
2. Mišje monoklonalno protutijelo na CD68 (ab31630, Abcam, UK) 1:300

Nakon višestrukog ispiranja primarnog protutijela PBS-om, uzorci su inkubirani sat vremena u sekundarnom protutijelu:

Magareće anti mišje protutijelo (AF488J, Jackson laboratories, inc., USA) 1:300.

Poslije inkubacije, uzorci su više puta isprani PBS-om, zatim je na njih nanescena DAPI boja (4',6-diamidino-2-phenylindole) koja se veže za adenin-tiamin regije u DNK, da bi se tako prikazale jezgre. Nakon kratkog sušenja, rezovi su pokriveni pokrovnim stakalcem koristeći Immu-mount (Shandon, Pittsburgh, PA, SAD).

3.9. Mikroskopiranje uzoraka i fotografiranje reprezentativnih zona

Histološki preparati su pregledavani i fotografirani Olympus BX51 mikroskopom (Olympus, Japan) opremljenim Olympus DP 71 kamerom. Prethodno je svaki od fotografiranih uzoraka podijeljen na 3 reprezentativne zone: PIZ 1 (peri-infarktna zona 1), PIZ 2 (peri-infarktna zona 2) te PIZ EPI (peri-infarktna zona sub-epikardijalno) (Slika 1D), a za svaku zonu su prikupljene po 4 fotografije pri povećanju 40 puta. Ovaj je postupak ponovljen za sve uzorke, vodeći računa da za svaku fotografiju budu uključene iste postavke rezolucije (1608 x 1608) uz spot size od 0.1 %. Ekspozicija je bila postavljena na 1 sekundu, a analog gain na nulu.

Prikupljene fotografije su dalje analizirane u Adobe Photoshop CS6 Extended programu (Adobe, SAD). Preko opcije 'Magic Wand' odabrano se nekoliko nijansi zelene boje koje su uključivale sve intenzitete imunohistokemijskog signala na presjeku, koje bi postale zaokružene iscrtanim linijama. Aktiviranjem 'Measurement Log' funkcije program je izračunao ukupni broj zaokruženih zelenih polja i njihovu ukupnu površinu u pixelima. Ukoliko je na preparatu postojalo dijelova koji nisu bili prekriveni tkivom ili su postojale pukotine, njihova površina se izmjerila uz pomoć funkcije 'Magnetic Lasso' a vrijednost oduzela od ukupnog broja pixela za svaku fotografiju, koja je iznosila 2585664 pixela.

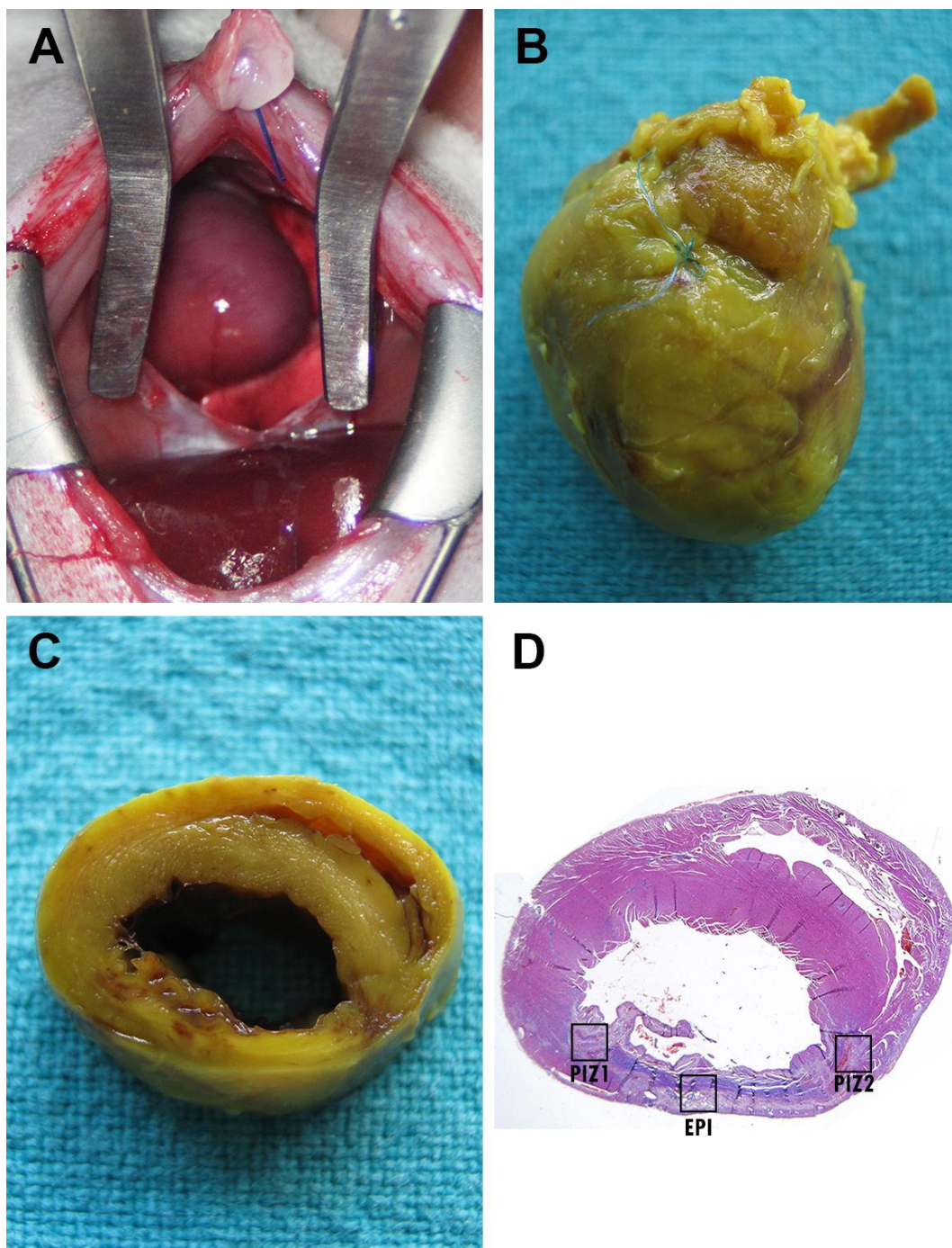
Ekspresiju markera smo izrazili kao apsolutni postotak ekspresije signala po formuli:

