

Utjecaj postkondicioniranja izofluranom na histološke razlike u cijeljenju srčanog infarkta štakora

Agnić, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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:171:821865>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Agnić

UTJECAJ POSTKONDICIONIRANJA IZOFLURANOM NA HISTOLOŠKE
RAZLIKE U CIJELJENJU SRČANOG INFARKTA ŠTAKORA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2013.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za neurokardiologiju pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu kao dio projekta «Mehanizmi srčane boli u ishemiji, metaboličkim promjenama i u starosti» broj: 216-2160528-0067 odobrenog od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa.

Voditelj rada: Prof.dr.sc. Ivica Grković

Zahvaljujem mentoru profesoru Ivici Grkoviću na stručnoj i ljudskoj pomoći koju je nesebično pokazao tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem svim kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju koji su mi na razne načine pomogli tijekom izrade disertacije. Od srca hvala docenticama Vukojević i Filipović na prijateljskoj i stručnoj pomoći tijekom protekle 3 godine te tehničarki Asiji Miletić čije znanje mi je često bilo dragocjeno.

Hvala Bogu na strpljenju i snazi koju mi je dao. Disertaciju posvećujem mojoj obitelji koja mi je bila oslonac kad je bilo najteže.

Popis oznaka i kratica	v
1. UVOD	1
1.1. Građa i opskrba srca	1
1.2. Patologija ishemijsko-reperfuzijske ozljede	2
1.3. Patofiziologija ishemijsko-reperfuzijske ozljede	2
1.4. Postkondicioniranje srčanog mišića	3
1.5. Faze cijeljenja infarkta	7
1.6. Biljezi za histološko praćenje cijeljenja infarkta	8
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	11
2.1. Hipoteze	11
3. METODE I MATERIJALI	12
3.1. Pokusne životinje	12
3.2. Postupci	12
3.2.1. Kirurški model ishemijsko-reperfuzijske ozljede u štakora	12
3.3. Materijali	15
3.3.1. Protokoli pripreme rezova i imunohistokemijskih bojanja	15
3.3.2. Određivanje veličine infarkta te analiza imunohistokemijskih bojanja	18
3.4. Statistički postupci	20
4. REZULTATI	21
4.1. Kvalitativne razlike u području infarkta	21
4.2. Veličina infarciranog područja	23
4.3. Rezultati imunohistokemijskih bojanja	25
4.3.1. Izražaj VEGF-a	25
4.3.2. Izražaj PECAM-1/CD31	27
4.3.3. Izražaj nestina	29
4.3.4. Kolokalizacija nestina i CD31	31
4.3.5. Nestin imunoreaktivni kardiomiociti	31
4.3.6. Izražaj α SMA	34
5. RASPRAVA	37
6. ZAKLJUČCI	48
7. SAŽETAK	49
8. SUMMARY	50
9. LITERATURA	51
10. ŽIVOTOPIS	57

Popis oznaka i kratica

ATP - adenzin-trifosfat

mPTP - (engl. *mitochondrial transition permeability pore*) - tranzicijska propusna pora na mitohondriju

PI3K - fosfatidilinozitol-3-kinaza

MAPK - (engl. *mitogen-activated protein kinases*) - mitogenima aktivirane protein kinaze

ERK - (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) - izvanstaničnim signalom regulirana kinaza

nf- κ B - (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) - jezgrin čimbenik koji povećava prepisivanje lakih lanaca aktiviranih B stanica

eNOS - endotelna NO sintetaza

GSK-3 β - kinaza glikogen sintetaze - 3 β

LAD - (engl. *left anterior descending coronary artery*) – prednja interventrikularna grana lijeve koronarne arterije

PBS - (engl. *phosphate buffer saline*) - otopina fosfatnog pufera

VEGF - (engl. *vascular endothelial growth factor*) - čimbenik rasta koji potiče stvaranje novih krvnih žila

α -SMA - (engl. *α smooth muscle actin*) – α -aktin glatkih mišićnih stanica

PECAM-1/CD31 - (engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) - adhezijski glikoprotein na endotelu

HIF-1 α - (engl. *hypoxia-inducible factor 1 α*) - proteinski čimbenik koji je esencijalan za odgovor stanice i organizma na hipoksiju

MAK - minimalna alveolarna koncentracija

1. UVOD

1.1. Građa i opskrba srca

Srčana stijenka sastoji se od tri sloja: unutrašnjeg sloja ili endokarda, središnjeg sloja ili miokarda te vanjskog sloja ili epikarda.

Endokard izgrađuje jedan sloj pločastih epitelnih stanica koje leže na tankom sloju rahlog vezivnog tkiva. U subendokardijalnom području stijenke koje se nalazi između endokarda i miokarda nalazi se vezivno tkivo bogato krvnim žilama, živcima i provodnim Purkinjeovim stanicama. Miokard je najdeblji sloj srčane stijenke, a grade ga srčane mišićne stanice (kardiomocioti) koje spiralno okružuju klijetke srca stvarajući kontraktilnu stijenku.

Epikard pokriva vanjsku površinu srca i početne ili završne dijelove velikih krvnih žila na srčanoj kruni. Građen je kao jednoslojni pločasti epitel ispod kojeg se nalazi sloj vezivnog tkiva.

Srce je šuplji organ, troslojna stijenka čini zidove 4 šupljine i to: dvije pretklijetke i dvije klijetke. Kroz desnu pretklijetku i klijetku teče venska krv, dok kroz lijevu pretklijetku i klijetku teče arterijska krv. Pretklijetke od klijetki, kao i klijetke od ishodišta velikih krvnih žila, odvajaju srčani zalisci koji omogućuju jednosmjerni tok krvi. Središnje vezivno područje srca građeno je od čvrstog vezivnog „kostura“ na koji se hvataju zalisci i mišićne stanice koje izgrađuju miokard. Srčani mišić je opskrbljen krvlju preko dvije koronarne arterije: *arteria coronaria dextra et sinistra*. Desna koronarna arterija započinje u desnom koronarnom sinusu aorte te se pruža kroz *sulcus coronarius* i završava kao *ramus interventricularis posterior* u stražnjoj interventrikularnoj brazdi. U većini slučajeva opskrbljuje krvlju desnu pretklijetku i klijetku, stražnji dio lijeve klijetke i interventrikularnog septuma, sinuatrijski čvor te stražnji papilarni mišić lijeve klijetke.

Lijeva koronarna arterija polazi iz lijevog koronarnog sinusa aorte te prošavši između plućne arterije i lijeve aurikule daje:

- *ramus interventricularis anterior* koji ide kroz istoimenu brazdu na srcu
- *ramus circumflexus* koji prolazi kroz *sulcus coronarius*.

Opskrbljuje krvlju prednji dio interventrikularnog septuma, lijevu pretklijetku i klijetku, prednji papilarni mišić lijeve klijetke te manji dio desne klijetke zajedno sa prednjim papilarnim mišićem. Broj i veličina koronarnih arterija može varirati.

1.2. Patologija ishemijsko-reperfuzijske ozljede

Srčani infarkt predstavlja odumiranje srčanih mišićnih stanica zbog nedovoljne opskrbe miokarda kisikom, a uzrokuje ga djelomična ili potpuna obustava protoka krvi kroz koronarnu arteriju ili neku od njezinih grana. U većini slučajeva posljedica je aterosklerotskih promjena stijenke koronarnih arterija koje dovode do suženja arterijskog lumena.

Veličina infarkta miokarda ovisi o lokalizaciji aterosklerotskog plaka, o brzini njegova nastanka te o veličini plaka. Infarkt je veći što je začepljenje nastalo bliže početku koronarne arterije, naročito ako je začepljenje potpuno i ako je naglo nastalo. Subendokardijalni infarkt nastaje kod djelomičnog začepjenja krvne žile te obuhvaća samo trećinu do polovinu debljine srčane stijenke uz endokard. Potpuno začepljenje koronarne arterije u pravilu uzrokuje infarkt transmuralnog tipa, u kojem ishemične promjene zahvaćaju cijelu debljinu srčanog mišića. Transmuralni infarkt se najčešće događa u stijenci lijeve klijetke i interventrikularnoj pregradi, a uzrokovan je začepljenjem prednje silazne grane lijeve koronarne arterije [1].

Kako veličina srčanog infarkta ovisi i o trajanju začepjenja krvne žile, nastoji se što prije ponovno uspostaviti protok krvi, preporučljivo unutar "zlatnog sata" (prvi sat vremena od nastanka simptoma) [2]. Najbolje terapijske opcije koje se u tu svrhu koriste obuhvaćaju perkutanu koronarnu intervenciju, trombolizu ili kiruršku revaskularizaciju miokarda.

Ipak i sam proces ponovne perfuzije (re-perfuzija) oštećenog mišića, iako paradoksalno, povećava ozljedu koju je uzrokovala ishemija što je obuhvaćeno terminom ishemijsko-reperfuzijska ozljeda miokarda. Reperfuzijski dio ozljede nastaje zbog aktivacija apoptotskih procesa [3, 4], zbog mikrovaskularne disfunkcije i pojačanog upalnog odgovora [5] što zajedno dovodi do dodatne lezije srčanog mišića i pogoršanja ishemijske ozljede. Naime, ishemija uzrokuje odumiranje stanica procesom nekroze koju prati infiltracija upalnih stanica. Proces reperfuzije srčanog mišića smanjuje broj nekrotičnih stanica ali i povećava odumiranje stanica procesom apoptoze [6].

1.3. Patofiziologija ishemijsko-reperfuzijske ozljede

Srčani mišić je vrlo osjetljiv na ishemiju zbog nedostatka anaerobnih metaboličkih puteva i posljedično gubitka ATP-a. Već nekoliko minuta od početka ishemije nastaje nagli gubitak kontraktilnosti srčanog mišića zbog nakupljanja vodikovih iona i anorganskih fosfatnih aniona. Ako ishemija potraje više od 15 minuta počinje oštećenje unutarstaničnih mikrostruktura i stanična smrt.

Poželjna je što ranija reperfuzija miokarda zbog stvaranja ATP-a iz glukoze i masnih kiselina aerobnim metaboličkim putovima. Međutim, i sama reperfuzija je odgovorna za značajan dio ozljede miokarda. Brza normalizacija acidoze dovodi do nakupljanja kalcija unutar srčanih stanica [7, 8], dok nagli oporavak aerobnog metabolizma dovodi do pretjeranog nastanka slobodnih kisikovih radikala koji mogu potaknuti stanično oštećenje [9]. Do nakupljanja kalcija dolazi zbog aktivacije mehanizama koji se bore protiv acidoze. Naime, aktivacija $\text{Na}^+\text{-H}^+$ izmjenjivača i $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ nosača dovodi do visoke koncentracije natrija unutar stanica koji potom preko $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ izmjenjivača utječe na povećanje koncentracije kalcija.

Nakupljanje kalcija i slobodnih kisikovih radikala mogu potaknuti staničnu smrt uzrokujući nekrozu i apoptozu. Nekrozu potiču izravno oštećenje DNA (uzrokovano radikalima) te hiperkontraktura i ruptura mišićnih stanica (uzrokovano pretjeranim nakupljanjem kalcija) [10]. Ipak, konačni učinak reperfuzije je smanjenje broja stanica koje odumiru nekrozom jer joj je glavni uzrok ishemija. Apoptoza, koja je značajniji put stanične smrti u reperfuziji, je posljedica utjecaja kalcija i slobodnih kisikovih radikala na otvaranje pora unutar membrana mitohondrija (mPTP), te povećanja aktivnosti kaspaza [11].

Ostali oblici reperfuzijske ozljede obuhvaćaju “omamljenost” srčanog mišića (“*myocardial stunning*”), “*no-reflow* fenomen” i reperfuzijske aritmije. Omamljenost miokarda je reverzibilna mehanička disfunkcija od koje se srce obično oporavi unutar nekoliko dana ili tjedana, a najvjerojatnije je uzrokovana nakupljanjem kalcija [12]. No-reflow fenomen je najčešća komplikacija perkutane koronarne intervencije uzrokovana vazoaktivnim česticama koje zaustave protok krvi u mikrovaskulaturi. Ovaj fenomen je povezan s nepovoljnim ishodom liječenja [13]. Problem često stvaraju i aritmije koje nastaju neposredno nakon reperfuzije miokarda zbog navedenog elektrolitskog i mehaničkog disbalansa.

Sveukupno gledano, u kliničkoj praksi bilo bi poželjno što prije rekanalizirati koronarnu krvnu žilu, a onda nastojati smanjiti ozljedu i neželjene učinke izazvane reperfuzijom.

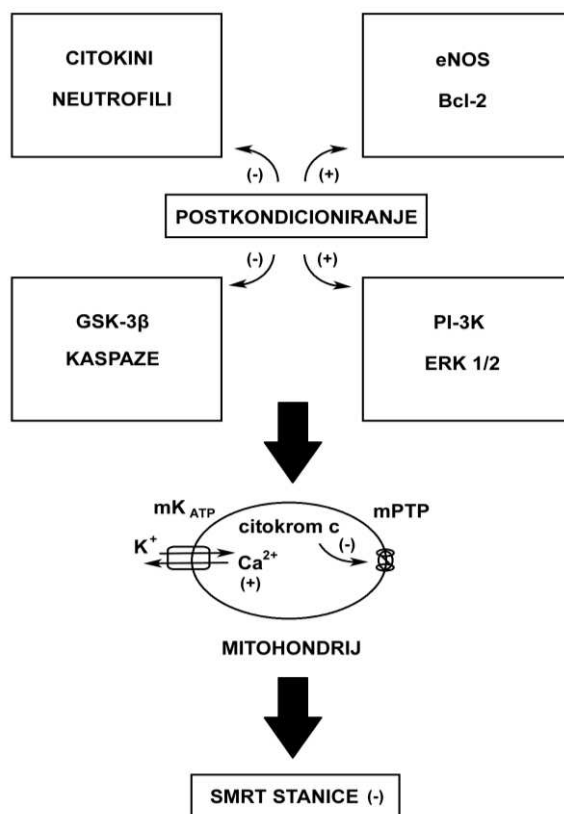
1.4. Postkondicioniranje srčanog mišića

Začepljenje koronarne arterije nemoguće je predvidjeti. Stoga se za smanjenje reperfuzijske ozljede miokarda koriste razni mehanički i farmakološki terapijski postupci primjenjivi neposredno prije ili na samom početku reperfuzije. Takav terapijski pristup nazvan je – postkondicioniranje. Koncept postkondicioniranja uveden je u znanstvenim studijama iz 70-tih i 80-tih godina prošlog stoljeća kada se kontroliranjem reperfuzijskog tlaka postiglo smanjenje lezije te bolja kontraktilna funkcija srčanog mišića [14].

Novije studije također naglašavaju važnost primjene terapijskih postupaka postkondicioniranja neposredno nakon reperfuzije [15, 16]. Korištenje serije kratkih epizoda okluzije i reperfuzije prije nego se uspostavi kompletna reperfuzija miokarda (tzv. *ishemijsko postkondicioniranje*) dovodi do smanjenja lezije miokarda, smanjene akumulacije neutrofila i kisikovih radikala, smanjene endotelne disfunkcije te smanjenja broja apoptotskih stanica [17]. Ishemijsko postkondicioniranje pokazalo je svoj učinak i u kliničkoj praksi smanjenjem oštećenja miokarda nakon perkutane koronarne intervencije [18]. Signalni putovi odgovorni za zaštitni učinak ishemijskog postkondicioniranja obuhvaćaju aktivaciju kinaza koje podržavaju preživljenje stanice (poput fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) i mitogenima aktivirane protein kinaze (MAPK), te enzima endotelne sintetaze dušičnog oksida (eNOS)), a predstavljaju ključne medijatore za regulaciju stanične nekroze i apoptoze. Promjena aktivnosti raznih antiapoptotskih proteina, kinaze glikogen sintetaze β (GSK-3 β) i mitohondrijske tranzicijske pore (mPTP) nalazi se na kraju navedenih puteva. Smatra se da je otvaranje mPTP ključni događaj u reperfuzijom induciranoj staničnoj smrti [19].

Slične učinke postkondicioniranja pokazale su i mnoge tvari dane neposredno prije ili na početku reperfuzije srčanog mišića dijeleći mnoge zajedničke signalne putove očuvanja stanice od nekroze i apoptoze kao i ishemijsko postkondicioniranje. Ovakav oblik terapijske intervencije nazvan je *farmakološko prekondicioniranje*, a neke od primijenjenih tvari su: adenzin, bradikinin, opiodi, statini, eritropoetin, ciklosporin [20]. Iako se neke od tih tvari već koriste u kliničkoj praksi, potrebne su dodatne studije za pojašnjenje njihovih učinaka.

Postkondicioniranje hlapljivim anestheticima počelo se primjenjivati u posljednjih 15-tak godina. U odnosu na ishemijsko postkondicioniranje, primjena hlapljivih anestetika na početku reperfuzije miokarda pokazuje sličnu razinu smanjenja infarkta srca u eksperimentalnih životinja, ali je puno poštenija metoda od napuhavanja balona u koronarnim arterijama. Mnogi mehanizmi odgovorni za kardioprotektivne učinke postkondicioniranja hlapljivim anestheticima već su poznati (Slika 1). Ovakav način postkondicioniranja miokarda svoj učinak ostvaruje preko aktiviranja signalnih puteva i enzima koji potiču preživljenje stanice. Iako i hipoksija sama po sebi aktivira iste mehanizme, postkondicioniranje hlapljivim anestheticima pojačava učinak. Poznato je da, kao i ishemijsko postkondicioniranje, aktivira put koji kreće od PI3K [21] i nastavlja preko GSK-3 β te eNOS-a [22]. Dokazan je i utjecaj postkondicioniranja hlapljivim anestheticima preko protein kinaze ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) koja je dio MAPK signalnog puta te utječe na migraciju, proliferaciju i preživljenje stanice [23, 24]. Postoje čvrsti dokazi o postojanju veze između aktivacije PI3K i ERK i smanjenja broja apoptotskih srčanih stanica tijekom postkondicioniranja hlapljivim anestheticima.



Slika 1. Shematski prikaz djelovanja postkondicioniranja hlapljivim anestheticima. mPTP - (engl. *mitochondrial transition permeability pore*) - tranzicijska propusna pora na mitohondriju; PI3K - fosfatidilinozitol-3-kinaza; ERK - (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) - izvanstaničnim signalom regulirana kinaza; eNOS - endotelna NO sintetaza; GSK-3 β - kinaza glikogen sintetaze - 3 β . Modificirano iz *Postconditioning in reperfusion injury: a status report*. Zhao ZQ. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010 Jun;24(3):265-79.

Jedan od odgovornih putova je i modulacija procesa apoptoze putem promjena u izražaju antiapoptotskih Bcl-2 proteina i razini kaspaza [25, 26], te preko utjecaja na mPTP [27]. Utjecaj na stanje otvorenosti mPTP-a se, i kod postkondicioniranja hlapljivim anestheticima, pokazao ključnim za smanjenje smrti stanica. Inamura i sur. su na izoliranim srcima zamorčadi pokazali kako postkondicioniranje sevofluranom, preko kinaza koje potiču preživljenje stanice, prevenira aktivaciju kaspaza te time smanjuje broj apoptotskih stanica [28]. *In vitro* studija Pravdića i sur. pokazala je kako postkondicioniranje izofluranom smanjuje staničnu smrt preko inhibicije otvaranja mPTP-a [29]. *In vivo* studija na zečevima pokazala je kako se utjecaj postkondicioniranja izofluranom na veličinu infarkta srca gubi ako pri tom koristimo supstancu koja otvara mPTP [30].

Izofluransko postkondicioniranje odgovorno je i za interakciju između otvaranja mitohondrijskih kalijevih kanala ovisnih o ATP-u (K-ATP kanali) i zatvaranja mPTP-a [31].

Feng i sur. su na izoliranim srcima štakora pokazali kako postkondicioniranje izofluranom prevenira otvaranje mPTP-a preko PI3K puta i GSK-3 β inhibicije [32]. Studija o postkondicioniranju miševa izofluranom Ge i sur. pokazala je važnost aktivacije eNOS-a i stvaranja dušičnog oksida u prevenciji otvaranja mPTP-a [33].

Dušični oksid (NO) je važan regulator apoptoze, blokira metabolizam antiapoptotskog proteina Bcl-2 i inaktivira nekoliko kaspaza [34, 35]. Također je bitan za rast i očuvanje endotelnih stanica. Stoga vjerojatno predstavlja put kojim postkondicioniranje hlapljivim anestetima smanjuje endotelnu disfunkciju [36, 37].

Smrt srčanih mišićnih stanica uzrokuje jaku upalnu reakciju što daje procesu upale bitnu ulogu u patofiziologiji ishemijsko-reperfuzijske ozljede [38]. Heindl i sur. pokazali su da sevofluran i izofluran smanjuju adheziju leukocita tijekom reperfuzije miokarda zamorčadi [39]. Chappell i sur. su u sličnoj studiji dokazali da sevofluran čuva glikokaliks u koronarnim arterijama što je razultiralo manjom adhezijom upalnih stanica tijekom reperfuzije [40]. Dokazano je također da postkondicioniranje hlapljivim anestetima smanjuje izražaj jezgrinog čimbenika nf- κ B što ima za posljedicu smanjeno prepisivanje citokina, kemokina i molekula potrebnih za adheziju upalnih stanica [41]. Dakle, postoje čvrsti dokazi koji upućuju da postkondicioniranje hlapljivim anestetima smanjuje upalni proces tijekom reperfuzije srčanog mišića.

Reperfuzija donosi rizik od malignih aritmija srca. Postoje studije koji upućuju da postkondicioniranje hlapljivim anestetima smanjuje broj i učestalost aritmija u periodu reperfuzije miokarda do razine da se čak i savjetuje kao antiaritmogena terapija [42].

Hlapljivi anestetici poboljšavaju funkciju miokarda u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi [33]. Koliki udio u ultrazvučno definiranom poboljšanju funkcije srca ima smanjenje infarkta a koliki dio smanjenje omamljenosti miokarda u reperfuziji za sada nije poznato. Utjecaj anestetika na potonji je nedovoljno definiran. Međutim, dokazano je na ishemijsko-reperfuzijskom modelu na svinjama da anestezija vođena izofluranom smanjuje omamljenost miokarda kao i učestalost postreperfuzijskih aritmija [43].

Nedvojbeno se zna da postkondicioniranje izofluranom smanjuje infarkt srčanog mišića, međutim većina studija na životinjama istraživala je akutne učinke, unutar nekoliko sati od početka reperfuzije. U kliničkoj praksi hlapljivi anestetici su pokazali kardioprotektivan učinak koji je naročito istražen kod kardiokirurških operacija postavljanja prenosnica.

Kod takvih zahvata koji predstavljaju oblik ishemijsko-reperfuzijske ozljede pacijenti anestetizirani hlapljivim anestheticima imaju manja oštećenja miokarda od onih anestetiziranih intravenskom anestezijom propofolom [44]. Učinak je najveći kada se hlapljivi anestetik primjenjuje tijekom cijele operacije, a manji, iako značajan, ako se primjenjuje samo kao prekondicioniranje ili postkondicioniranje [45]. Uvidom u dostupnu literaturu, učinak postkondicioniranja hlapljivim anestheticima na veličinu infarkta miokarda kod perkutane koronarne intervencije nije istražen.

1.5. Faze cijeljenja infarkta

Iako patogeneza ishemijsko-reperfuzijskog modela u štakora nije u potpunosti ista kao ona u čovjeka nakon rekanalizacije okludirane koronarne krvne žile, Fishbein i sur. su pokazali da je histološka evaluacija cijeljenja infarkta usporediva [46]. Štakor je prikladna životinja za proučavanje ishemijsko-reperfuzijske ozljede zbog minimalne ili odsutne kolateralne cirkulacije između koronarnih arterija [47].

Glavni princip cijeljenja infarkta srčanog mišića je zamjena odumrlog tkiva vezivnim kako bi se stvorio ožiljak i spriječila ruptura stijenke srca.

Proces cijeljenja infarkta se dijeli u tri faze:

1. faza upale ili akutna faza,
2. faza proliferacije ili subakutna faza
3. faza sazrijevanja ili kronična faza [48].

U akutnoj fazi dolazi do infiltracije infarciranog područja neutrofilima i makrofazima koji uklanjaju odumrle stanice. Ova faza počinje adhezijom neutrofila na endotel krvnih žila u području infarkta, a završava aktiviranjem putova koji potiču stvaranje veziva i krvnih žila što označava prijelaz prema fazi proliferacije [49].

Proliferativna faza u štakora se zbiva se između 3. i 7. dana nakon infarkta. Nahrendorf i sur. su istaknuli da podgrupa "kasnih" makrofaga potiče cijeljenje infarkta preko aktiviranja miofibroblasta i stvaranja novih krvnih žila, što dovodi do stvaranja prožiljenog granulacijskog tkiva. [50]

Miofibroblasti imaju strukturne i fenotipske karakteristike glatkih mišićnih stanica te sadrže kontraktilni aparat koji je ključan u borbi protiv stanjenja stijenke klijetke [51]. Nastaju diferenciranjem iz 3 izvora:

- iz stanica epikarda koje imaju fenotip fibroblasta
- iz progenitornih stanica
- monocitno-fibroblastnom transformacijom.

Glavni su izvor kolagena tipova I i III u infarciranom srčanom mišiću, a izlučuju i čimbenik koji potiče stvaranje novih krvnih žila (VEGF - engl. *vascular endothelial growth factor*).

Frangiogiannis i sur. su na psećem modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede miokarda pokazali da 3. dan od početka reperfuzije upravo miofibroblasti i endotelne stanice predstavljaju većinu proliferirajućih stanica koje se mogu naći u infarciranom području [52]. Studije pokazuju da određen broj navedenih stanica nastaje iz matičnih, progenitornih stanica koje u područje infarkta dolaze iz koštane srži ili već postoje u samom srcu [53]. Akumulacija miofibroblasta i sastav izvanstaničnog matriksa mijenjaju mehanička svojstva srca i rezultiraju promjenama u arhitekturi i geometriji klijetki. Ovaj proces, nazvan *remodeliranje klijetki*, toliko je bitan da se, ako u njemu postoje defekti, povezuje sa povećanim mortalitetom, većom incidencijom aritmija i kroničnim srčanim zatajenjem [54].

Dok aktivirani miofibroblasti proliferiraju i luče matriks čiju osnovu čini kolagen, endotelne stanice formiraju mrežu kapilara koja služi za dostavu kisika i zadovoljavanje metaboličkih potreba nužnih za cijeljenje infarkta. Povećanje gustoće krvnih žila rano nakon infarkta je način kako se srce bori protiv hipoksije ugroženog dijela srčanog mišića [55]. Dokazano je kako stvaranje novih krvnih žila smanjuje patološko remodeliranje i disfunkciju klijetki nakon infarkta srčanog mišića [56]. Mnoge studije pokazuju da poticanje stvaranja novih krvnih žila u periinfarktnom području poboljšava funkciju srca [57-59].

Krvne žile mogu nastati na dva načina:

1. vaskulogenezom kada žile nastaju “*de novo*” iz endotelnih progenitornih stanica te
2. angiogenezom koja uključuje grananje postojećih krvnih žila [60].

Angiogeneza uključuje i proces stvaranja pericitima siromašnih “majčinskih” krvnih žila koje nastaju proširenjem venula te stvaranje “kćeri”-kapilara i bogate kapilarne mreže [61].

Prijelazom u fazu sazrijevanja ili kroničnu fazu infarkta miokarda neke krvne žile bivaju prekrivene pericitima, sazrijevaju te se povećava broj arteriola. Endotelne stanice koje nisu prekrivene pericitima odumiru apoptozom, što dovodi do povlačenja nezrelih krvnih žila [62]. Miofibroblasti također odumiru apoptozom tijekom faze sazrijevanja [63]. Sazrijevanje i formiranje stijenke krvnih žila ima značajnu ulogu u inhibiciji stvaranja granulacijskog tkiva i završetku proliferacijske faze cijeljenja infarkta [64, 65].

Na kraju cijeljenja, granulacijsko tkivo se zamjenjuje hipocelularnim ožiljkom u kojem postoje rijetke matične stanice, kapilare i miofibroblasti, a prevladava kolagen. Kroničnoj fazi svojstveno je stanjenje infarkt zahvaćene stijenke uz reaktivnu hipertrofiju srčanih mišićnih stanica u području koje nije zahvaćeno infarkt. Kod ljudi je cijeljenje infarkta završeno nakon sedam tjedana, dok u štakora proces cijeljenja traje tri tjedna [46].

1.6. Biljezi za histološko praćenje cijeljenja infarkta

Cijeljenje srčanog infarkta složen je proces koji se odvija u tri faze. Izrazito je bitna faza proliferacije zbog već navedenog utjecaja na fazu sazrijevanja, a posljedično i na konačni izgled infarciranog dijela srčane stijenke te funkciju srca.

Za istraživanje osobitosti tih dviju faza cijeljenja infarkta koristili smo različite histološke biljege kako bi usporedili cijeljenje infarkta kod postkondicioniranja izofluranom s cijeljenjem kod kontrolnih životinja.

Dokazano je da reperfuzijska ozljeda u štakora značajno povećava razinu VEGF proteina te njegovu imunoreaktivnost između 3. i 7. dana nakon reperfuzije [66]. VEGF je čimbenik koji jako potiče vaskulogenezu i angiogenezu, mikrovaskularnu permeabilnost i vazodilataciju [67]. Važan je čimbenik i za migraciju i proliferaciju progenitornih stanica [68]. Dokazano je da se izražaj VEGF proteina pojačava u infarciranom tkivu nakon prekondicioniranja izofluranom [69]. Utjecaj postkondicioniranja izofluranom, kao i ostalih hlapljivih anestetika, na izražaj VEGF-a nije istražen.

Aktin glatkog mišićja (engl. *α -smooth muscle actin* - α SMA) je važan čimbenik za procjenu brzine cijeljenja infarkta. Dosada je dokazana α SMA imunoreaktivnost u miofibroblastima, glatkom mišićju krvnih žila te u pericitima, dok se u zdravom srcu α SMA izražaj nalazi samo u stijenci krvnih žila. Na životinjskim modelima ishemijsko-reperfuzijske ozljede dokazan je povećan izražaj α SMA tijekom proliferativne faze cijeljenja infarkta [70]. U infarciranom srčanom tkivu α SMA je naročito bitan kao biljeg miofibroblasta, stanica koje služe prijenosu kontraktilne sile na srčani ožiljak preko kontakta njihovih mikrofilamenata s međustaničnom tvari [71]. Sazrijevanje infarkta je povezano sa smanjenim brojem miofibroblasta i većim postotkom zrelih, α -SMA pozitivnih krvnih žila [62].

PECAM-1/CD31 (engl. *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) je transmembranski glikoprotein jako izražen na površini endotelnih stanica i to uglavnom na području gdje se stanica veže sa susjednom endotelnom stanicom. Osim na tim mjestima, može biti izražen i na trombocitima i većini podtipova leukocita [72]. PECAM-1 ima važnu ulogu u angiogenezi [73], te je dokazana njegova jaka imunoreaktivnost u novonastalim krvnim žilama ishemijsko-reperfuzijske ozljede miokarda [62]. Studije sugeriraju značajan utjecaj PECAM-1 na veze između endotelnih stanica te njihovu proliferaciju i migraciju, kao i na kapilarnu morfogenezu. Sugerira se i značajan utjecaj na eNOS aktivnost i bioraspoloživost NO-a. Izgleda da međudjelovanje PECAM-1-a i eNOS-a upravo na spojevima među stanicama ima značajnu ulogu u regulaciji eNOS aktivnosti [74].

Park i sur. pokazali su da se migracija i kapilarna morfogeneza stanica koje genetskim modificiranjem nisu imale PECAM-1 može obnoviti upravo ponovnim izražajem PECAM-1 te zaključuju da je bitan modulator angiogeneze preko utjecaja na proliferaciju, migraciju i apoptozu endotelnih stanica [73].

Nestin je protein intermedijarnih filamenata tip VI koji je prolazno izražen u brojnim tipovima stanica tijekom embrionalnog razvoja. Koristi se kao biljeg proliferirajućih nezrelih stanica tijekom regeneracije tkiva [75]. U skladu s tim, nađeno je da nestin imunoreaktivne stanice imaju ulogu u cijeljenju infarkta srčanog mišića štakora ali i ljudskog srca [76, 77]. Novije studije pokazuju jaki izražaj nestina u nezrelim, progenitornim stanicama iz kojih se mogu razviti različite subpopulacije stanica potrebne za cijeljenje infarkta srčanog mišića. Prošle su godine Beguin i sur. pokazali izražaj nestina u miofibroblastima kod cijeljenja infarkta u štakora [78]. Nadalje, na ljudskom i životinjskom modelu cijeljenja infarkta nađeno je da se iz nestin pozitivnih stanica mogu diferencirati stanice slične miocitima odnosno mladi, nezreli kardiomiociti [79]. Nestin imunoreaktivnost je također nađena i u proliferirajućim endotelnim progenitornim stanicama te u endotelnim stanicama tijekom stvaranja novih krvnih žila ishemijskom oštećenog štakorskog i ljudskog srca [80, 81]. Stoga se osim kao biljeg nezrelih, progenitornih stanica nameće i kao prikladan biljeg za “*de novo*” stvorene endotelne stanice i krvne žile kao i za miofibroblaste te kardiomiocite.

Koliko nam je poznato u literaturi ne postoje podaci o utjecaju postkondicioniranja hlapljivim anestheticima na izražaj α -SMA, PECAM-1 ili nestina u infarciranom području. Također, ne postoje studije koje histološki opisuju infarkt miokarda ili prate dinamiku cijeljenja infarkta kod postkondicioniranja hlapljivim anestheticima. S obzirom na navedeno, svrha našeg istraživanja je ispitivanje utjecaja postkondicioniranja izofluranom na veličinu i izgled infarkta te stvaranje granulacijskog tkiva i sazrijevanje infarkta. Naglasak je stavljen na stvaranje krvnih žila i miofibroblasta, te na diferencijaciju i broj progenitornih stanica, budući da su oni čimbenici za povoljno remodeliranje klijetki.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Uvidom u dostupnu literaturu nisu nađene studije koje pokazuju dugoročni utjecaj hlapljivih anestetika na veličinu infarkta te dinamiku cijeljenja infarkta uzrokovanog ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi djeluje li postkondicioniranje izofluranom kardioprotektivno u tom smislu. U svrhu postizanja navedenog u istraživanju je mjerena veličina infarkta te je histološki karakterizirano infarcirano područje tijekom subakutne i kronične faze cijeljenja. Naglasak je stavljen na razvoj novih krvnih žila i miofibroblasta koji omogućavaju bolje cijeljenje ozljede izazvane ishemijom i reperfuzijom. Praćenjem njihovih kvantitativnih i kvalitativnih vrijednosti 4.-og i 14.-og dana nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede utvrdit će se postoje li razlike u brzini cijeljenja infarkta između dviju pokusnih skupina. Istraživanje će utvrditi izražaj nestin imunoreaktivnih nezrelih progenitornih stanica u granulacijskom tkivu i pokazati postoji li razlika u njihovom broju tijekom cijeljenja infarkta kod kontrolnih i izofluranom postkondicioniranih štakora. Razlike u izražaju nestina kod subakutne i kronične faze cijeljenja infarkta sugerirale bi utjecaj izoflurana na brzinu cijeljenja infarciranog područja.

2.1. Hipoteze:

1. Postoje razlike u izgledu i veličini infarkta između kontrolne i izofluranske skupine 4. i 14. dan nakon ishemije i reperfuzije.
2. Postkondicioniranje izofluranom povećava udio VEGF pozitivnih stanica u subakutnoj fazi cijeljenja infarkta.
3. Postoje razlike u broju krvnih žila i miofibroblasta granulacijskog tkiva između kontrolne i izofluranske skupine štakora 4.dan nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede.
4. Postkondicioniranje izofluranom povećava broj progenitornih stanica u subakutnoj fazi cijeljenja infarkta.
5. Postkondicioniranje izofluranom uzrokuje bolje sazrijevanje infarkta te smanjuje broj progenitornih stanica i miofibroblasta, ali i povećava broj zrelih krvnih žila 14. dan nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede.
6. Broj nezrelih, „mladih“ kardiomiocita veći je kod kroničnog infarkta štakora postkondicioniranih izofluranom.