$$x = \frac{\text{pixela (pozitivni signal)}}{2585664 - \text{pixela (pukotine)}}$$

Iz tog razloga je rezultat koji smo dobili izražen u postotcima te je standardiziran i usporediv bez obzira o kojem se markeru radi.

3.10. Kvantificiranje podataka i statistička raščlamba

Medijan, interval pouzdanosti i interkvartilni raspon α -SMA i CD68 pozitivnih stanica su izračunati i uspoređeni za sve 3 eksperimentalne skupine. Statistička analiza je napravljena uz pomoć MedCalc softvera (Ostend, Belgija). Distribucija podataka je utvrđena Kolmogorov-Smirnovim testom. Za uspoređivanje podataka između skupina korišten je Mann-Whitney test. Statistička značajnost je postavljena na $P < 0,05$. Postotni i omjerni izrazi su korišteni da bismo prikazali deskriptivne podatke i usporedili ih s literaturom.



Slika 1. **A)** Prikaz kirurškog pristupa srcu s prikazanim ishemijskim bljedilom lijeve klijetke nakon uspješnog podvezivanja prednje interventrikularne arterije. **B)** Prednja površina srca koje je nakon četverodnevno post-infarktnog preživljavanja uklonjeno i imerzijski fiksirano. **C)** Poprečni presjek kroz sredinu obiju klijetki pokazuje stanjenje i amorfiju prednje stijenke, što se vidi i na histološkom presjeku **(D)** na kojem su označene zone koje su analizirane (PIZ 1 & 2 i EPI).

4. REZULTATI

4.1. Općenita opažanja

Histološki rezovi iz svake od istraživanih skupina tretirani su bojanjem po Malloryju i H&E (hematoksilin i eozin) bojanjem. Područje srčanog infarkta već je makroskopski bilo obilježeno izraženim smanjenjem debljine većeg dijela stijenke lijeve klijetke s gotovo potpunim gubitkom normalne strukture tkiva, uz jasno vidljivu staničnu infiltraciju i hiperemiju u području peri-infarktne zona (Slike 2C i D). U ovom radu korišteni su uzorci kod kojih je veličina infarkta bila veća od 30% cirkumferencije lijeve srčane klijetke, a infarcirano je područje imalo transmuralni karakter.

Peri-infarktne zone 1 i 2 (Slika 2D) obilovale su staničnom infiltracijom, što se moglo jasno vidjeti prikazivanjem jezgara DAPI bojanjem, posebno pod malim povećanjem (Slika 2A). Jednako tako, već pod malim povećanjem (10x), moglo se odmah uočiti snažno imuno-bojanje za oba čimbenika korištena u ovoj studiji, a u ovom slučaju prikazan je izražaj α -SMA (Slika 2B). Intenzivna stanična infiltracija, kao i snažan imunohistokemijski signal, mogli su se vidjeti i sub-epikardijalno (Slike 2C i D). Specifičnosti raspodjele imunoreaktivnosti jasno su se prikazale pod velikim povećanjem (40x). α -SMA imunoreaktivnost u infarciranom miokardu bila je osobito naglašena u stijenjkama krvnih žila svih veličina, ali i kao difuzno raspoređena zrnatost citoplazme velikih, izrazito nepravilnih i gusto raspoređenih staničnih profila, koji su se redovito miješali s obilnim eritrocitnim konglomeratima (Slika 2E). Ti stanični profili u potpunosti odgovaraju aktivnim miofibroblastima koji u ovoj fazi cijeljenja obilato infiltriraju infarcirane zone srčanog mišića.

CD68 imunoreaktivnost bila je prisutna na površini stanica, kao i u citoplazmi razmjerno velikih, gusto raspoređenih okruglih ili ovalnih staničnih profila s nesegmentiranim jezgrama, koji odgovaraju monocitno-makrofagnoj staničnoj populaciji (Slika 2F).

4.2. Izražaj α -SMA

Izračunati su i uspoređeni medijani i interkvartilni rasponi intenziteta zelenog signala stanica pozitivnih na α -SMA među istraživanim skupinama (Tablica 1). U ovoj studiji, s obzirom na osjetljivost metode detekcije nijansi bojanja preparata, nije uzet u obzir signal koji je bio vezan za stijenke krvnih žila, pa možemo tvrditi da se radi samo o gustoći miofibroblasta u peri-infarktnom tkivu.