3. METODE I MATERIJALI

3.1. Pokusne životinje

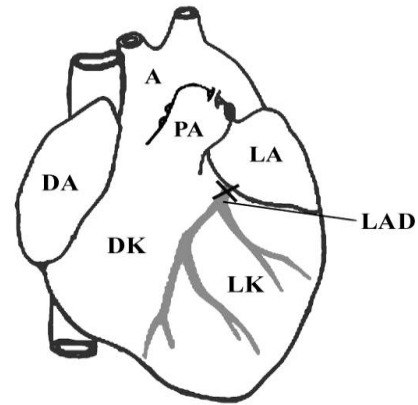
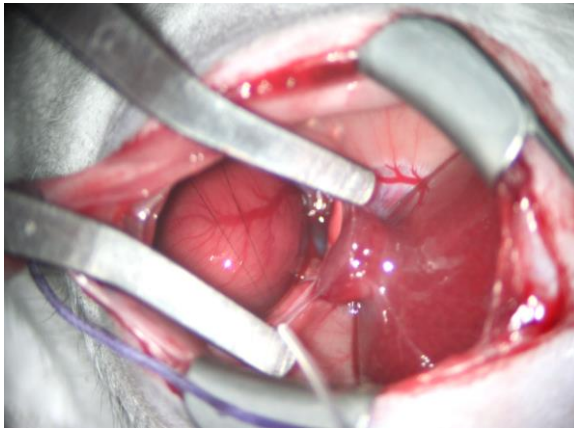
Istraživanje ima obilježja prospektivnog, randomiziranog pokusa koji prati i evaluira razvoj infarkta srca u štakora nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede sa i bez postkondicioniranja izofluranom. Istraživanje je dio projekta “Mehanizmi srčane boli u ishemiji, starosti i metaboličkim promjenama” odobrenog od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa broj: 216-2160528-0067. Za istraživanje je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, a provedeno je u skladu sa smjernicama za rukovanje laboratorijskim životinjama. (European Communities Council Directive 24.11.1986.) Pokusi su provedeni na ženskim štakorima soja Sprague-Dawley težine 175-225 grama, u dobi od 6.-9. tjedana, uzgojenim u Nastambi za laboratorijske životinje Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Tijekom pokusa životinje su boravile u pričuvnoj nastambi za životinje Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, u klimatski kontroliranim uvjetima s 12-satnim ciklusom dan-noć. Životinje su bile smještene u plastičnim kavezima sa dnom prekrivenim steljom te su imale slobodan pristup vodi i hrani.

Istraživanje se provelo na ukupno 45 životinja od kojih je 16 uključeno u studiju. Životinje su podijeljene u 4 skupine, po 4 životinje u kontrolnoj i izofluranskoj skupini žrtvovane 4. dan te po 4 u kontrolnoj i izofluranskoj skupini žrtvovane 14. dan nakon početka reperfuzije srčanog mišića (Slika 3). Ostale životinje nisu razvile srčani infarkt ili nisu preživjele do trenutka žrtvovanja te nisu uključene u studiju.

3.2. Postupci

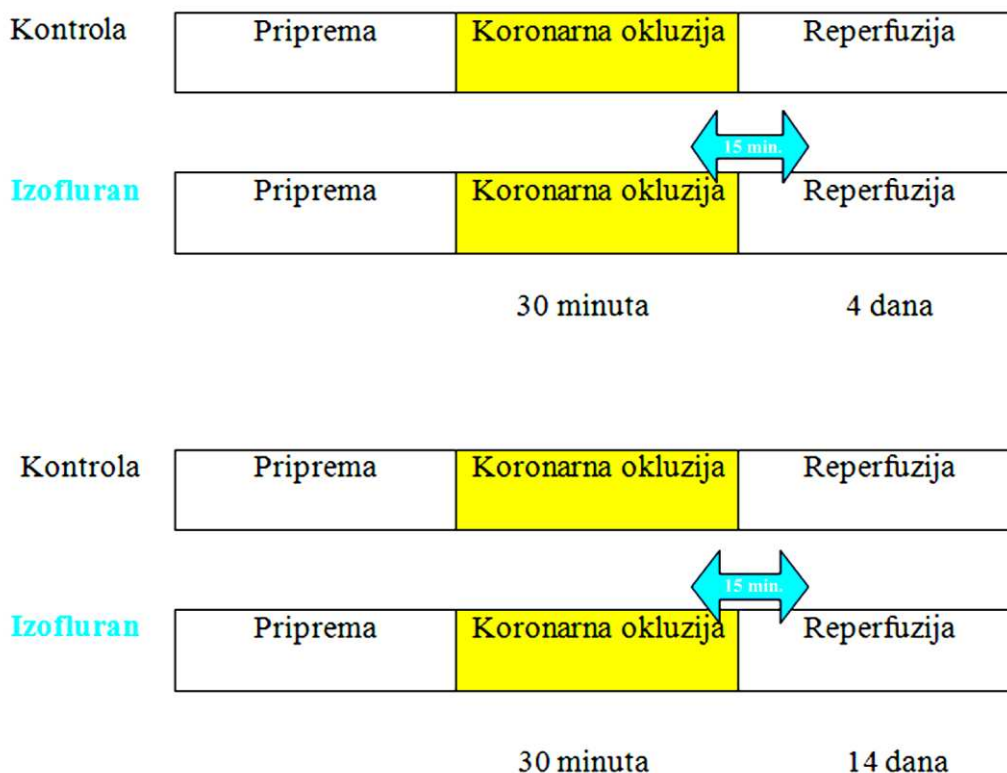
3.2.1. Kirurški model ishemijsko-reperfuzijske ozljede srca u štakora

Sve životinje anestezirane su intramuskularnom injekcijom mješavine ketamina (Ketaminol 10, 1.2 ml/kg, Intervet International, Netherlands) i ksilazina (Xylapan, 0.4 ml/kg, Vetoquintol, Švicarska) u stražnju skupinu mišića desne natkoljenice. Endotrahealna intubacija napravljena je pomoću 17-gauge venskog katetera.



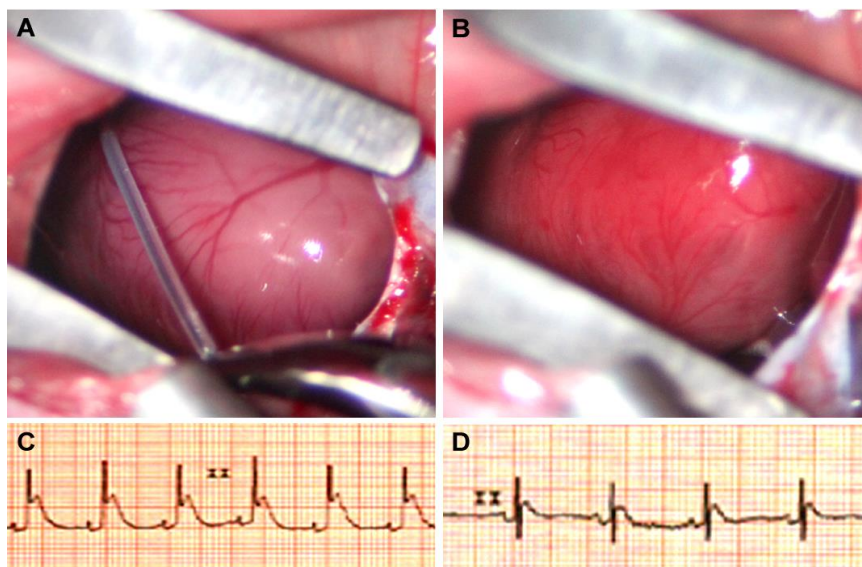
Slika 2. Kirurški model ishemijsko-reperfuzijske ozljede srca. Na fotografiji se vidi konac provučen kroz cjevčicu koju bi zatim pritisnuli prema žili i fiksirali stezaljkom 30 minuta, a potom otpustili. Na shemi štakorskog srca desno označeno je mjesto prolaska konca oko LAD (engl. *left anterior descending artery* – prednja interventrikularna grana lijeve koronarne arterije) neposredno ispod ruba lijeve aurikule. Desna klijetka (DK), desna aurikula (DA), lijeva klijetka (LK), lijeva aurikula (LA), aorta (A), plućna arterija (PA).

Štakori su bili položeni na ugrišanu podlogu. Korišten je abdominalni pristup srcu i LAD-u (engl. *left anterior descending artery* – prednja interventrikularna grana lijeve koronarne arterije) [82]. Uz pomoć kirurškog mikroskopa (Leica, M520 MC1, Švicarska) napravio se rez ošita duž središnje linije nakon čega su životinje bile spojene na respirator (SAR 830, CWE Inc, SAD). Pluća su bila ventilirana smjesom plinova kisik/zrak u odnosu 40/60 % s parametrima od 56 udisaja/min i udisajnim tlakom od 10-12 cm H₂O. Nakon što bi ošit raširili retraktorom te pažljivo oljuštiti perikard, jasno bi se prikazala površina srca. Podizanjem lijeve aurikule naišli bi na polazište LAD koje je smješteno na polovici linije između aurikule i početka debla plućne arterije. LAD nije bila vidljiva na površini srca ali se vidjela vena koja se nalazi neposredno iznad. Mjesto postavljanja atraumatskog konca (8-0, Prolene, Ethicon INC, SAD) nalazilo se u razini donjeg ruba lijeve aurikule što odgovara udaljenosti 2-3 mm od početka LAD. Oba kraja konca bila su provučena kroz polietilensku cjevčicu vanjskog promjera 1 mm te cjevčica pritisnuta prema žili dok se ne bi pojavili znaci ishemijske. Cjevčica je potom bila fiksirana hemostat-stezaljkom tijekom 30 minuta (slika 2). Životinjama izloženim postkondicioniranju je pri kraju ishemijske uključen izofluran tako da su štakori imali 1,5% koncentracije u izdahnutom zraku (oko 1 MAK-minimalna alveolarna koncentracija).



Slika 3. Shema grupiranja štakora u 4 skupine (2 kratkoročne i 2 dugoročne) te način primjene izoflurana neposredno prije i na samom početku reperfuzije srčanog mišića.

Izofluran se primjenjivao tijekom 15 minuta, počevši od zadnjih 5 minuta ishemije do 10 minuta nakon početka reperfuzije (Slika 3). Vrijednosti izoflurana u izdahnutom zraku mjerene su Drager PM 8050 plinskim analizatorom. Ishemija je bila dokazana promjenom boje na površini srca iz žarko crvene u blijedo ružičastu (Slika 4). Štakori su tijekom procedure bili priključeni na EKG monitor (Cardioline Delta1 Remco, Italia), a ishemija je dokazana promjenama u ST segmentu i T valu. Nakon 30 minuta ishemije bio je otpušten hemostat te izvučena cjevčica i konac. Reperfuzija je bila potvrđena hiperemijom srca i normalizacijom izgleda EKG-a. Promjene u boji površine srca bile su zabilježene fotografskim aparatom Canon EOS 500D (Canon, Japan) priključenim na operativnom mikroskopu (Slika 4). Ošit se šivao od mišićnog prema tetivnom dijelu ošita atraumatskim koncem (7-0, Prolene, Ethicon INC, SAD). Neposredno prije stezanja zadnjeg šava napravljena je reekspanzija pluća kontinuiranim upuhivanjem zraka.



Slika 4. Potvrda ishemije i reperfuzije miokarda. A. Fotografski slikano srce koje nakon nastanka ishemije izgubi ružičastu boju, poblijedi. B. Nakon reperfuzije srcu se vraća normalna, ružičasta boja. C i D. Elektrokardiografska potvrda ishemije (ST elevacija) i reperfuzije srčanog mišića (normalizacija EKG-a).

Nakon zatvaranja ošita štakor bi samostalno prodisao te bi se zašila trbušna stijenka. Slijedilo bi praćenje neposrednog postoperativnog oporavka štakora tijekom slijedećih 3-5 sati.

3.3. Materijali

3.3.1. Protokoli pripreme rezova i imunohistokemijskih bojanja

Nakon žrtvovanja životinja srca su uzeta u cijelosti, a za imerzijsku fiksaciju korišten je 4% paraformaldehid u 0.01 M fosfatnom puferu. Nakon tri dana fiksacije, pristupilo bi se sekciji srca na tri dijela: prvi rez izvodio se u visini donjeg ruba lijeve aurikule, a drugi četiri mm ispod prvog reza (Slika 5). Srčano tkivo je potom bilo dehidrirano u nizu vodenih otopina etanola rastućih koncentracija i uklapano u parafin. Serijski parafinski rezovi debljine od 4-6 μm bili su postavljeni na silanizirana stakla. Izabrani su reprezentativni rezovi na kojima se vidjelo cijelo područje infarkta. Bojanja su vršena na susjednim rezovima i to svaki rez sa svojim protutijelom. Tkivo je nakon deparafinizacije bilo rehidrirano u nizu vodenih otopina etanola padajućih koncentracija te bi se pristupilo imunohistokemijskom bojanju.



Slika 5. Presjecanje srca na tri dijela. Fotografski je prikazan središnji dio, između prvog (izvodi se u visini donjeg ruba lijeve aurikule) i drugog reza (četiri mm ispod prvog reza) sa makroskopski vidljivim infarktom, koji je potom uklapan u parafin.

Imunohistokemijska bojanja

Korištena su slijedeća primarna protutijela:

1. monoklonalno mišje α -SMA protutijelo (1:150, M0851, Dako Denmark A\S Danska),
2. poliklonalno kuničje VEGF protutijelo (1:200; ab46154, Abcam, Cambridge, UK),
3. poliklonalno kuničje nestin protutijelo (1:200, ab93157, Abcam, Cambridge, UK)
4. monoklonalno mišje anti-štakorsko CD31 protutijelo (1:100, BD Pharmingen)

Rezovi tkiva namjenjeni za imunohistokemijsko bojanje inkubirani su u trajanju od 10 minuta u 1% vodikovom peroksidu, prije stavljanja primarnog protutijela. Taj korak bio je nužan da bi se neutralizirala peroksidazna aktivnosti unutar stanice. Vodikov peroksid ispiran je u fosfatnom puferu (PBS). Svi rezovi su se kuhali u mikrovalnoj pećnici kroz 17 minuta na temperaturi od 95°C u puferu natrijevog citrata (pH=6,0). Protokoli za bojenje sa diaminobenzidin tetrahidrokloridnom otopinom (DAB) i imunofluorescencijom nadalje su se razlikovali pa se posebno opisuju.

Bojanje s diaminobenzidinom (DAB-om)

Primarna protutijela bila su razrijeđena u otopini Dako REAL Antibody Diluents (Dako Denmark A/S, Danska) i inkubirana na rezovima tkiva kroz jedan sat u vlažnoj komori. Rabilo se monoklonalno mišje α -SMA protutijelo (1:150, M0851, Dako Denmark A/S Danska). Primarno protutijelo višestruko je ispirano u PBS-u, potom detektirano sa streptavidin-biotin-peroksidaznim sistemom (K0690, Dakocytomation, Carpinteria, Calif., SAD) i na kraju bojano sa DAB-om. Slijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi, bojenje sa hematoksilinom i dehidriranje u etanolu i ksilolu. Stanice koje su smatrane pozitivnima na aktin imale su smeđe obojenje u citoplazmi.

Imunofluorescencijsko bojenje

Nakon kuhanja rezova tkiva u puferu natrijevog citrata (pH 6,0) na 17 minuta na 95°C i hlađenja na sobnu temperaturu, korišten je kozji serum (Normal Goat Serum X0907 DAKO, Glostrup, Danska) kroz 1 sat da bi se smanjilo nespecifično vezanje sekundarnog protutijela. Nakon blagog ispiranja, rezovi tkiva su bili inkubirani preko noći sa primarnim protutijelima:

- poliklonalno kuniće anti-VEGF protutijelo (1:200; ab46154, Abcam, Cambridge, UK);
- poliklonalno kuniće anti-nestin protutijelo (1:200, ab93157, Abcam, Cambridge, UK);
- pročišćeno mišje anti-štakorsko CD31 protutijelo (1:100, BD Pharmingen, CA, SAD).

Za dvostruko imunofluorescencijsko bojanje primarnim protutijelima korištene su kombinacije nestin i CD31 protutijela.

Poslije višestrukog ispiranja u PBS-u, rezovi su bili inkubirani 1 sat sa slijedećim sekundarnim protutijelima:

- streptavidin Alexa Fluor 488 konjugat (508205, Invitrogen, Oregon, SAD; 1:500);
- biotinizirano kozje anti-kuniće IgG (ab64256, Abcam, Cambridge, UK; 1:200);
- biotinizirano kozje anti-mišje IgG-B (sc-2039, Santa Cruz Biotechnology Inc., SantaCruz, CA, SAD; 1:200);
- rhodamine (AP124R, Jackson Immuno Research Lab., PA, SAD; 1:200);
- rhodamine (sc-2095, Santa Cruz Biotechnology Inc., SantaCruz, CA, SAD; 1:200).

Potom je ispirano sekundarno protutijelo sa PBS-om te su rezovi bili inkubirani s DAPI indikatorom (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) koji se veže na DNA i oboji jezgre.

Nakon završnog ispiranja sa PBS-om, svi rezovi bojani imunofluorescencijom uklopljeni su u medij (Immuno-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD), osušeni na zraku i prekriveni pokrovnim stakalcem. Imunofluorescencija je pregledavana i fotografirana Olympus BX51 mikroskopom (Olympus, Japan) opremljenim Olympus DP71 kamerom. Za dvostruka bojanja rađene su odvojene fotografije, ovisno o tipu filtera, a kolokalizacije uporabom računalnog programa Cell A Imaging Software (Olympus, Japan).

Trikromno bojenje po Mallory-ju

Uzorci su bili inkubirani s hematoksilinom kroz 5 min, potom isprani u vodi iz slavine, zatim bi slijedila jedna minuta inkubacije u kiselom fuksinu. Kiseli fuksin je bio ispiran nekoliko puta u destiliranoj vodi, a potom bi rezovi tkiva bili diferencirani u 1% fosfomolibdenskoj kiselini kroz jednu minutu. Slijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi i inkubacija kroz 15 minuta u anilinskom plavilu, ponovo ispiranje u destiliranoj vodi pa diferencijacija tkiva u octenoj kiselini između 1-5 minuta. Posljednji korak bila je dehidracija tkiva u etanolu i ksilolu.

Kontrole

Pozitivna kontrola na istraživanim rezovima bilo je smeđe obojenje (bojanje s DAB indikatorom) odnosno fluorescentni signal (bojanje fluorescentnim sekundarnim protutijelima) pojedinih citoplazmi ili jezgara stanica u okolnim strukturama za koje se iz literature zna da reagiraju s primarnim protutijelima. Dodatno su se raspored i razlika pozitivnih od negativnih stanica u strukturama rezova provjerili u literaturi i to za svaki traženi čimbenik.

Negativne kontrole su napravljene tako se proveo cijeli protokol bojanja, ali bez inkubacije primarnim protutijelom već su rezovi za to vrijeme bili u PBS-u. Negativna kontrola imale su samo hemalaunom odnosno DAPI-jem plavo obojane jezgre, bez smeđe boje odnosno bez fluorescentnog signala citoplazmi ili jezgara stanica.



Slika 6. Određivanje veličine infarkta u Adobe Photoshop 7.0 preko broja pixela koji stanu u mm^2 (izmjereno na mjernoj ljestvici).

3.3.2. Određivanje veličine infarkta te analiza imunohistokemijskih bojanja

Za opisivanje osnovne morfologije infarkta koristilo se trikromno bojanje po Mallory-u. Veličina infarkta izračunala se preko Adobe Photoshop 7.0 programa (Adobe, SAD). Prvo su fotografskim aparatom Canon PowerShot A480 (Canon, Japan) u istoj rezoluciji fotografirani histološki presjeci bojani trikromnim bojanjem po Mallory-ju uz mjernu ljestvicu, a zatim su slike obrađene u navedenom programu. S obzirom na mjernu ljestvicu odredio bi se točan broj pixela u 1 mm^2 . Zatim bi se preko opcije “magic wond” označilo područje infarkta te preko broja pixela u infarciranoj površini, a s obzirom na izračunati broj pixela u 1 mm^2 , odredila površina infarkta u mm^2 (Slika 6). Postotak (%) površine infarkta u odnosu na veličinu lijeve klijetke i septuma određivao se kao kvocijent pixela u tim područjima.

Analiza izražaja α -SMA, VEGF-a, nestina, CD31 i ko-izražaja nestina sa CD31

Broj pozitivnih stanica utvrđen je od strane dvaju neovisnih istraživača. Zasebno su brojane stanice koje pokazuju bojenje u citoplazmi i na one koje to ne pokazuju. Brojanje je vršeno unutar tkiva infarkta. Kod brojanja α SMA, nestin i nestin-CD31 pozitivnih stanica u obzir nije uzimana imunoreaktivnost unutar krvnih žila. Pomoću računalnog programa DP-SOFT 3.1 (Olympus, Japan), svaka fotografirana zona podijeljena je u kvadrate od $50 \times 50 \mu\text{m}$ pri $\times 40$ povećanju. Brojeno je minimalno 25 kvadrata po rezu. Brojani su samo oni kvadrati koje u potpunosti prekrivaju stanice i samo one stanice koje imaju jezgru.

Stanice koje naliježu na lijevi ili gornji rub kvadrata nisu brojane, za razliku od onih koje su nalijegale na desni ili donji rub. Da bi izbjegli brojanje istih stanica više puta između brojanih rezova proksimalnog, srednjeg i distalnog dijela infarkta nalazila su se minimalno tri reza koja se nisu brojala. α SMA, nestin i nestin-CD31 pozitivne stanice izražene su kao broj stanica na mm^2 (kvocijent broja pozitivnih stanica i veličine infarkta), α SMA pozitivne stanice su izražene i kao postotak od ukupnog broja stanica (zbroj pozitivnih i negativnih) dok je VEGF imunoreaktivnost u stanicama izražena samo kao postotak. Nestin-pozitivni kardiomiociti brojani su kroz cijelu površinu infarkta te izraženi kao broj stanica na mm^2 . Definirani su kao stanice koje naliježu na postojeće kardiomiocite, a kod bojanja nestinom pokazuju karakteristični isprugani uzorak koji uzrokuje heterodimerna formacija dezmina i nestina. α SMA-pozitivitet u krvnim žilama izražen je kao broj pozitivnih žila na mm^2 te kao postotak od prebrojanih svih krvnih žila većih od $20 \mu\text{m}$ u promjeru. Nestin i CD31 pozitivne krvne žile brojane su također kroz cjelokupno područje infarkta preko serije snimki na $\times 40$ povećanju od strane dva neovisna istraživača. Broj pozitivnih krvnih žila je izražen na mm^2 .

3.4. Statistički postupci

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (AS) \pm SD. Normalnost raspodjele podataka procijenila se Kolmogorov-Smirnovim testom. Nakon toga se odabrao odgovarajući parametrijski (*t*-test) ili neparametrijski test (Mann-Whitney U test). Sva obrada vršena je uz pomoć GraphPad (La Jolla, CA, USA) računalnog programa. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0.05$.

Procjenu veličine uzorka za varijantu veličine infarkta miokarda i za varijantu obojenja (imunoreaktivnosti) krvnih žila CD31 biljegom napravili smo koristeći G*Power software (Department of Experimental Psychology Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany). Ulazni rezultati uključivali su razinu pogreške $\alpha = 0.05$ i snagu ($1 - \beta$) od 75% te izračunatu veličinu efekta $d = 3,7$ (za analizu veličine infarkta) te $d = 2,3$ (za CD31 bojanje). Uz ove parametre, bila je potrebna veličina uzorka od 4 životinje u svakoj od skupina.

4. REZULTATI

U istraživanju su rađeni pokusi na 45 štakora. Većina štakora izuzeta je iz studije radi smrtnog ishoda intraoperativno ili u neposrednom postoperativnom razdoblju. Razlog je uglavnom bio srčanožilni urušaj radi masivnog infarkta miokarda. 12 štakora je izuzeto, jer im okluzija lijeve silazne koronarne arterije na tipičnom mjestu nije izazvala infarkt kompletne lijeve klijetke što je bio kriterij uključivanja u istraživanje.

Preostalo je 16 štakora kojima je intraoperacijski potvrđena odgovarajuća ishemija lijeve klijetke te koji su preživjeli i razvili infarkt nakon 4 odnosno 14 dana od reperfuzije.

Blijedilo ishemije je bilo vidljivo cijelo vrijeme 30-minutne okluzije te je snimano kamerom i dodatno potvrđeno promjenama u EKG-u. Unutar nekoliko sekundi od prestanka okluzije dotad blijedo područje postalo bi crveno, što je bio znak uspješne reperfuzije. Unutar 10 minuta znakovi ishemije na EKG-u bi se smanjili odošono nestali.

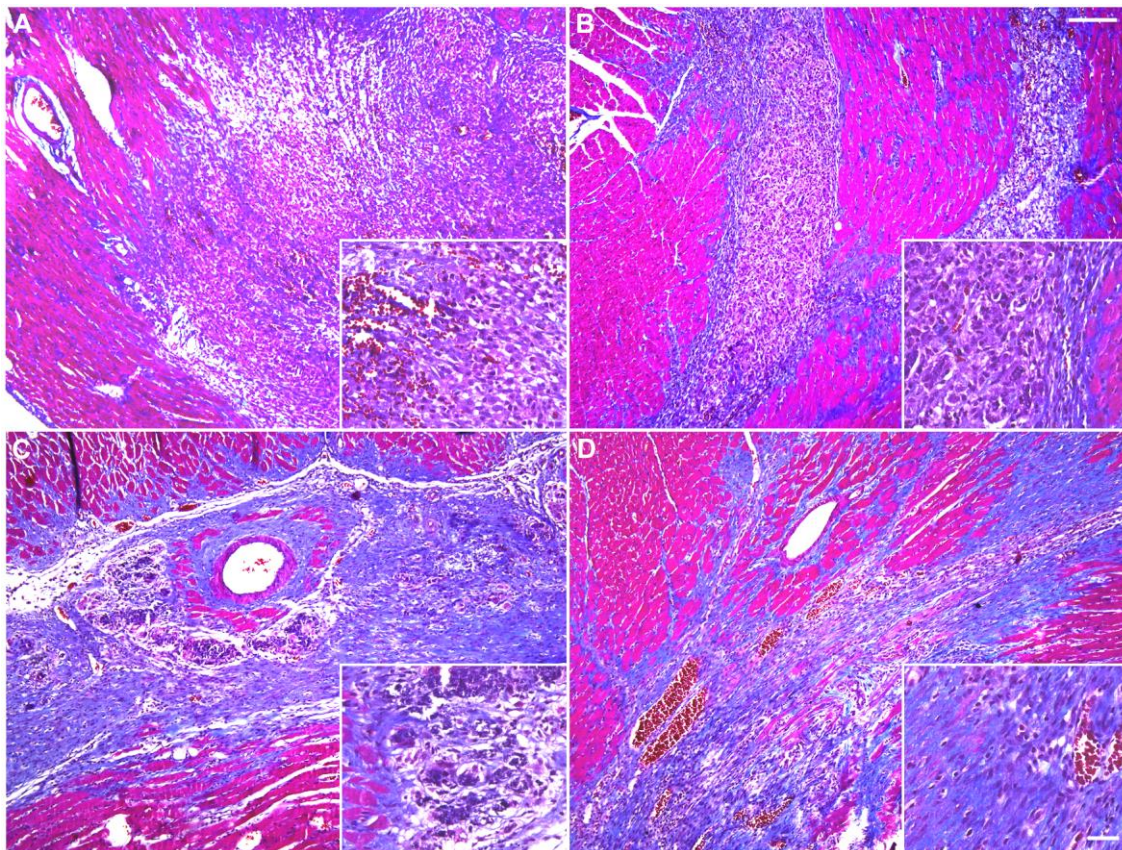
Nije bilo značajnih razlika u ponašanju ili brzini oporavka između kontrolne skupine životinja i skupine koja je postkondicionirana izofluranom.

4.1. Kvalitativne razlike u području infarkta

U obje skupine životinja, na rezovima srca bojanim trikromnim bojenjem po Mallory-ju, infarcirano područje bilo je jasno vidljivo već na malim povećanjima.

Histološka slika infarkta 4. dan nakon reperfuzije pokazuje gubitak kardiomiocita te infiltraciju granulacijskog tkiva. Navedeno je u skladu sa subakutnom fazom cijeljenja infarkta srčanog mišića. Zanimljivo je da ni kod jedne životinje nije bilo smanjenja debljine stijenke klijetke u ishemičkim područjima. Središnje područje infarkta povremeno je pokazalo amorfni nekrotički detritus i znakove krvarenja, međutim ti znakovi su bili jako mali ili odsutni u izofluranske skupine životinja (Slika 7). Znakovi vezivne organizacije unutar područja infarkta u obje skupine životinja bili su oskudni.

14. dan nakon reperfuzije infarkt je bio u kroničnoj fazi, granulacijsko tkivo sve se više zamjenjivalo vezivom. Kod izofluranske skupine životinja utvrdio se veći stupanj cijeljenja infarkta. Trikromno bojanje po Mallory-ju pokazalo je da, za razliku od kontrolne skupine, zone infarkta kod ove skupine štakora imaju manje nezrelog granulacijskog tkiva. Nađeno je vezivno tkivo uz znakove regeneracije srčanog mišića. Navedeno je kasnije potkrijepljeno drugim rezultatima (Slika 7).



Slika 7. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda srca 4. i 14. dana nakon reperfuzije, bojanje trikromno po Mallory-u. A, B - štakori žrtvovani 4. dan; C, D - štakori žrtvovani 14. dan.

A - Izgled područja infarkta u kontrolne skupine štakora sa naglaskom na izgled središnjeg dijela u kojem se na povećanju vidi karakteristični amorfni detritus i znakovi krvarenja. B - Izgled subakutnog infarkta u štakora koji je postkondicioniran izofluranom. U središnjem dijelu nedostaje amorfni detritus i znakovi krvarenja. C - Izgled kroničnog infarkta u kontrolnoj skupini životinja. Na povećanju se uz vezivo vidi prisutnost granulacijskog tkiva. D - Kronični infarkt u štakora postkondicioniranog izofluranom. U središnjem dijelu opaža se puno manje granulacijskog tkiva. Vide se znakovi regeneracije srčanog mišića koje ne nalazimo u kontrolnoj skupini životinja. Velike slike A-D su povećanja $\times 10$ (mjerna ljestvica = 400 μm), dok su kvadrati unutar slika povećanja $\times 40$ (mjerna ljestvica = 40 μm).

4.2. Veličina infarciranog područja

Kvantifikacijskom metodom korištenom u istraživanju može se precizno izračunati površina infarciranog područja za svaku životinju. Veličina infarkta izražena je u mm² i kao postotak (%) koji zauzima infarcirano područje u odnosu na površinu lijeve klijetke i septuma.

Štakori žrtvovani 4. dan

U izofluranskoj skupini štakora izmjerena je prosječna veličina infarkta 5.4 ± 2.0 mm² što iznosi 14.3 ± 2.0 % od ukupne površine lijeve klijetke i septuma. U kontrolnoj skupini prosječna veličina infarkta iznosila je 12.3 ± 1.7 mm² odnosno 35.1 ± 9.9 %.

Uspoređujući veličine infarkta između dvije skupine štakora utvrdilo se da izofluranska skupina ima statistički značajno manji infarkt od kontrolne skupine bez obzira koja je odmjera veličine infarkta korištena (kada se uspoređuju veličine infarkta u mm² $p=0.003$, dok je za postotak površine zahvaćene infarktom $p=0.015$).

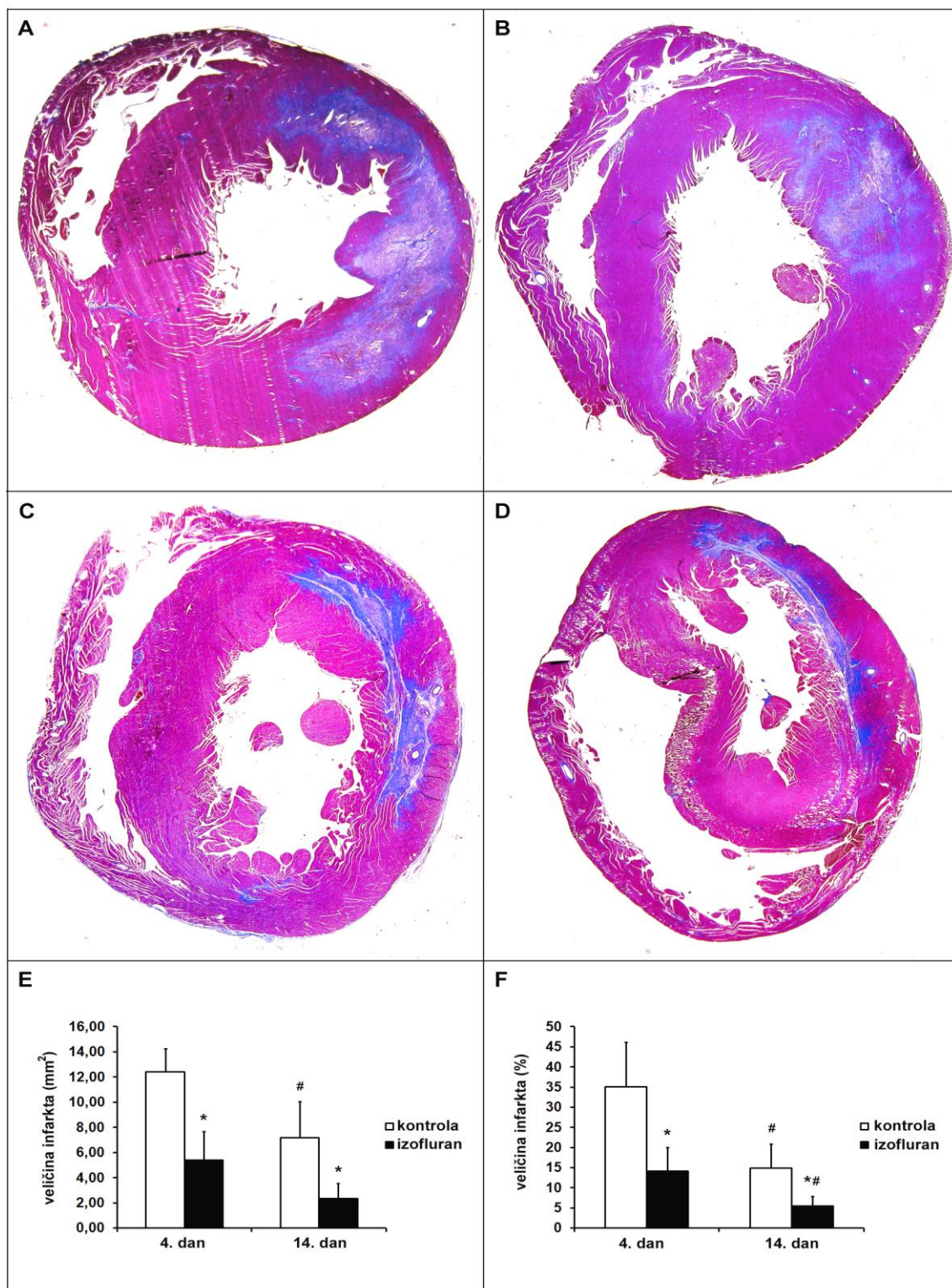
U štakora postkondicioniranih izofluranom zabilježeno je smanjenje infarkta za 59.3% (veličine infarkta u postotku) odnosno 56.1% (veličine infarkta u mm²) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Slika 8 - A, B, E i F).