Pregledom zdravog, infarktom nezahvaćenog srčanog mišića interventrikularne pregrade, α -SMA imunoreaktivnost pronađena je isključivo u stijenkama krvnih žila. Kad se peri-infarktne zone pokusnih skupina koje su konzumirale vodenu otopinu etanola i vino uspoređuju sa zonama skupine koja je konzumirala vodu, uočava se smanjenje intenziteta signala, što smo, radi jasnijeg prikazivanja, izrazili kao postotak smanjenja signala.

Postotak smanjenja u odnosu na kontrolnu skupinu (Voda) bio je gotovo identičan za obje pokusne skupine (Etanol i Vino) u peri-infarktним zonama 1 i 2, makar nije dostigao razinu statističke značajnosti. Taj postotak bio je još izraženiji kad su uspoređene sub-epikardijalne zone, ali je izrazitu statističku značajnost ($P=0,005$) dosegno samo u Etanol skupini, što se odrazilo i na rezultate usporedbe zbrojenih vrijednosti za svaku skupinu. Vinom uzrokovano smanjenje intenziteta signala iznosilo je 18%, ali nije doseglo razinu statističke značajnosti ($P=0,2$), a etanol je doveo do statistički značajnog smanjenja jačine signala ($P=0,003$) od 29%.

4.3. Izražaj CD68

Kada je uspoređena jačina signala CD68 pozitivnih stanica među zonama u ispitivanim skupinama, pronađeni su ponešto različiti trendovi u odnosu na α -SMA imunoreaktivnost.

U odnosu na životinje koje su konzumirale vodu, u ciljnim zonama životinja koje su pile vodenu otopinu etanola, ne samo da nije bilo atenuacije signala nego je za PIZ 1 i 2 izmjereno pojačanje signala od 12%, što nije bio slučaj za sub-epikardijalnu zonu gdje je izmjereno minimalno smanjenje od 5%. Kumulativni rezultat za skupinu Etanol je ipak bio porast od (statistički neznačajnih) 7%. Sve tri peri-infarktne zone vinske grupe, kada su uspoređene s grupom životinja koje su pile vodu, imale su pad jačine signala, koji je bio naročito izražen u sub-epikardijalnoj zoni (47%, $P=0,007$), što ipak nije dovelo do statistički značajne kumulativne atenuacije vinske skupine (27%, $P=0,119$).

Valja primijetiti da je učinak etanola i/ili vina na smanjenje intenziteta izražaja signala za oba markera bio jači u sub-epikardijalnoj zoni od učinka u peri-infarktним zonama 1 i 2. Rezultati mjerenja intenziteta i njihova međusobna usporedba prikazani su u Tablici 2.

Tablica 1. Izražaj α -SMA po eksperimentalnim skupinama u reprezentativnim zonama

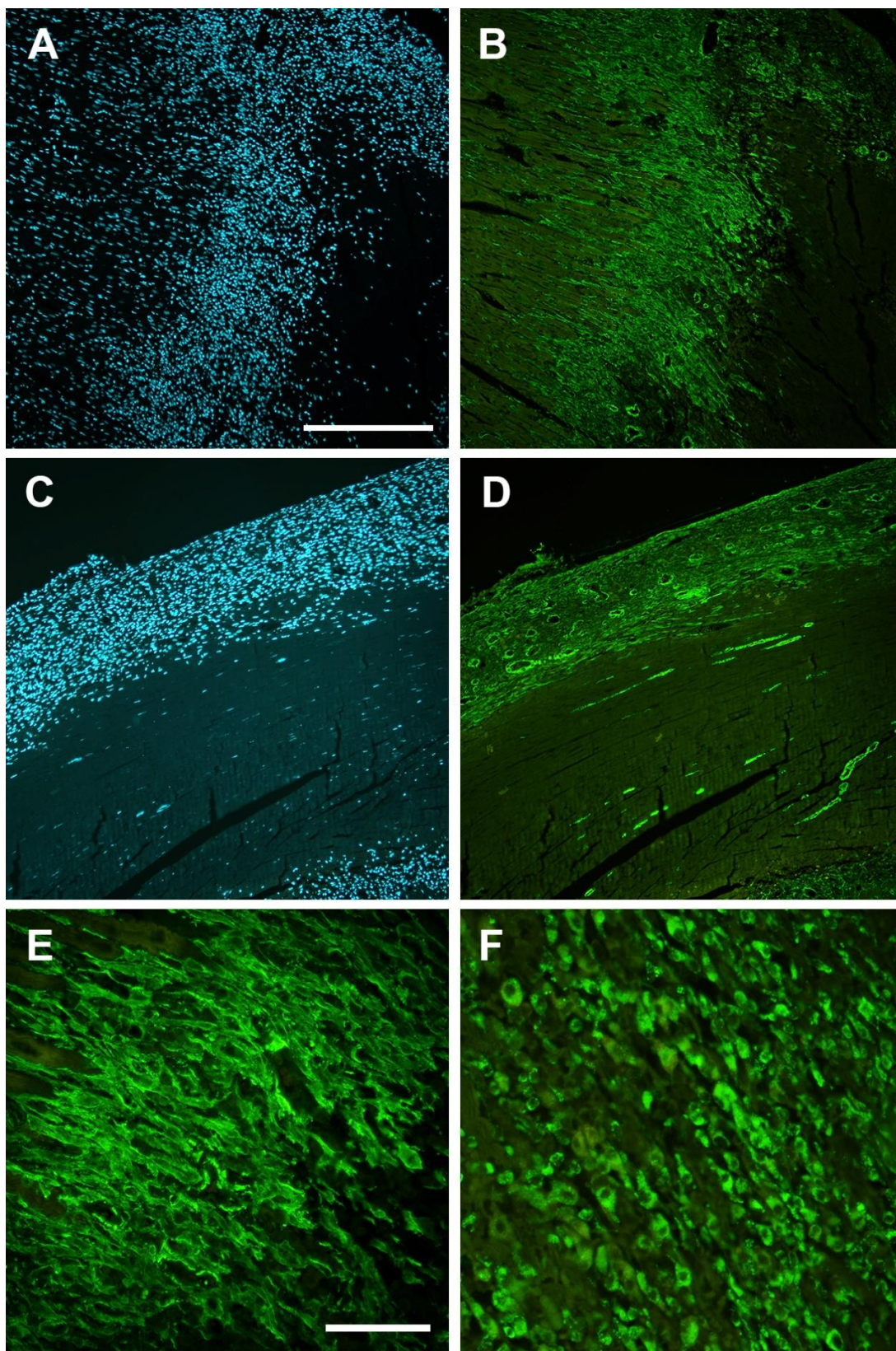
MARKER		α -SMA		
EKSPERIMENTALNA SKUPINA	Voda	Etanol	Vino	
Peri-infarktne zone (PIZ 1 i 2)	14,26 (12,64-20,12)	12,83 (7,97-17,8) 10% (P=0,161)	12,98 (10,12-16,36) 9% (P=0,275)	
Peri-infarktne zone (PIZ-EPI)	19,48 (15,79-26,92)	6,69 (5,03-14,83) 66% (P=0,005)	14,91 (11,54-26,14) 23% (P=0,42)	
Peri-infarktne zone (Zbroj)	16,42 (13,54-20,13)	11,72 (6,59-15,31) 29% (P=0,003)	13,41 (11,52-16,37) 18% (P=0,2)	