Štakori žrtvovani 14.dan

I 14 dana nakon reperfuzije u skupini štakora postkondicioniranih izofluranom utvrđena je manja veličina infarkta u odnosu na kontrolnu skupinu.

U izofluranskoj skupini štakora prosječna veličina infarkta iznosila je 2.3 ± 1.2 mm² odnosno 5.4 ± 2.4 % od ukupne površine lijevog ventrikula i septuma, dok je u štakora kontrolne skupine iznosila 7.2 ± 2.9 mm² odnosno 14.9 ± 6.0 %.

Statističkom obradom utvrđeno je da skupina štakora postkondicioniranih izofluranom ima značajno manje infarkte od kontrolne skupine bez obzira na način kojim je veličina infarkta mjerena ($p<0.05$). Postotak smanjenja veličine infarkta u štakora izofluranske skupine iznosio je 63.8% kada se uspoređuju proporcije odnosno 68.1% kada se uspoređuju veličine infarkta u mm² u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Slika 8 - C, D, E i F).



Slika 8. Fotografije rezova srca bojanih trikromnim bojanjem po Mallory-ju (A-D) te usporedba veličine infarkta između skupina prema vremenu žrtvovanja (E,F). A, B - štakori žrtvovani 4. dan; C, D - štakori žrtvovani 14. dan. Slika pokazuje razliku između veličine infarkta u kontrolne skupine životinja (A, C) i izofluranske skupine (B, D) što je potkrijepljeno grafovima na dnu slike gdje je veličina infarkta izražena u mm² (E), te u % od lijeve klijetke i septuma (F). Kontrola - kontrolna skupina; izofluran - izofluranska skupina štakora. * - značajno smanjenje infarkta u odnosu na kontrolnu skupinu; # - značajno smanjenje infarkta u istoj skupini tijekom vremena, p<0.05.

4.3. Rezultati imunohistokemijskih bojanja

4.3.1. Izražaj VEGF-a

VEGF imunoreaktivnost nađena je u normalnom, kao i u ishemijskom promijenjenom miokardu. Izražena je u citoplazmi stanica smještenih unutar granulacijskog tkiva infarkta štakora u obje skupine životinja. Najjači izražaj VEGF-a nađen je u velikim ovalnim stanicama koje, morfološki gledano, najvjerojatnije predstavljaju makrofage ili progenitorne stanice (Slika 9). Nadalje, VEGF izražaj bio je istaknut u endotelu krvnih žila i u vretenastim stanicama granulacijskog tkiva koje su vjerojatno predstavljale miofibroblaste.

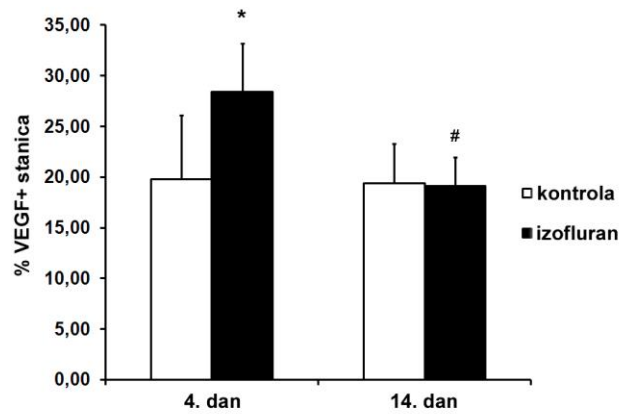
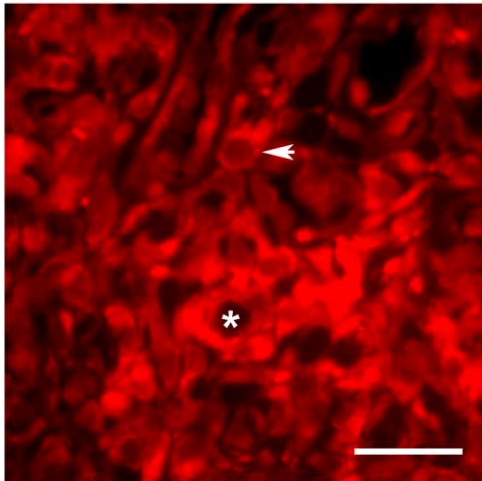
Štakori žrtvovani 4. dan

Postotak VEGF pozitivnih stanica u granulacijskom tkivu ishemičkog područja izofluranske skupine štakora iznosio je $28.4 \pm 4.8\%$ što je statistički značajno više ($p=0.001$) nego u kontrolne skupine štakora gdje je iznosio $19.8 \pm 6.3\%$ (Slika 9).

U štakora postkondicioniranih izofluranom utvrđeno je povećanje postotka VEGF-pozitivnih stanica za 43.3% u odnosu na kontrolnu skupinu štakora.

Štakori žrtvovani 14. dan

Postotak VEGF pozitivnih stanica u području infarkta izofluranske skupine štakora iznosio je $19.1 \pm 2.8\%$ što nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu štakora u kojoj je iznosio $19.4 \pm 3.9\%$ (Slika 9). Između 4. i 14. dana nakon reperfuzije utvrđen je značajan pad izražaja VEGF-a u izofluranskoj skupini štakora, dok je u kontrolnoj skupini razina skoro identična.



Slika 9. Izražaj VEGF-a u infarciranom tkivu ishemijsko-reperfuzijske ozljede štakora žrtvovanog 14. dan te usporedba postotka VEGF-pozitivnih stanica između kontrolne i izofluranske skupine štakora prema vremenu žrtvovanja. Na slici lijevo (povećanje $\times 100$, mjerna ljestvica = 20 μm) vidi se izražaj u velikim ovalnim stanicama koje najvjerojatnije predstavljaju progenitorne stanice (strjelica) te u endotelu krvne žile (zvjezdica). Kontrola - kontrolna skupina; izofluran - izofluranska skupina štakora. * - značajna razlika u izražaju VEGF-a između kontrolne i izofluranske skupine; # - značajno smanjenje izražaja VEGF-a u izofluranskoj skupini tijekom vremena ($p < 0.05$).

4.3.2. Izražaj CD31

Zdravi miokard obje skupine štakora rijetko je pokazivao znakove izražaja CD31 u endotelu krvnih žila. U području infarkta utvrđen je izražaj CD31 u stanicama i krvnim žilama granulacijskog tkiva kod svih štakora.

Štakori žrtvovani 4. dan

Jaki izražaj nađen je krvnim žilama granulacijskog tkiva kontrolne kao i izofluranske skupine štakora, naročito u endotelu malih kapilara.

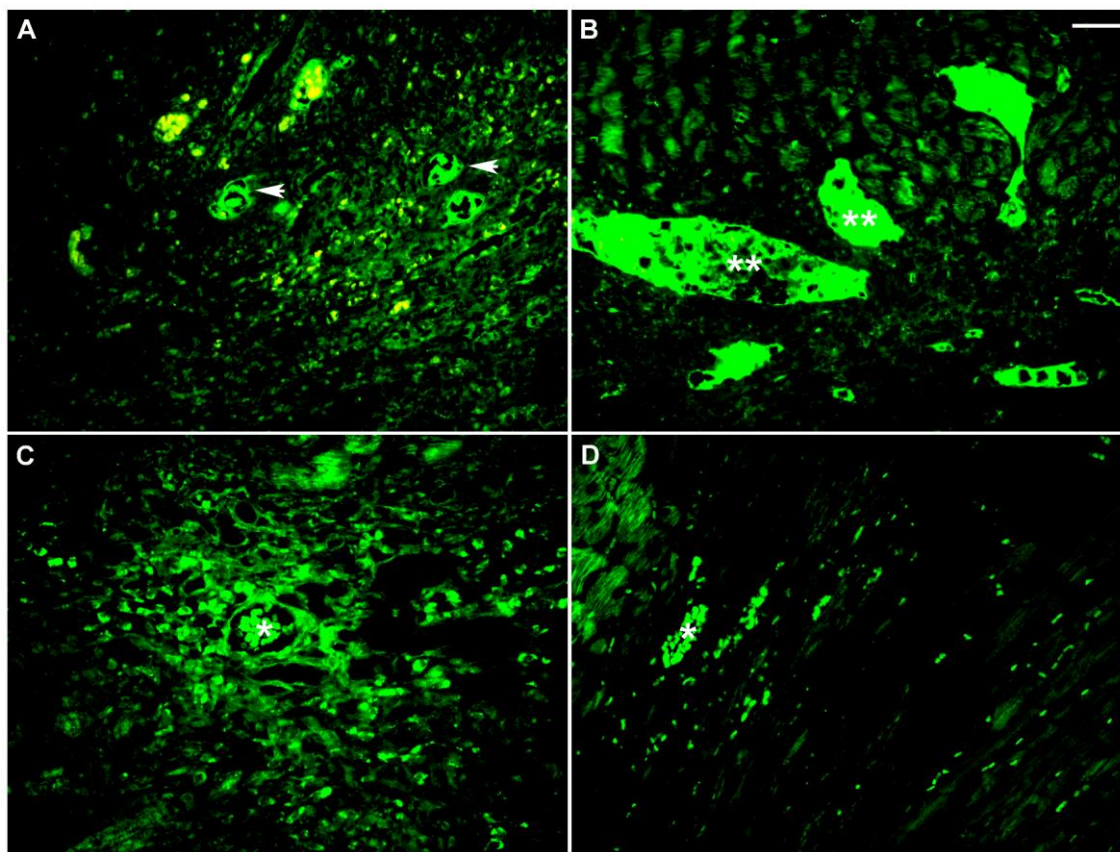
Tipično za izraženu angiogenezu, CD31 izražaj bio je istaknut u velikim „majčinskim“ žilama te u glomerularnim tjelešcima (nastalim pregrađivanjem majčinskih krvnih žila što je faza u procesu stvaranja novih kapilara) unutar granulacijskog tkiva (Slika 10 - A, B). Izražaj se mogao naći i u stanicama granulacijskog tkiva.

Srednja vrijednost broja CD31 imunoreaktivnih krvnih žila granulacijskog tkiva izofluranske skupine štakora bila je 43.8 ± 20.3 na mm^2 što je značajno više ($p=0.048$) od srednje vrijednosti broja CD31 imunoreaktivnih krvnih žila kontrolne skupine životinja koja je iznosila 18.4 ± 3.3 na mm^2 (Slika 10 E). Postkondicioniranje izofluranom povećalo je broj CD31 pozitivnih krvnih žila za više nego dvostruko (138.0%) u odnosu na kontrolnu skupinu štakora.

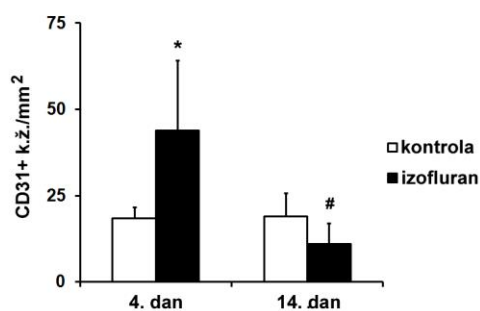
Štakori žrtvovani 14. dan

Kao i u štakora ranije žrtvovanih, u zoni infarkta nađen je CD31 izražaj u stanicama i u krvnim žilama u obje skupine štakora, naročito u endotelu malih kapilara. Međutim, za razliku od ranije žrtvovanih štakora, nađen je manji broj CD31 imunoreaktivnih krvnih žila uz obrnuti trend među skupinama, srednji broj CD31 imunoreaktivnih krvnih žila izofluranske skupine bio je niži (Slika 10 - C, D).

Srednja vrijednost CD 31 pozitivnih krvnih žila granulacijskog tkiva izofluranske skupine štakora iznosila je 11.0 ± 6.0 na mm^2 što je niži broj od srednje vrijednosti pozitivnih krvnih žila kontrolne skupine životinja koja je iznosila 19.0 ± 6.8 na mm^2 , ali razlika nije statistički značajna, $p=0.12$ (Slika 10 E). Međutim, u štakora postkondicioniranih izofluranom utvrđen je značajno manji broj CD31 pozitivnih krvnih žila u odnosu na istu skupinu štakora žrtvovanih 4.dan ($p<0.05$).



E



Slika 10. Izražaj CD31 u granulacijskom tkivu ishemičkog područja srca štakora kontrolne (A) i izofluranske (B) skupine štakora žrtvovanih 4. dan te u štakora kontrolne (C) i izofluranske (D) skupine štakora žrtvovanih 14. dan (povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica = 40 μm). Izražaj CD31 nađen je u malim krvnim žilama i glomerularnim tjelešcima (strjelice) granulacijskog tkiva kontrolne (A) i u brojnim krvnim žilama uključujući „majčinske“ (dvostruke zvjedice) granulacijskog tkiva izofluranske skupine štakora (B). Izražaj je vidljiv i u kapilarama (zvjezdica) kontrolne skupine (C), dok je kod izofluranske skupine štakora (D) žrtvovanih 14. dan gotovo pa odsutan (na slici CD31 negativna krvna žila označena zvjedicom). Usporedba izražaja CD31 između kontrolne i izofluranske skupine štakora 4. i 14. dan od ishemijsko-reperfuzijske ozljede (E). Kontrola - kontrolna skupina; Izofluran - izofluranska skupina štakora. * - značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu u istom vremenu žrtvovanja; # - značajna razlika u istoj skupini tijekom vremena, $p < 0.05$.

4.3.3. Izražaj nestina

Zdravi miokard nije pokazao izražaj nestina, osim rijetko u krvnim žilama. Nestin imunoreaktivnost nađena je u stanicama i krvnim žilama granulacijskog tkiva kontrolnih i izofluranskih skupina štakora žrtvovanih 4. i 14. dan od ishemijsko-reperfuzijske ozljede (Slika 11). Nestin pozitivne stanice izvan krvnih žila predstavljaju progenitorne stanice i nezrele stanice različitih loza.

Štakori žrtvovani 4. dan

Broj nestin pozitivnih krvnih žila bio je veći u izofluranskoj skupini štakora u odnosu na kontrolnu skupinu. Srednji broj nestin pozitivnih krvnih žila u izofluranskoj skupini životinja bio je 7.7 ± 1.7 na mm^2 što je statistički značajno veći broj nego u kontrolnoj skupini životinja, gdje je iznosio 4.4 ± 1.0 na mm^2 ($p < 0.05$). U štakora postkondicioniranih izofluranom utvrđeno je povećanje broja nestin pozitivnih krvnih žila za 75.0% u odnosu na kontrolnu skupinu štakora (Slika 11 - A, B i F).

Broj nestin pozitivnih stanica također je bio veći u izofluranskoj skupini štakora u odnosu na kontrolnu skupinu. Srednji broj nestin pozitivnih stanica u izofluranskoj skupini životinja iznosio je 1412.5 ± 151.7 stanica na mm^2 , što je značajno veći broj ($p = 0.001$) nego u kontrolnoj skupini životinja gdje je iznosio 757.5 ± 167.0 na mm^2 . Postkondicioniranje izofluranom povećalo je broj nestin pozitivnih stanica za 86.5% (Slika 11 - A, B i E).

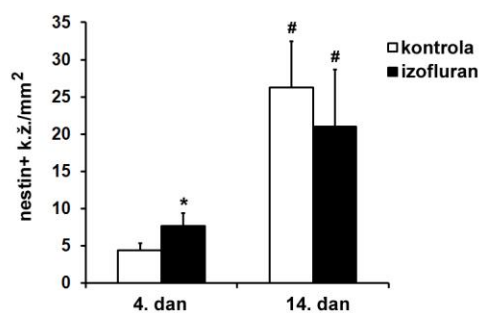
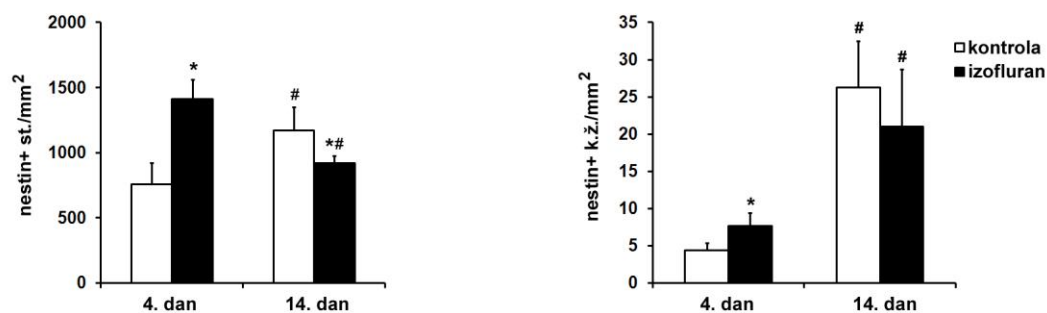
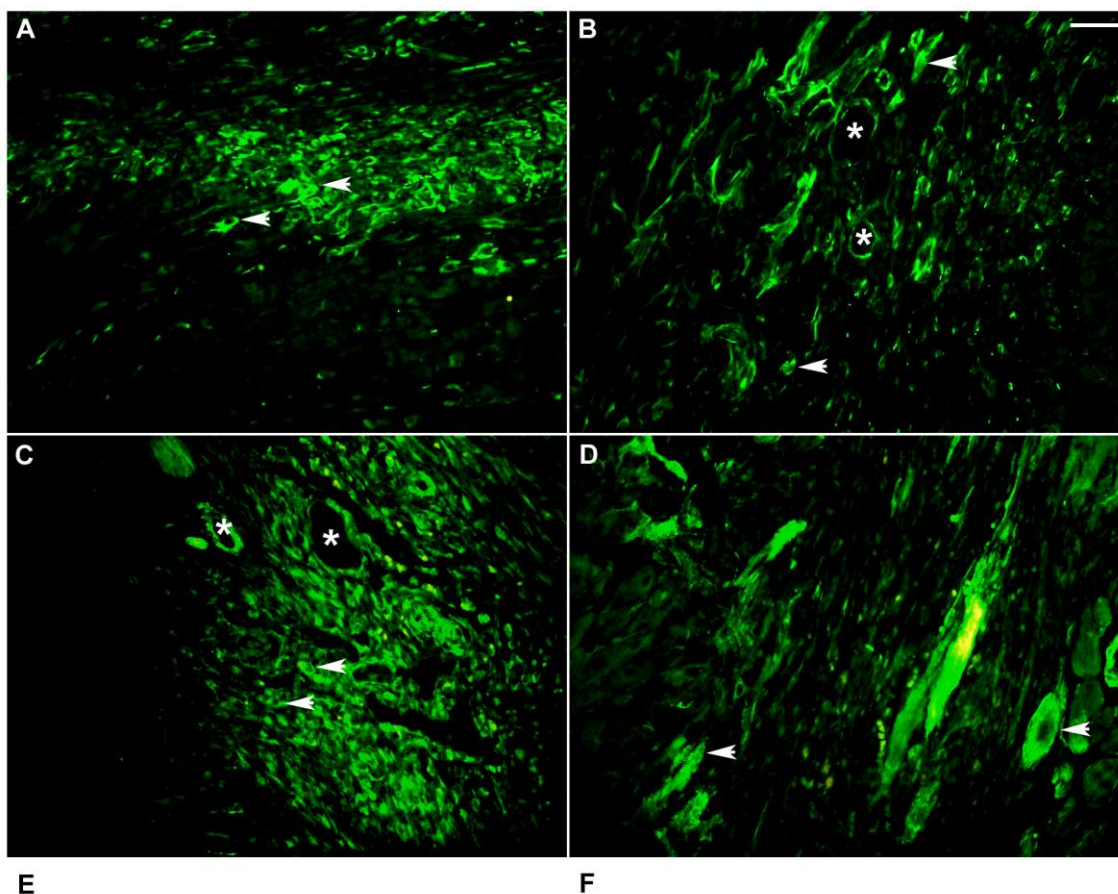
Štakori žrtvovani 14. dan

Nasuprot rezultatima dobivenima na štakorima žrtvovanim 4.-og dana, broj nestin pozitivnih stanica bio je veći u kontrolne skupine životinja.