Medijan i interkvartilni raspon intenziteta α -SMA imunoreaktivnosti izračunati su za životinje koje su pile vodu (Voda), 13%-tnu otopinu etilnog alkohola (Etanol) i bijelo vino graševina (Vino), 4. dana oporavka od infarkta miokarda. Postotci predstavljaju smanjenje izražaja signala u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Voda).

Tablica 2. Izražaj CD68 po eksperimentalnim skupinama u reprezentativnim zonama

MARKER		CD68		
EKSPERIMENTALNA SKUPINA	Voda	Etanol	Vino	
Peri-infarktne zone (PIZ 1 i 2)	8,95 (4,4-11,28)	10,16 (7,88-12,76) +12% (P=0,353)	7,54 (6,56-11,31) 16% (P=0,942)	
Peri-infarktne zone (PIZ-EPI)	11,89 (8,09-12,83)	11,32 (8,15-14,45) 5% (P=0,954)	6,27 (5,45-7,93) 47% (P=0,007)	
Peri-infarktne zone (Zbroj)	9,85 (7,77-12,03)	10,78 (8,5-12,46) +7% (P=0,474)	7,2 (6,25-8,45) 27% (P=0,119)	

Medijan i interkvartilni raspon intenziteta CD68 imunoreaktivnosti izračunati su za životinje koje su pile vodu (Voda), 13%-tnu otopinu etilnog alkohola (Etanol) i bijelo vino graševina (Vino), 4. dana oporavka od infarkta miokarda. Postotci predstavljaju smanjenje izražaja signala u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Voda).



Slika 2. **A** DAPI bojanje jezgara i **B** α -SMA u peri-infarktnoj zoni 1.
C DAPI bojanje jezgara i **D** α -SMA u sub-epikardijalnoj zoni.
E α -SMA imunoreaktivnost i **F** CD68 imunoreaktivnost u peri-infarktnoj zoni 1
Mjerilo: **A-D** = 0.5 mm, **E i F** = 100 μ m,

5. RASPRAVA

Koristeći model permanentnog podvezivanja koronarne arterije za izazivanje infarkta miokarda, željeli smo u tri eksperimentalne skupine kvantificirati i usporediti izražaj dviju ključnih staničnih populacija u subakutnoj (proliferacijskoj) fazi procesa cijeljenja infarkta: miofibroblasta (α -SMA) i makrofaga/monocita (CD68).

Fibroblasti, kao 'rezidencijalne' stanice miokarda, ne samo da su bitni za stvaranje izvanstaničnog matriksa, nego su nezamjenjivi prilikom svakog remodeliranja srčanog mišića koje se događa u patološkim stanjima, kao što su hipertenzija, srčano zatajenje, a posebice srčani infarkt. U navedenim stanjima, fibroblasti svoje funkcionalne učinke ostvaruju preko diferencijacije u miofibroblaste, stanice koje izražavaju kontraktilne proteine (uključujući i α -SMA, koji je u ovom radu korišten za njihovu detekciju), te posjeduju osobita migracijska, proliferacijska i sekrecijska svojstva (30). Dok se u zdravom srčanom mišiću izražaj α -SMA nalazi samo u stijenkama krvnih žila, što smo i mi utvrdili pregledom dijela interventrikularne pregrade koji nije bio zahvaćen nekrozom, u infarciranom srčanom tkivu, posebno u peri-infarktним zonama, α SMA je naročito bitan kao biljeg miofibroblasta, stanica koje služe u prijenosu kontraktilne sile na srčani ožiljak preko kontakta njihovih mikrofilamenata s međustaničnom tvari (31).

Postavlja se pitanje optimalne količine miofibroblasta u ovoj fazi cijeljenja srčanog infarkta jer je tzv. „sazrijevanje“ infarkta proporcionalno povezano sa smanjenim brojem miofibroblasta u ožiljku te povećanjem broja zrelih, α -SMA pozitivnih krvnih žila (32), tako da se razina izražaja α SMA koristi kao važan čimbenik za procjenu dinamike cijeljenja infarkta. S druge strane, na životinjskim modelima ishemijsko-reperfuzijske ozljede, koja dugoročno ima bolju prognozu za nekomplikirano cijeljenje, dokazan je povećan izražaj α SMA tijekom proliferacijske faze cijeljenja infarkta u usporedbi s permanentnom okluzijom (15). Taj učinak bio je još naglašeniji u štakorskom ishemijsko-reperfuzijskom modelu kod kojeg se provodilo postkondicioniranje izofluranom, a veličina infarkta i kvaliteta peri-infarktne područja evaluirala se u istom (četverodnevnom) postinfarktnom periodu, kao u našem radu (33). Za razliku od toga, rezultati naših pokusa pokazuju blagi pad izražaja miofibroblasta u peri-infarktним zonama koji je bio gotovo identičan za obje pokusne skupine (etanol i vino) u usporedbi s izražajem kod kontrolne skupine (voda), sugerirajući veoma mali utjecaj umjerene konzumacije bijelog vina (i ekvivalenta s obzirom na koncentraciju etanola) na jačinu „sidrenja“ nekrotičnog dijela ventrikularne stijenke.

S obzirom na istovjetnost učinka za vinsku i etanolsku skupinu, za pretpostaviti je da je on rezultat utjecaja etanola, a ne nekog drugog sastojka bijelog vina. Utvrđeno je da pojavnost i gustoća izražaja miofibroblasta ovise i o mehaničkim silama u mikro-okolišu unutar ventrikularnog miokarda, naročito u ishemijsko-reperfuzijskim modelima (30). Stoga je posebno zanimljiv nalaz znatno veće atenuacije signala u sub-epikardijalnoj zoni, posebno kod životinja koje su konzumirale vodenu otopinu etanola u odnosu na kontrolnu skupinu. Ipak, ostaje nejasno kako to da je u etanolskoj skupini zabilježena dvostruko veća atenuacija od one u vinskoj skupini kod koje je također došlo do pada jačine signala, ali taj pad nije dosegao statističku značajnost.

Alkoholom uzrokovana atenuacija miofibroblasta mogla bi upućivati i na mogućnost da kod ovih životinja dolazi do brže transformacije iz proliferativne u završnu fazu cijeljenja ožiljka, u kojoj dolazi do apoptoze fibroblasta i ostalih stanica te sazrijevanja i stvaranja zrelog kolagenskog ožiljka. Osim toga, čini se da nešto manji broj miofibroblasta kroz čitavu proliferacijsku fazu može preventivno djelovati na komplikacije cijeljenja infarkta, jer je poznato da perzistirajuća visoka koncentracija miofibroblasta može uzrokovati patološku fibrozu, aritmije i konačno zatajenje srca (34).

Izražaj CD68, markera mononuklearnih leukocita monocitno/makrofagne linije, slijedio je ponešto drugačiji obrazac od izražaja α -SMA u našoj studiji: ukupno manji izražaj u svim zonama kontrolne i vinske skupine u odnosu na izražaj α -SMA. U etanolskoj skupini nije postojala atenuacija izražaja u odnosu na kontrolnu skupinu (voda), već je zabilježen rast intenziteta signala. Kod vinske skupine zabilježena je značajnija i jača atenuacija u sub-epikardijalnoj zoni, gdje je dosegla razinu statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu skupinu.

Poznato je da standardno bijelo vino sadrži jednostavne monofenole kao što su tirozol i kafeična kiselina, čiji su antiupalni učinci opisani u *in vitro* studijama (35). Utjecaj umjerene konzumacije bijelog vina na prirodu cijeljenja ožiljka nakon infarkta srca u štakorskom modelu opisan je u nedavno objavljenom radu grupe autora s Medicinskog fakulteta u Splitu (29), u kojemu je jedan od ciljeva bio istražiti potencijalni blagotvorni učinak prekondicioniranja standardnom i maceriranom graševinom na izražaj monocitno-makrofagne subpopulacije u srčanom tkivu nakon 24 sata od infarkta.

U ovoj studiji zabilježeno je značajno manje CD68 pozitivnih stanica u peri-infarktnim zonama vinskih grupa (standardne i macerirane graševine) kada su uspoređene s grupom životinja koje su pile vodu ($P < 0.001$). Smanjenje intenziteta signala u peri-infarktnim zonama iznosilo je 79% za standardno, odnosno 86% za macerirano vino u peri-infarktnim zonama 1 i 2, te 29% (standardno vino), odnosno 51% (macerirano vino) u sub-epikardijalnoj zoni. Razlog ovim statistički značajnim smanjenjima, u usporedbi s našim rezultatima, je u znatno većim izražajima CD68 imunoreaktivnosti u kontrolnih životinja koje su, kao i u našem pokusu, pile samo vodu. Makar su mjerenja izražaja CD68 provedena na različit način, ipak se donekle mogu usporediti te su gotovo identična za izražaj u peri-infarktnim zonama 1 i 2 u vinskoj skupini našeg pokusa i maceriranoj vinskoj skupini navedenog rada.