Srednji broj nestin pozitivnih stanica u izofluranskoj skupini životinja iznosio je 920.0 ± 58.3 stanica na mm^2 , što je značajno manji broj nego u kontrolnoj skupini životinja gdje je iznosio 1172.5 ± 178.7 stanica na mm^2 ($p < 0.05$). Postkondicioniranje izofluranom smanjilo je broj nestin pozitivnih stanica za 21.5% (Slika 11 - C, D i E).

Broj nestin pozitivnih krvnih žila pratio je isti trend. Srednji broj nestin pozitivnih krvnih žila u izofluranskoj skupini životinja iznosio je 21.0 ± 7.7 na mm^2 , što je manje nego u kontrolnoj skupini gdje je iznosio 26.2 ± 6.2 na mm^2 , ali razlika nije značajna (Slika 11 - C, D i F).

Dinamika razvoja infarkta između 4. i 14. dana je u kontrolnih štakora dovela do značajnog porasta, dok je u štakora postkondicioniranih izofluranom pokazala značajno smanjenje broja nestin pozitivnih stanica (Slika 11 E). Broj nestin pozitivnih krvnih žila se tijekom vremena u obje skupine životinja značajno povećao (Slika 11 F).



Slika 11. Izražaj nestina u granulacijskom tkivu ishemičkog područja srca štakora kontrolne (A) i izofluranske (B) skupine štakora žrtvovanih 4. dan te u štakora kontrolne (C) i izofluranske (D) skupine štakora žrtvovanih 14. dan (povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica = 40 μm).

Izražaj nestina nađen je u krvnim žilama (zvjezdice) i stanicama (strjelice) granulacijskog tkiva kontrolne (A, C) i izofluranske skupine štakora (B, D). Vidljiv je veći izražaj u krvnim žilama izofluranske skupine štakora žrtvovanih 4. dan (B, F). Broj nestin pozitivnih stanica značajno se smanjuje u izofluranskoj skupini štakora žrtvovanih 14. dan (D, E). Usporedba izražaja nestina u stanicama (E) i krvnim žilama (F) između kontrolne i izofluranske skupine prema vremenu proteklom od ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Kontrola - kontrolna skupina; izofluran - izofluranska skupina štakora. * - značajna razlika u izražaju nestina između skupina u istom vremenu žrtvovanja; # - značajna razlika u izražaju nestina u istoj skupini tijekom vremena ($p < 0.05$).

4.3.4. Kolokalizacija nestina i CD31

Nije nađena kolokalizacija nestina i CD 31 u zdravom tkivu miokarda. Međutim, u infarciranom tkivu obje skupine štakora pronađena je kolokalizacija unutar stanica granulacijskog tkiva te u endotelu krvnih žila. Nestin-CD31 pozitivne stanice predstavljaju nezrele progenitorne stanice koje u diferencijaciju usmjerile prema endotelnim stanicama.

Štakori žrtvovani 4. dan

Nestin-CD31 pozitivne stanice češće su nađene u izofluranskoj (citoplazme stanica bojana narančasto u ko-izražaju - Slika 12 - B, Ed) nego u kontrolnoj skupini štakora (Slika 12 A). Broj nestin-CD31 pozitivnih stanica u granulacijskom tkivu izofluranske grupe štakora bio je značajno veći, $p < 0.05$ (slika 12 F). Kada se usporede srednje vrijednosti broja pozitivnih stanica među skupinama (91.0 ± 11.3 naspram 71.0 ± 2.6) utvrdi se da se broj nestin-CD31 pozitivnih stanica kod štakora postkondicioniranih izofluranom povećao za 28.1 %.

Štakori žrtvovani 14. dan

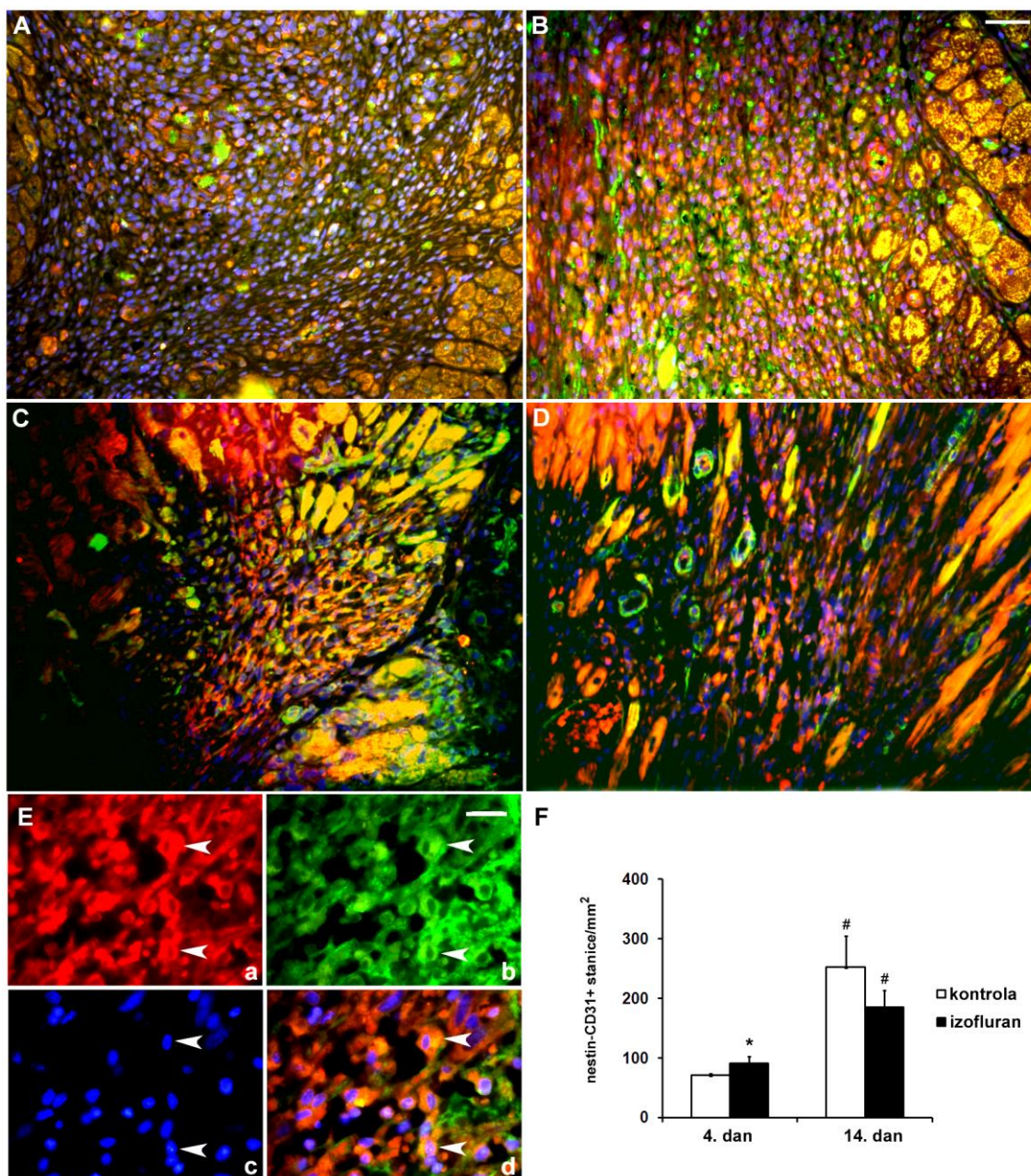
Broj nestin-CD31 pozitivnih stanica značajno se povećao tijekom vremena u obje skupine štakora ($p < 0.05$). U izofluranskoj skupini štakora broj nestin-CD31 pozitivnih stanica je manji (185.0 ± 28.9) nego u kontrolnoj skupini (252.5 ± 52.5) ali razlika nije statistički značajna, $p = 0.065$ (Slika 12 - C, D i F).

4.3.5. Nestin imunoreaktivni kardiomiociti

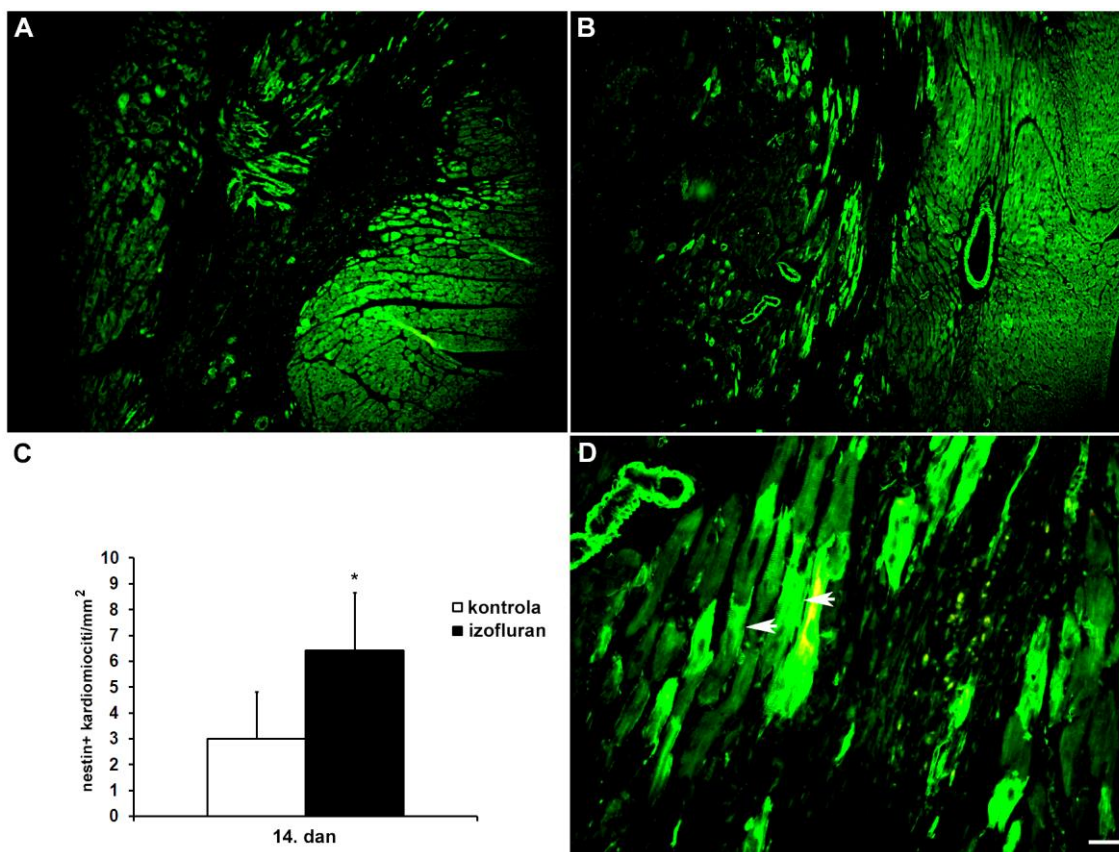
U zoni infarkta obje skupine štakora žrtvovanih 14. dan nađene su nestin pozitivne stanice slične mladim kardiomiocitima, često naslonjene na već postojeće srčane mišićne stanice. (Slika 15D, strjelice). Bojanje nestinom takvih stanica pokazalo je karakteristični isprugani uzorak koji uzrokuje heterodimerna formacija dezmina i nestina.

Ovako bojana stanice nisu nađene kod životinja žrtvovanih 4. dan.

U izofluranskoj skupini štakora žrtvovanih 14. dan nađen je značajno veći broj navedenih stanica nego u kontrolnoj skupini životinja, $p = 0.018$ (Slika 15 - A, B i C).



Slika 12. Kolokalizacija CD31 i nestina u granulacijskom tkivu kontrolne skupine (A, C) i izofluranske skupine štakora (B, D). Zajednička nestin-CD31 imunoreaktivnost nađena je unutar stanica granulacijskog tkiva i u zidovima malih krvnih žila što je naročito istaknuto kod dugoročno praćenih životinja (C, D). Primjećuje se značajno veća kolokalizacija u granulacijskom tkivu izofluranske skupine (B) nego u kontrolne skupine štakora (A) žrtvovanih 4. dan (povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica = $40 \mu\text{m}$). Veliko povećanje ($\times 100$, mjerna ljestvica = $20 \mu\text{m}$) unutar granulacijskog tkiva izofluranske grupe štakora pokazuje izražaj nestina u velikim ovalnim stanicama (Eb, glave strjelica). Nakon spajanja sa CD31 (Ea, glave strjelica) i DAPI-jem (Ec), velike ovalne stanice pokazuju nestin-CD31 kolokalizaciju (Ed, glave strjelica). F. Usporedba nestin-CD31 kolokalizacije prema vremenu proteklom od ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Kontrola - kontrolna skupina; izofluran - izofluranska skupina štakora. * - značajna razlika između skupina u istom vremenu žrtvovanja; # - značajna razlika u istoj skupini tijekom vremena.



Slika 15. Izražaj nestina u infarktu štakora žrtvovanih 14. dan. A – infarkt štakora kontrolne skupine, B – infarkt štakora izofluranske skupine (povećanje $\times 10$). U infarktu štakora postkondicioniranih izofluranom vidi se veći izražaj nestina u mladim kardiomiocitima. Na slici se prikazuju kao vretenaste isprugane stanice u rubnom području infarkta koje se naslanjaju na već postojeće kardiomiocite. D - Isječak iz B na povećanju $\times 40$ (strjelice pokazuju mlade kardiomiocite). Mjerna ljestvica = 40 μm . C - Odnos broja nestin pozitivnih kardiomiocita među skupinama. Kontrola - kontrolna skupina; izofluran - izofluranska skupina štakora. * - značajno povećanje nestin izražaja u kardiomiocitima kod izofluranske skupine 14. dan od ishemijsko-reperfuzijske ozljede ($p < 0.05$).

4.3.6. Izražaj α -SMA

U zdravom srčanom tkivu izražaj α -SMA utvrđen je u području endomizija, prvenstveno u citoplazmi glatkih mišićnih stanica u stijenci zrelih krvnih žila.

U obje skupine štakora žrtvovanih 4. i 14. dan infarcirana stijenka miokarda sadrži miofibroblaste pozitivne na α -SMA te pozitivne krvne žile.

Štakori žrtvovani 4. dan

Isključujući imunoreaktivnost u krvnim žilama, broj α -SMA pozitivnih stanica tj. miofibroblasta bio je veći u izofluranskoj skupini (Slika 14 B) u odnosu na kontrolnu skupinu štakora (Slika 14 A).

Srednji broj α -SMA pozitivnih stanica u izofluranskoj grupi štakora iznosio je 2431.6 ± 331.3 stanice na mm^2 , što je statistički značajno veći broj nego u kontrolnoj grupi gdje je iznosio 1321.8 ± 293.5 stanice na mm^2 ($p=0.002$). Broj α -SMA pozitivnih stanica bio je za 84% veći u skupini štakora postkondicioniranih izofluranom. I postotak α -SMA pozitivnih stanica bio je veći u izofluranske skupine životinja, ali u odnosu na kontrolnu skupinu nije nađena statistički značajna razlika, $p=0.07$ (Slika 13, gornji red).

Nije nađena statistički značajna razlika u broju i postotku α -SMA pozitivnih krvnih žila između dviju skupina životinja. Ukupni broj izbrojanih krvnih žila među skupinama nije se značajno razlikovao (Slika 13, donji red).

Štakori žrtvovani 14. dan

Granulacijsko tkivo obiju skupina sadržavalo je miofibroblaste pozitivne na α -SMA iako je njihov broj značajno manji od onog u štakora žrtvovanih 4. dan ($p<0.05$).