Uspoređujući izražaje između kontrolnih skupina (voda) u našoj i spomenutoj studiji, moglo bi se zaključiti da izražaj monocitno-makrofagne populacije dosegne svoj vrhunac znatno ranije nego što literatura sugerira (36), moguće nakon 36 do 48 sati od infarkta, jer se nakon 4 dana nalazi na razini koja je 4 do 5 puta manja. Kad se usporede vinske skupine, onda se dođe do zaključka da inicijalna vinom uzrokovana atenuacija ekspresije monocitno-makrofagne loze, koja nastaje u prvih 24 sata, perzistira i ne mijenja se u periodu od prvog do četvrtog postinfarktnog dana, sugerirajući da umjerena konzumacija vina dovodi ne samo do akutnog nego i produženog blagotvornog utjecaja na intenzitet upalnog procesa u peri-infarktnim zonama.

U ovoj, kao i u prethodno navedenoj studiji nismo bili u mogućnosti razlučiti subpopulacije makrofaga. Zna se, naime, da postoje barem dvije subpopulacije makrofaga (37), klasično aktivirani M1 makrofazi koji imaju veliki mikrobicidni potencijal i luče velike količine upalnih medijatora i alternativno aktivirani M2, antiupalni/pro-reparativni, s tim da M1 subpopulacija dominira područjem tri dana od inicijalnog događaja. Za očekivati je da 4 dana nakon infarkta u miokardu koegzistiraju ove dvije subpopulacije i bilo bi ih jako zanimljivo razlučiti te promatrati utjecaj vina i/ili vodene otopine etanola na njihove parcijalne ekspresije, ali nedostatak pouzdanih markera za sada onemogućava ove nadasve zanimljive pokuse.

Ono što bih izdvojila kao jedno od ograničenja naše studije je svakako mali broj životinja (3 u svakoj skupini) te bi trebalo povećati broj životinja, u svrhu dobivanja reprezentativnijih rezultata. Zatim bih navela ono što je problem većine eksperimentalnih modela, a to je primjenjivost rezultata u klinici, odnosno na ljudima. Čimbenici koji to ograničavaju su: dob (laboratorijske životinje su mlade i zdrave jedinke, a ljudska populacija koja razvije infarkt su stariji pacijenti, često s već razvijenom ishemijskom bolesti srca), prisutnost komorbiditeta koji mogu utjecati na ishode u općoj populaciji (hipertenzija, metabolički sindrom) te vrlo česta politerapija u kliničkoj praksi.

Manjkavost istraživanja na životinjskim modelima je i to što je teško pratiti dugoročne ishode, kao npr. preživljenje. Isto tako, sami patofiziološki mehanizam okluzije žile na životinjskom modelu (akutno podvezivanje) je različit u odnosu na razvoj infarkta u ljudi, a to je formiranjem tromba, odnosno rupturom nestabilnog plaka, što je rezultat kroničnog procesa koji započne mnogo prije samog akutnog događaja. Također, postoje razlike u fiziologiji srca između ljudi i štakora, pa su primjerice postinfarktne aritmije jedna od češćih komplikacija i uzroka smrti u ljudi, dok je na štakorskom modelu to ruptura ventrikula.

Nadalje, ima još prostora za napredak u metodologiji analize signala na fotografijama koje smo dobili u istraživanju, s obzirom na složenost strukture tkiva u području infarkta i peri-infarktno, prisutnost eritrocita koji mogu dati lažno pozitivni signal te opsežnost samog infarkta. Što se tiče uloge upale u cijeljenju infarkta te tumačenja rezultata u tom kontekstu, istaknula bih da su potrebna istraživanja koja će dati precizniji zaključak o tome u kojem opsegu je upala potrebna za optimalno cijeljenje i koji bi markeri bili vjerodostojan odraz jačine i dinamike upalnog procesa.

Kod razmatranja protektivnih učinaka vina, bilo bi korisno kada bi se provelo više istraživanja o svojstvima pojedinih sastojaka vina te kada bi se s tim sastojcima pripravile formulacije koje bi se mogle primijeniti u pokusima. Na taj način mogli bismo konkretnije uspoređivati razlike između učinka etanola u usporedbi s različitim vrstama vina i ostalim alkoholnim pićima.

6. ZAKLJUČCI

1. Vodena otopina etanola i vino imaju blagi utjecaj na smanjenje izražaja miofibroblasta u peri-infarktnim zonama na 4. dan cijeljenja, u usporedbi s vodom, s tim da je statistički značajna razlika prisutna samo za vodenu otopinu etanola.
2. Utjecaj vina i vodene otopine etanola na smanjenje izražaja miofibroblasta bio je značajniji za sub-epikardijalnu peri-infarktnu zonu (PIZ EPI) u odnosu na zone „sidrenja“ infarkta (PIZ1 i PIZ2).
3. Izražaj makrofaga u peri-infarktnim zonama na 4. dan cijeljenja nakon infarkta je 4 - 5 puta manji u odnosu na izražaj tih stanica 1. dana.
4. Vino uzrokuje blago smanjenje izražaja makrofaga 4. dana nakon cijeljenja infarkta, što predstavlja nastavak istog trenda u odnosu na 1. dan nakon cijeljenja, s tim da je statistički značajna razlika prisutna samo za sub-epikardijalnu peri-infarktnu zonu (PIZ EPI), dok razlika za zone „sidrenja“ (PIZ1 i PIZ 2) nije statistički značajna.