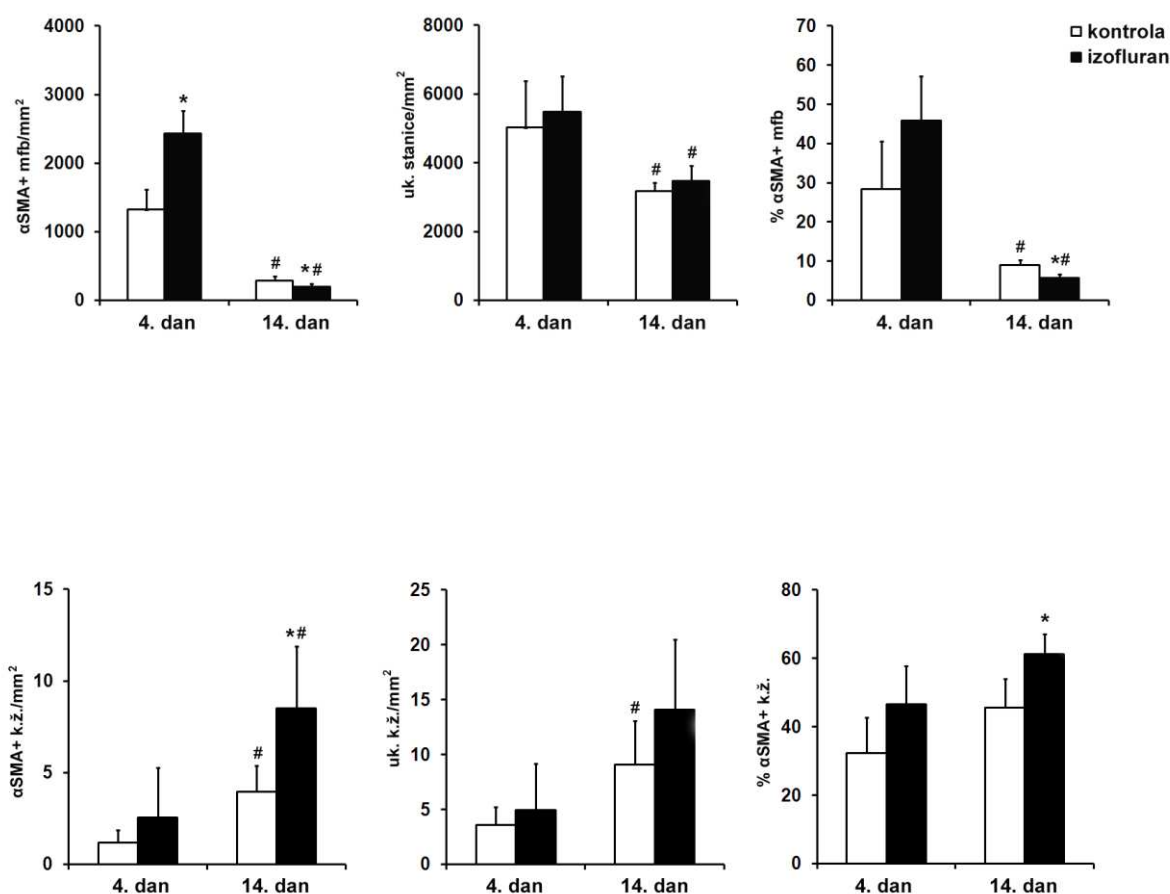
Za razliku od štakora ranije žrtvovanih, broj α -SMA pozitivnih stanica bio je značajno manji u izofluranskoj skupini štakora (Slika 14 D) u odnosu na kontrolnu skupinu, $p<0.05$ (Slika 14 C). Srednji broj α -SMA pozitivnih stanica u izofluranskoj skupini štakora iznosio je 197.5 ± 47.1 stanica na mm^2 , dok je u kontrolnoj skupini iznosio 290.0 ± 57.1 stanica na mm^2 . Značajna razlika u korist kontrolne skupine životinja nađena je i kada se gledao postotak α -SMA pozitivnih stanica, $p<0.05$ (Slika 13, gornji red).

U kroničnoj fazi cijeljenja ishemijsko-reperfuzijske ozljede štakora postkondicioniranih izofluranom utvrđeno je smanjenje broja α -SMA pozitivnih stanica za 31.9 %, a postotka istih za 37.0 % u odnosu na kontrolnu skupinu štakora.

Ukupan broj krvnih žila na mm^2 bio je veći 2-3 puta u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan ali se nije statistički značajno razlikovao među skupinama (u kontrolnoj skupini iznosio je 9.1 ± 4.0 , dok je u izofluranskoj ukupni broj krvnih žila iznosio 14.1 ± 6.4).

Međutim, postotak α -SMA pozitivnih krvnih žila bio je veći u izofluranskoj skupini životinja (Slika 14 D). Iznosio je $61.2 \pm 5.9 \%$ za razliku od kontrolne skupine u kojoj je iznosio $45.5 \pm 8.6 \%$ što predstavlja statistički značajnu razliku ($p < 0.05$).

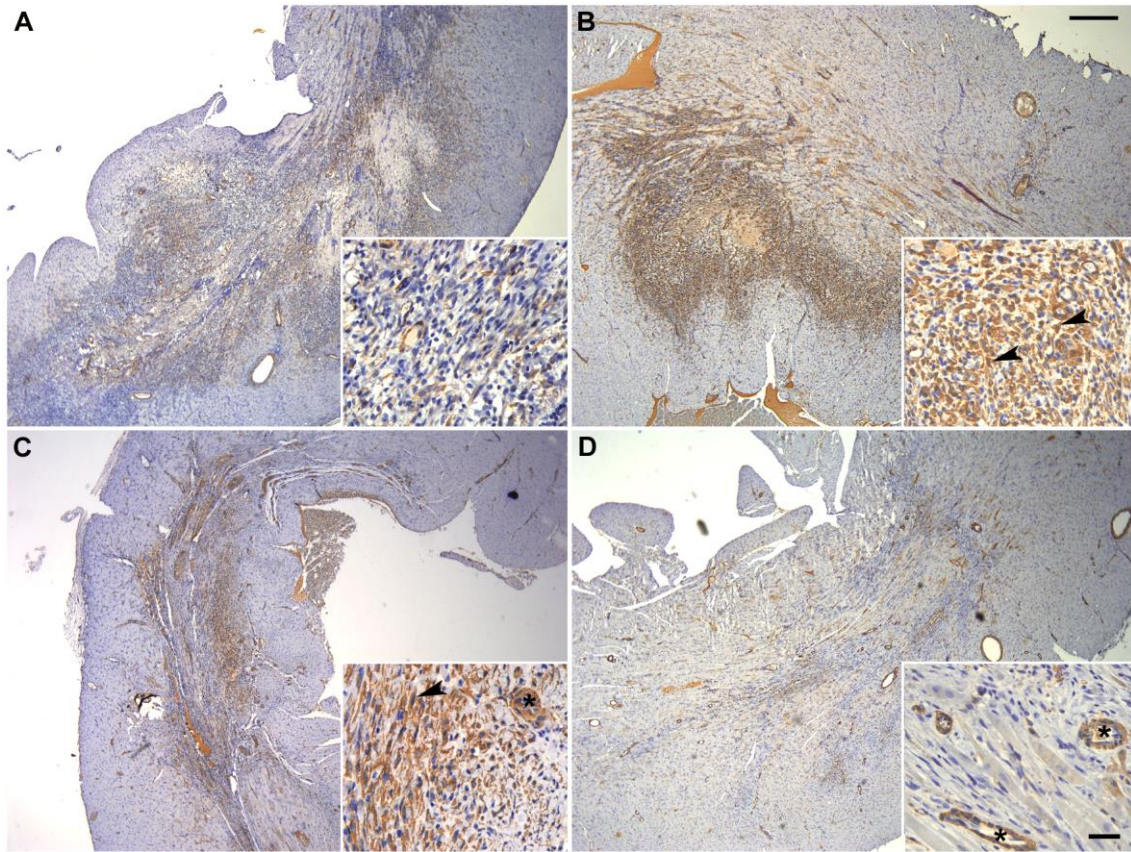
Značajna razlika u korist izofluranske skupine štakora nađena je i u broju α -SMA pozitivnih krvnih žila, $p < 0.05$ (Slika 13, donji red).



Slika 13. Usporedba izražaja α -SMA među skupinama prema vremenu žrtvovanja.

Gornji red – usporedba broja i postotka α -SMA pozitivnih stanica – miofibroblasta.

Donji red – usporedba broja i postotka α -SMA pozitivnih krvnih žila. Kontrola - kontrolna skupina; izofluran - izofluranska skupina štakora. * - značajna razlika između skupina u istome vremenu žrtvovanja; # - značajna razlika u istoj skupini tijekom vremena ($p < 0.05$).



Slika 13. Izražaj α -SMA u granulacijskom tkivu kontrolne (A, C) i izofluranske skupine štakora (B, D). A i B predstavljaju tkiva štakora žrtvovanih 4. dan, a C i D štakora žrtvovanih 14. dan od ozljede (povećanje $\times 10$). Kvadrati unutar slika A i B pokazuju granulacijsko tkivo na povećanju $\times 40$ sa većim brojem vretenastih miofibroblasta (glava strjelice) u izofluranskoj skupini (B) u odnosu na kontrolnu skupinu štakora (A). Kvadrati unutar slika C i D pokazuju povećan broj vretenastih miofibroblasta u kontrolnoj skupini (C, glava strjelice) za razliku od izofluranske skupine štakora (D) gdje je veći broj α -SMA pozitivnih krvnih žila (označene zvjezdicom). Mjerna ljestvica na povećanju od $\times 10$ iznosi $400 \mu\text{m}$, dok na povećanju od $\times 40$ iznosi $40 \mu\text{m}$.

5. RASPRAVA

Predmet istraživanja ove disertacije bio je utjecaj postkondicioniranja izofluranom na cijeljenje srčanog mišića nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede u štakora. Utvrđen je višestruki pozitivni utjecaj postkondicioniranja na subakutno/kronični model ishemijsko-reperfuzijske ozljede koji se može usporediti sa utjecajima prekondicioniranja anestetima te utjecajem ishemijskog postkondicioniranja.

Istraživanje je obavljeno na metodološki jedinstven način. Uvidom u literaturu nalazi se da je prvi put za ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu srca korišten transdijafragmalni pristup koji su za ishemijsku ozljedu koristili Aljinović i sur [82]. Ovim pristupom osigurana je dobra vidljivost srca, naročito njegove prednje površine, zajedno sa preciznom lokacijom LAD. To je omogućilo dovoljno mjesta za plasiranje cijevčice preko koje je napravljena vizualno izvrsno prikazana, te fotografski dokumentirana, reverzibilna ishemija željenog područja srca. Ovakav pristup omogućio je manju varijabilnost u veličini izazvane ozljede koja je nužno veća kod interkostalnog pristupa zbog nemoguće vizualizacije ishemije. Stoga su iz studije isključene sve životinje kojima infarkt nije zahvaćao cijelu prednju stijenku srca, a varijabilnost u veličini infarkta svedena je na minimum.

Razlike u veličini infarkta

Veličina infarkta važan je čimbenik jer je dokazano da manji infarkt određuje bolju funkciju srca i manju šansu za razvoj srčanih komplikacija i smrtnosti [83].

U ovom istraživanju nađeno je da postkondicioniranje izofluranom značajno smanjuje veličinu infarkta miokarda u subakutnom i kroničnom modelu, dakle smanjenje infarkta ostaje i u kasnijoj fazi cijeljenja ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Postkondicioniranje izofluranom je kod štakora žrtvovanih 4. dan imalo za posljedicu infarkt manji za 56-59%, a kod štakora žrtvovanih 14. dan za 64-68% u odnosu na kontrolnu grupu (uspoređujući veličine infarkta u mm² i u %). Dakle, ne samo da se dobio potvrđan odgovor na pitanje o nastavku učinka postkondicioniranja izofluranom na veličinu infarkta iza prvih nekoliko sati, već je smanjenje tijekom vremena i značajnije za 10-tak %. Očito je da je učinak izoflurana na stvaranje granulacijskog tkiva izazvao dodatan učinak na onaj koji je u mnogim kratkoročnim studijama (učinak praćen nekoliko sati nakon reperfuzije) izazvalo smanjenje broja apoptotskih stanica [28, 29]. Kada rezultate ovih kratkoročnih studija usporedimo sa rezultatima studija o ishemijskom postkondicioniranju, uočljivo je da izofluransko postkondicioniranje ima za posljedicu sličan utjecaj na veličinu infarkta.

Naime, prema rezultatima brojnih publikacija ishemijsko postkondicioniranje unutar nekoliko sati smanjuje veličinu infarkta između 23 i 60 % [84].

Međutim, od 9 studija na štakorima u kojima je reperfuzija trajala 24 sata, u 5 nije nađeno smanjenje infarkta ili je bilo minimalno, dok je u preostalim studijama smanjenje infarkta iznosilo 11-47% [84]. Uočljivo je da je smanjenje infarciranog područja u ovom istraživanju veće od svih navedenih. Dokazano je značajno smanjenje infarkta miokarda 4. i 14. dan nakon reperfuzije što je izrazito bitno za njegovo cijeljenje i funkciju srca.

Ishemijsko postkondicioniranje prošlo je i kliničku fazu ispitivanja, a rezultati studija su varijabilni. Novije dvije kliničke studije su u skladu sa navedenim preglednim člankom te ne pokazuju značajno smanjenje reperfuzijske ozljede [85, 86].

Pravi model postkondicioniranja hlapljivim anestheticima u kliničkoj praksi nije utvrđen. Pozitivne rezultate njihova učinka dale su studije tijekom primjene ovih anestetika intraoperativno u kardijalnoj kirurgiji koronarnih bolesnika [45]. Zahvat postavljanja premosnica predstavlja oblik ishemijsko-reperfuzijske ozljede iako nedovoljno definiran. Stoga postoji potreba za istraživanjem postkondicioniranja hlapljivim anestheticima kod perkutane koronarne intervencije koja se čini kao najbolje definirani ishemijsko-reperfuzijski model. U tom smislu ohrabruje izrazito povoljan utjecaj koji imaju hlapljivi anestetici na smanjenje postreperfuzijskih aritmija, prvenstveno ventrikularne tahikardije i fibrilacije koje često znaju biti uzrokom smrti nakon uspješno uspostavljenog protoka krvi [42, 43, 87].

Istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da izofluransko postkondicioniranje (kao i ono sevofluranom i desfluranom) smanjuje veličinu infarkta mjerenu nekoliko sati nakon reperfuzije. Razlike u opsegu protektivnog učinka postkondicioniranja između različitih vrsta hlapljivih anestetika nisu nađene [88].

Za uspjeh postkondicioniranja bitni su vrijeme primjene kao i koncentracija hlapljivog anestetika koju primjenjujemo [89]. U ovom istraživanju korištena je koncentracija od 1.0 MAK (1,5%) izoflurana jer je u toj koncentraciji prethodno dokazan najbolji učinak [21, 89].

U istraživanju na kunićima postkondicioniranje sa navedenom koncentracijom primjenjenom 3 minute prije i 2 minute nakon početka reperfuzije imalo je za rezultat smanjenje zone infarkta za 43%. U istoj studiji Chiari i sur. su naglasili da postkondicioniranje sa manjom dozom izoflurana nije izazvalo značajno smanjenje ishemijsko-reperfuzijske ozljede [21]. Slično je sa sevofluranom potvrdio i Obal sa sur. koji je na štakorima dokazao da doza manja od 1.0 MAK nema učinka dok doze veće od navedene nisu izazvale razmjerno dodatno smanjenje ozljede, koje je iznosilo također oko 40 % [90]. Redel i sur. su kod doze od 1.0 MAK dokazali sličan učinak na miševima bez obzira na izbor hlapljivog anestetika ali je smanjenje infarcirane zone bilo za više od 60% [88].

Za razliku od studije koju je proveo Chiari sa sur. [21], u ovom istraživanju, kao i u istraživanju Redela i sur., izofluran je primjenjen kroz dulji vremenski period u reperfuziji, što bi mogao biti uzrok većem smanjenju zone infarkta. Iako je jasno da su za postkondicioniranje bitni prvi trenuci nakon reperfuzije, u obzir dolazi mogućnost da primjenu anestetika od samo 2 minute nakon početka reperfuzije u budućim studijama ipak treba produžiti.

Ovome u prilog ide najnovija studija Yao i sur., koji su na srcu štakora pokazali da je potrebno barem 5 minuta primjene anestetika tijekom reperfuzije kako bi se dobio maksimalni izražaj kinaza koje potiču migraciju, diferencijaciju i preživljenje stanica [91].

U već navedenoj studiji Obala sa sur. [90] anestetik je primjenjen 15 minuta tijekom reperfuzije, ali smatramo da je veći učinak izostao jer u trenutku nastanka reperfuzije srčanog mišića koncentracija hlapljivog anestetika nije bila postignuta.

Važnost rane nazočnosti kardioprotektivnog signala naglasili su Kin i sur., koji su kod ishemijskog postkondicioniranja na štakorima našli važnost primjene intermitentnih ishemija upravo u prvoj minuti nakon reperfuzije [15].

Stvaranje krvnih žila

Iako sama reperfuzija okludirane krvne žile dovodi do smanjenja akutnog mortaliteta, dugoročno, pacijenti često razviju zatajenje srca [92]. Jedan od mogućih uzroka navedenog je i loše cijeljenje novonastale ishemijsko-reperfuzijske ozljede.

Cijeljenje infarkta dobrim dijelom ovisi o stvaranju granulacijskog tkiva, naročito o formiranju novih krvnih žila i miofibroblasta. Stvaranje mikrovaskulature u novonastalom infarktu je izrazito bitno za dostavu nutrijenata i kisika tj. regeneraciju tkiva [62]. Dosadašnje studije pokazale su da poticanje stvaranja novih krvnih žila (npr. implantacijom progenitornih stanica ili povećanim izražajem angiogenih faktora) smanjuje veličinu infarkta te poboljšava cijeljenje i funkciju srca nakon eksperimentalnog infarkta miokarda [93, 94]. Stoga je u istraživanju usmjerena pažnja na stvaranje novih krvnih žila, njihove morfološke karakteristike te moguće mehanizme njihova nastanka.