7. SAŽETAK

Cilj: Ispitati utjecaj konzumacije vodene otopine etanola i bijelog vina na cijeljenje akutnog infarkta miokarda u proliferacijskoj fazi (4. dan od nastanka infarkta) u odnosu na kontrolnu skupinu koja je konzumirala vodu te utvrditi izražaj α -SMA (engl. *alpha smooth actin*) kao markera miofibroblasta te CD68 kao markera makrofaga i moguće razlike u izražaju tih markera između kontrolne i pokusnih skupina.

Materijali i metode: Devet životinja randomizirano je u tri skupine od kojih je jedna skupina pila vodu, druga bijelo vino, a treća vodenu otopinu etanola, tijekom 28 dana. Nakon toga su podvrgnute podvezivanju prednjeg silaznog ogranka lijeve koronarne arterije, izazivajući infarkt miokarda. Nakon 72 sata, životinje su žrtvovane, srca eksplantirana te su iz njih dobiveni rezovi koji su obrađeni i imunohistokemijski obojani. Određene su tri reprezentativne peri-infarktne zone u kojima se mjerio izražaj signala već navedenih markera, α -SMA i CD68.

Rezultati: U kontekstu izražaja α -SMA, u odnosu na kontrolnu skupinu (Voda), utvrđeno je sniženje intenziteta signala za 29% ($P=0,003$) kod pokusne skupine Etanol, dok je za pokusnu skupinu Vino utvrđeno sniženje intenziteta signala za 18% ($P=0,2$). Što se tiče izražaja CD68, u odnosu na kontrolnu skupinu, kod pokusne skupine Etanol zabilježen je porast intenziteta signala od 7% ($P=0,474$), dok je za skupinu Vino zabilježeno sniženje intenziteta signala od 27% ($P=0,119$).

Zaključak: Vodena otopina etanola i vino imaju blagi utjecaj na smanjenje izražaja miofibroblasta u peri-infarktним zonama na 4. dan cijeljenja, s tim da je statistički značajna razlika prisutna samo za vodenu otopinu etanola. Vino uzrokuje blago smanjenje izražaja makrofaga u peri-infarktnoj zoni, no bez statistički značajne razlike.

8. SUMMARY

Thesis title:

THE EFFECT OF THE CONSUMPTION OF WHITE WINE AND ITS AQUEOUS ETHANOL SOLUTION EQUIVALENT TO THE PROLIFERATIVE PHASE OF THE INFARCT HEALING IN RATS

Aim: To examine the effect of the consumption of white wine and its aqueous ethanol solution equivalent to the proliferative phase of the infarct healing by determining the expression of α -SMA (alpha smooth actin) as a marker of myofibroblasts and CD68 as a marker of macrophages. Differences in expression are compared between water consuming controls and experimental groups.

Materials and Methods: Nine animals were randomized into three groups: water drinking controls, consumers of white wine, and consumers of 13% aqueous ethanol solution, to which they were exposed for 28 days. They were then subjected to the operative ligation of the anterior descending branch of the left coronary artery, causing myocardial infarction. 72 hours after the operation, the animals were sacrificed, the hearts were explanted, and sections were prepared and processed for immunohistochemistry. Three representative peri-infarction zones were determined and the signal expression of α -SMA and CD68 was measured and compared.

Results: When α -SMA expression was compared to the control group (water), a decrease in signal intensity of 29% ($P=0.003$) was found in the ethanol experimental group while for the wine group a decrease in signal intensity of 18% was found ($P=0.2$). Regarding the expression of CD68, compared to the control group, in the experimental ethanol group an increase in signal intensity of 7% ($P=0.474$) was found, while for the wine group there was a decrease in signal intensity of 27% ($P=0.119$).

Conclusion: Aqueous ethanol solution and white wine have a mild effect on the reduction of the myofibroblast expression in peri-infarction zones on the 4th day of healing, with a statistically significant difference present only for aqueous ethanol solution. Wine causes a mild decrease in macrophage expression in the peri-infarction zone, but without a statistically significant difference.

9. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Saleh M, Ambrose JA. Understanding myocardial infarction. *F1000Res*. 2018;7:F1000 Faculty Rev-1378.
2. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*. 1991;42:225-46.
3. Kolwicz SC Jr, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*. 2013;113(5):603-16.
4. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(5):H1723-41.
5. Jennings RB, Reimer KA. Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol*. 1981;102(2):241-55.
6. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(3):504-11.
7. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016;119(1):91-112.
8. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(5):255-65.
9. Andreadou I, Cabrera-Fuentes HA, Devaux Y, Frangogiannis NG, Frantz S, Guzik T i sur. Immune cells as targets for cardioprotection: new players and novel therapeutic opportunities. *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1117-30.
10. Ma Y, Yabluchanskiy A, Iyer RP, Cannon PL, Flynn ER, Jung M i sur. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2016;110(1):51-61.
11. Ma Y, Iyer RP, Jung M, Czubryt MP, Lindsey ML. Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(5):448-58.
12. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(4):945-53.
13. Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Transl Res*. 2016;167(1):152-66.
14. Clément S, Stouffs M, Bettiol E, Kampf S, Krause KH, Chaponnier C i sur. Expression and function of alpha-smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 2):229-38.

15. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res.* 2000;48(1):89-100.
16. Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol.* 1994;145(4):868-75.
17. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J i sur. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1340-55.
18. Fu X, Khalil H, Kanisicak O, Boyer JG, Vagnozzi RJ, Maliken BD i sur. Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J Clin Invest.* 2018;128(5):2127-43.
19. Shinde AV, Humeres C, Frangogiannis NG. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(1):298-309.
20. de Couto G, Liu W, Tseliou E, Sun B, Makkar N, Kanazawa i sur. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2015;125(8):3147-62.
21. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017;97(1):4-13.
22. Ma Y, Mouton AJ, Lindsey ML. Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl Res.* 2018;191:15-28.
23. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation.* 2010;121(22):2437-45.
24. Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000;66(8):663-73.
25. Pavlidou E, Mantzourou M, Fasoulas A, Tryfonos C, Petridis D, Giaginis C. Wine: An Aspiring Agent in Promoting Longevity and Preventing Chronic Diseases. *Diseases.* 2018;6(3):73.
26. Flamini R, Mattivi F, De Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):19651-69.
27. Krenz M, Korthuis RJ. Moderate ethanol ingestion and cardiovascular protection: from epidemiologic associations to cellular mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(1):93-104.
28. Baghaturia NS. Georgian winemaking. Theory and practice. Tbilisi: Vlastita naklada; 2010.

29. Ključević N, Boban D, Milat AM, Jurić D, Mudnić I, Boban M i sur. Expression of Leukocytes Following Myocardial Infarction in Rats is Modulated by Moderate White Wine Consumption. *Nutrients*. 2019;11(8):1890.
30. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther*. 2009;123(2):255-78.
31. Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res*. 1998;38(3):545-8.
32. Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(1):71-9.
33. Agnić I, Vukojević K, Saraga-Babić M, Filipović N, Grković I. Isoflurane post-conditioning stimulates the proliferative phase of myocardial recovery in an ischemia-reperfusion model of heart injury in rats. *Histol Histopathol*. 2014;29(1):89-99.
34. Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6(1):5.
35. Bertelli AA, Migliori M, Panichi V, Longoni B, Origlia N, Ferretti A i sur. Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:295-301.
36. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL i sur. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204(12):3037-47.
37. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549-55.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODATCI

Ime i prezime: Anđela Pijuk

Datum i mjesto rođenja: 3. srpnja 1995. godine, Split

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Pijuci 6, 22322 Ružić, Republika Hrvatska

Telefon: +385 91 427 9009

E-adresa: andjela.pijuk@gmail.com

OBRAZOVANJE

2002. – 2010. Osnovna škola „Antuna Mihanovića Petropoljskog“, Gradac

2004. – 2010. Osnovna glazbena škola „Krsto Odak“, Drniš

2010. – 2014. Srednja škola „Ivana Meštrovića“, Drniš, opća gimnazija

2014. – 2020. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studij Medicina

STRANI JEZICI

Engleski jezik (aktivno)

Talijanski jezik (osnove)

Njemački jezik (osnove)

AKTIVNOSTI

Demonstrature:

Demonstratorica na Katedri za anatomiju Medicinskog fakulteta u Splitu (2015. – 2020.)

Demonstratorica na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Splitu (2016. – 2019.)

Demonstratorica na Katedri za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u Splitu (2015.)

Nagrade:

Dobitnica Dekanove nagrade 2019. za izvrstan uspjeh u akademskoj godini 2017./2018.

Dobitnica Rektorove nagrade 2020. za izvrsnost u akademskoj godini 2018./2019.

Edukacije:

Pohađala „Pre-conference short course on epigenomics by Mayo clinic“ 16. 6. 2019. u sklopu 9. ISABS kongresa u Splitu 17. – 22. 6. 2019.

Stručna praksa u Psihijatrijskoj bolnici Rab u trajanju od 2 tjedna (2017. i 2018. godine).

Volontiranje:

Volontiranje u KBC-u Split za vrijeme pandemije COVID-19 (svibanj 2020.).

Organizacija skupova, projekata i ostalo:

Članica organizacijskog odbora Međunarodnog skupa „Praktična znanja za studente 2019.“, 2017. i 2018. volonter na istoimenom skupu.

Članica organizacijskog odbora projekta „Nobel Days“ (znanstveni skup na kojem su četvorica dobitnika Nobelove nagrade održali predavanja o svojim otkrićima), 2019.

Sudjelovanje u organizaciji Tjedna mozga i Dana otvorenih vrata Medicinskog fakulteta u Splitu (2018. i 2019.) te drugih događaja na Medicinskom fakultetu u Splitu.

Članica uredništva Glasnika Medicinskog fakulteta u Splitu (2019./2020.).

PUBLIKACIJE

Babic A, Pijuk A, Brázdilová L, Georgieva Y, Raposo Pereira MA, Poklepovic Pericic T, Puljak L. The judgement of biases included in the category "other bias" in Cochrane systematic reviews of interventions: a systematic survey. BMC Med Res Methodol. 2019;19(1):77.