Poznato je da prekondicioniranje izofluranom posredovano aktivacijom ERK $\frac{1}{2}$ (dio MAPK-kinaza koje potiču preživljenje stanice) i HIF 1 α (engl. *hypoxia inducible factor* – pokreće se i uobičajeno kao dio obrambenog sustava organizma u hipoksiji, u prekondicioniranju je dodatno aktiviran) izaziva povećanje izražaja VEGF-a za 36 do 63% [69]. Također je poznato da i postkondicioniranje izofluranom ostvaruje svoje djelovanje i preko aktivacije ERK $\frac{1}{2}$ [23]. Ovo istraživanje po prvi put dokazuje da postkondicioniranje izofluranom izaziva povećanje izražaja VEGF-a, vjerojatno preko navedenog mehanizma.

U izofluranskoj skupini štakora žrtvovanoj 4. dan nađeno je za 43% povećanje VEGF imunoreaktivnosti koja je bila izražena u mnogim stanicama granulacijskog tkiva i endotelu krvnih žila. Prema dostupnoj literaturi, takav izgled stanica sugerira da se radi o makrofazima, miofibroblastima i progenitornim stanicama koje izražavaju VEGF u stanju hipoksije [56, 95, 96]. VEGF izražaj bio je nešto manji 14. dan, približno jednak u kontrolne i izofluranske skupine štakora. U izofluranskoj skupini štakora došlo je do značajnog smanjenja izražaja VEGF-a tijekom vremena pa zaključujem da povećanje izražaja VEGF-a koje izaziva postkondicioniranje izofluranom nije dugoročan učinak.

VEGF je potentan čimbenik koji potiče vaskulogenezu i angiogenezu odnosno stvaranje novih krvnih žila od progenitornih stanica, kao i stvaranje kolateralnih krvnih žila proliferacijom i migracijom postojećih. Stvaranje novih žila jednim i drugim putem događa se paralelno.

Izgleda da je za opstanak novih nezrelih krvnih žila važno vrijeme izloženosti čimbeniku rasta i sama razina VEGF-a, dok su zrelije žile prekrivene pericitima manje ovisne o njegovu utjecaju [97, 98]. Da bi kvantificirali stvaranje krvnih žila koristili smo izražaj PECAM-1/CD31 i nestina koji su već poznati biljezi u ovom dijelu cijeljenja infarkta [62, 76, 99].

PECAM-1/CD31 je adhezijska molekula endotela koja ima važnu ulogu u proliferaciji i migraciji novih krvnih žila (angiogenezi) te je naročito korisna kao biljeg proliferativne faze cijeljenja infarkta. U ovom istraživanju izražaj CD31 bio je jako povećan nakon postkondicioniranja izofluranom u štakora žrtvovanih 4. dan, što je bilo očekivano s obzirom na hipoksičnu ozljedu i povećanje izražaja VEGF-a. Histološki gledano, nađeni su jasni znakovi aktivne angiogeneze ("majčinske" krvne žile uz brojne kapilare). Zaključujem da postkondicioniranje izofluranom ima utjecaj na stvaranje bolje prokrvljenog granulacijskog tkiva. Međutim, u skladu sa dinamikom izražaja VEGF-a, u istoj skupini štakora 14. dan od reperfuzije utvrđen je značajan pad izražaja CD31. Dakle, izražaj CD31 dobro korelira sa utjecajem VEGF-a, što potvrđuje i činjenica da se izražaj CD31 među dugoročnim skupinama nije značajno razlikovao, iako je bio manji u izofluranske skupine. Istu dinamiku pokazao je i izražaj VEGF-a između 4. i 14. dana nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede.

Osim angiogeneze, za stvaranje novih krvnih žila bitna je i vaskulogeneza kao proces stvaranja krvnih žila iz progenitornih stanica. U tom smislu važnu ulogu imao je nestin, jer je biljeg nezrelih progenitornih stanica koje se mogu diferencirati u sve loze potrebne za cijeljenje infarkta: neurone, miofibroblaste, kardiomiocite te endotelne stanice [76]. Stoga je praćen izražaj nestina u endotelnim stanicama kako bi se kvantificirale sve „*de novo*“ nastale krvne žile. Broj nestin pozitivnih krvnih žila u svih štakora žrtvovanih 4. dan bio je puno manji od broja žila u kojima je izražen CD31. Mogući razlog tome je vjerojatno nešto kasniji početak intenzivne vaskulogeneze.

Tome u prilog idu rezultati studije koja govori da je najveći izražaj progenitornih stanica primjećen u proliferacijskoj fazi cijeljenja nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede [66]. Stoga je vjerojatno da u štakora žrtvovanih 4. dan broj nestin pozitivnih krvnih žila nije velik, jer su progenitorne stanice tek aktivirane. Rezultati dobiveni na štakorima žrtvovanim 14. dan, koji imaju puno veći izražaj nestina u krvnim žilama potvrđuju isto.

Navedene rezultate o broju krvnih žila i dinamici njihova razvoja upotpunjuje izražaj α SMA koji nalazimo na pericitima i glatkim mišićnim stanicama koji okružuju krvne žile. α SMA pozitivne krvne žile su zrelije te neovisne o izražaju VEGF-a da bi očuvale svoj integritet.

Broj α SMA pozitivnih krvnih žila nije se značajno mijenjao među skupinama štakora žrtvovanih 4. dan, što je logično s obzirom da je prerano za utjecaj povećanog izražaja VEGF-a na sazrijevanje krvnih žila, jer su nove krvne žile tek u razvoju. 14. dan histološka slika se mijenja, infarkti štakora postkondicioniranih izofluranom imaju značajno veći broj, kao i postotak α SMA pozitivnih krvnih žila. Navedeno se može objasniti već spomenutim učinkom izoflurana na bolju prokrvljenost granulacijskog tkiva, što vjerojatno ima za učinak bolje i brže cijeljenje infarkta te se zrelost infarkta očituje i većim izražajem α SMA u krvnim žilama. Ukupni broj krvnih žila povećao se tijekom vremena, ali se njihov broj nije značajno razlikovao među skupinama. Zaključujem da, iako izofluran subakutno povećava angiogenezu i vaskulogenezu, utjecaj koji VEGF ima je kratkotrajan i nedovoljno izražen da bi izazvao promjene u ukupnom broju krvnih žila u kroničnom infarktu. Za pretpostaviti je da veliki dio novostvorenih krvnih žila u granulacijskom tkivu infarkta tijekom vremena propada, ali ima ulogu u boljem cijeljenju infarkta.

Dakle, dugoročna posljedica postkondicioniranja izofluranom je zreliji infarkt, sa značajno većim postotkom zrelih krvnih žila. Iako broj ukupnih krvnih žila među skupinama nije različit, sigurno je da izofluranska skupina ima veći broj krvnih žila koje neće propasti. Da li bi i krvne žile kontrolne skupine uspjele sazrijeti ili bi se povukle do kraja cijeljenja infarkta, ostaje pitanje za nastavak ovog istraživanja.

Miofibroblasti

Fibroblasti imaju veliki udio u strukturi srca, ali i u funkciji. Osim njihove bitne uloge kao regulatora stvaranja izvanstaničnog matriksa, nezamjenjivi su prilikom remodeliranja miokarda koje se događa u patološkim stanjima, kao što su hipertenzija, srčano zatajenje i infarkt. Mnogo funkcionalnih učinaka ostvaruju preko diferencijacije u miofibroblaste, stanice koje izražavaju kontraktilne proteine uključujući i α -SMA te posjeduju osobita migracijska, proliferacijska i sekrecijska svojstva.

Modulirani su i mehaničkim silama, naročito u stanju ishemije-reperfuzije. Zbog sposobnosti kontrakcije kolagena bitni su za održavanje mehaničkih sila i strukture te smanjuju zonu infarkta [100]. Proučavanje uloge miofibroblasta je uključeno u ovo su istraživanje s obzirom na saznanje da dio miofibroblasta nastaje diferenciranjem iz progenitornih stanica. Naime, u istraživanju je utvrđen značajno veći broj progenitornih stanica u infarktima štakora postkondicioniranih izofluranom te se, kao što je nađen značajno veći broj “*de novo*” nastalih krvnih žila, očekivao i veći broj miofibroblasta u proliferacijskoj fazi cijeljenja infarkta.

Prema očekivanju, broj miofibroblasta (α -SMA pozitivnih stanica izvan krvnih žila), kao i ukupan broj stanica granulacijskog tkiva štakora žrtvovanih u subakutnoj fazi cijeljenja bio je velik. Dok za ukupan broj stanica među skupinama nije bilo značajne razlike, broj miofibroblasta bio je značajno veći u štakora postkondicioniranih izofluranom, što je bilo u skladu sa očekivanjem.

Štakori žrtvovani 14. dan imali su značajno manji ukupni broj stanica i miofibroblasta što je u skladu s očekivanom hipocelularnošću kronične faze cijeljenja. Odlika kroničnog infarkta je odumiranje miofibroblasta apoptozom te nastajanje vezivnog ožiljka. Ako broj miofibroblasta ostane visok, mogu uzrokovati patološku fibrozu, aritmije i zatajenje srca [101].

Dok je postkondicioniranje izofluranom 4. dan nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede imalo za posljedicu značajno veći broj miofibroblasta u infarktu, 14. dan broj miofibroblasta u infarktima izofluranske skupine bio je značajno manji nego u infarktima kontrolne skupine štakora. Ovi rezultati su u suglasju sa već postavljenom tezom o “zrelijem” kroničnom infarktu u štakora postkondicioniranih izofluranom.

Dakle, u zoni infarkta, 14. dan nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede, životinje postkondicionirane izofluranom imale su značajno manje miofibroblasta, a veći postotak α SMA pozitivnih krvnih žila, što predstavlja glavni kriterij za procjenu zrelosti u cijeljenju infarkta [62]. Za pretpostaviti je, da je kvalitetnija građa granulacijskog tkiva izofluranske skupine štakora sa više krvnih žila i miofibroblasta potakla brže cijeljenja zone infarkta što se očitovalo na izgledu infarkta štakora žrtvovanih 14. dan.

Progenitorne stanice i diferencijacija

Kao biljeg progenitornih stanica korišten je nestin. Pripada intermedijarnim filamentima te se javlja u razvojnim fazama i staničnoj diferencijaciji mnogih tkiva.

Nestin pozitivne progenitorne stanice mobiliziraju se u područje infarkta, a podrijetla su stanica neuralnog grebena te se inače nalaze između kardiomiocita zdravog srca [81]. U više studija u zoni infarkta srčanog mišića dokazana je imunoreaktivnost na nestin u progenitornim stanicama koje se diferenciraju.

Kako njihova diferencijacija napreduje, izražaj nestina se smanjuje jer ga zamjenjuju drugi intermedijarni filamenti. Stoga se smatra idealnim biljekom za praćenje regeneracije nakon infarkta jer omogućava praćenje progenitornih stanica srca [102].

Nestin pozitivne pluripotentne progenitorne stanice prepoznaju se kao male stanice sa brojnim izdancima, morfološki jako različite od ostalih stanica granulacijskog tkiva [77]. U ovom istraživanju u zoni infarkta nalazile su se u nakupinama, dok su se oko njih, ovisno o fazi cijeljenja infarkta, nalazile nestin pozitivne stanice koje su predstavljale preteče za određene loze stanica. Tako su se iz nestin pozitivnih endotelnih progenitornih stanica (kolokalizacija nestina i CD31) diferencirale nestin pozitivne endotelne stanice od kojih su nastajale nove krvne žile. To je bio razlog da smo nestin koristili kao biljeg vaskulogeneze.

Nadalje, izražaj nestina se mogao prepoznati i u tipičnim vretenastim stanicama granulacijskog tkiva, što sugerira diferencijaciju progenitornih stanica u miofibroblaste. Na kraju, utvrđena je i subpopulacija nestin pozitivnih stanica iz kojih su se najvjerojatnije diferencirali novi kardiomiociti.

Broj nestin pozitivnih stanica bio je najveći u subakutnoj fazi cijeljenja infarkta u štakora postkondicioniranih izofluranom. Bio je značajno veći nego u u istoj fazi cijeljenja kod kontrolne skupine životinja. Navedeno se može objasniti povećanim izražajem VEGF-a i aktivacijom kinaza PI3K-Akt. Novija istraživanja idu u prilog ovog mehanizma. Naime, dokazano je da VEGF preko PI3K-Akt kinaza potiče migraciju srčanih progenitornih stanica u područje infarkta [103]. Ulogu VEGF-a kao važnog čimbenika za funkciju progenitornih stanica utvrdili su Markel i sur., koji su na ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi izoliranih srca štakora našli da progenitorne stanice koje, genetskom modifikacijom, nemaju VEGF protein, nemaju učinak na oporavak funkcije srca [104].

Već je poznata činjenica kako postkondicioniranje izofluranom potiče aktivnost navedenih kinaza, a u istraživanju je utvrđeno kako povećava i izražaj VEGF-a u subakutnoj fazi cijeljenja. Stoga ne čudi da je u izofluranskoj skupini štakora žrtvovanih 4. dan nađen i značajno veći broj progenitornih stanica.

U ovom istraživanju najveći naglasak je stavljen na nastanak novih krvnih žila. Brojni navodi iz literature ukazuju da je za definiranje subpopulacije endotelnih progenitornih stanica najvažniji ko-izražaj nestina sa CD31, budući da potonji predstavlja biljeg endotela [105].

Broj nestin-CD31 pozitivnih stanica u subakutnoj fazi cijeljenja infarkta bio je nizak u obje skupine. Za pretpostaviti je da je uzrok tome nedovoljna diferencijacija progenitornih stanica u endotelne progenitorne stanice. U prilog navedenom govori i značajno povećanje broja nestin-CD31 pozitivnih stanica te nestin pozitivnih krvnih žila od 4. do 14. dana nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede.

Iako je broj endotelnih progenitornih stanica u subakutnoj fazi cijeljenja bio nizak, u skladu za značajnom razlikom u broju progenitornih stanica tijekom subakutne faze cijeljenja infarkta štakora postkondicioniranih izofluranom, broj endotelnih progenitornih stanica bio je značajno veći u izofluranske skupine životinja.

Kim i sur. su na ishemijskoj ozljedi srca u štakora pokazali da su, genetski modificirane, progenitorne stanice koje su izlučivale više VEGF-a bile brojnije u zoni infarkta te su imale veći učinak na vaskulogenezu. Osim toga, smanjile su broj apoptotskih stanica u zoni infarkta te količinu fibroze i samu veličinu infarkta [68].

I u ovom istraživanju su štakori postkondicionirani izofluranom u subakutnoj fazi cijeljenja infarkta imali značajno veći izražaj VEGF-a, kao i broj progenitornih stanica koji je vjerojatno rezultirao značajno većom vaskulogenezom. Za pretpostaviti je da je, među ostalim čimbenicima, i povećani broj progenitornih stanica imao za posljedicu značajno smanjenje veličine kroničnog infarkta.

Veliki broj nestin pozitivnih progenitornih stanica nađen je i u obje skupine štakora žrtvovanih 14. dan, što se može objasniti još uvijek prisutnim velikim izražajem VEGF-a. Ovi rezultati u suglasju su sa rezultatima studije Zhao i sur. koji su u infarktu kontrolne skupine štakora i 21 dan nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede našli izražaj VEGF-a i broj progenitornih stanica značajno veći od normale [66]. Međutim, utvrđen je značajno manji broj nestin pozitivnih stanica u kroničnim infarktima izofluranske skupine štakora. Ovaj rezultat je u skladu sa već navedenim rezultatima koji pokazuju veću zrelost infarkta u toj skupini štakora. Naime, infarkt je u fazi boljeg cijeljenja te više nisu prisutne nakupine pluripotentnih nestin pozitivnih progenitornih stanica, a većina nestin izražaja je u subpopulacijama različitih loza potrebnih za regeneraciju, naročito u endotelnim stanicama i kardiomiocitima.

Kako je već navedeno, 14. dan od ishemijsko-reperfuzijske ozljede vaskulogeneza je u punom zamahu, a slično se događa i sa nezrelim, novonastalim kardiomiocitima. Naime u subakutnom infarktu nisu nađeni, ali u kroničnim infarktima obje skupine štakora događa se očita regeneracija miokarda. Istaknutija je kod izofluranske skupine te se kao i drugi rezultati uklapa u hipotezu da su kronični infarkti te skupine životinja zreliji i bolje organizirani, odumrli kardiomiociti se zamjenjuju novima. El-Helou i sur. pronašli su nestin pozitivne stanice slične kardiomiocitima u infarktu štakora. Imunoreaktivnost na nestin u tim stanicama pokazala je karakteristični isprugani uzorak [77]. Sličan uzorak našli su i Wiese i sur. te zaključili da ga uzrokuje heterodimerna formacija nestina sa dezminom [75]. I u ovom istraživanju našli smo sličan uzorak koji upućuje na nastajanje mladih kardiomiocita iz nestin pozitivnih progenitornih stanica tijekom regeneracije miokarda.

Navedeno su potvrdili Tamura i sur. te pokazali da progenitorne stanice porijekla neuralnog grebena nakon izazivanja infarkta migriraju u područje infarkta te se, među ostalim, diferenciraju i u kardiomiocite [106]. Sve navedeno upućuje da postoji dovoljan broj studija na životinjama koje govore da subpopulacija nestin pozitivnih stanica porijekla neuralnog grebena direktno pridonosi obnavljanju miokarda nakon ishemijske ozljede. Ovo istraživanje upućuje na isto i kod ishemijsko-reperfuzijske ozljede.

Rezultati slični onima dobivenim u studijama na životinjskim modelima nađeni su i kod ljudi. U studijama koje su vodili Béguin [107] te Mokry sa sur. [108] nađeni su nestin pozitivni kardiomiociti u zoni infarkta ishemijskom oštećenog ljudskog srca. Prisustvo nestin pozitivnih kardiomiocita dodatno podupire tezu o sudjelovanju nestin pozitivnih progenitornih stanica u regeneraciji nakon ishemijske ozljede srca.

Dokazano je da je nestin biljeg progenitornih stanica koje nisu porijekla koštane srži [102]. Studija Fukuhare i sur. pokazala je da matične stanice porijekla koštane srži ionako imaju manji učinak na obnovu srčanog mišića nakon ishemijske [109]. Stoga se nameće kao biljeg progenitornih stanica koje se nalaze u srcu te omogućava praćenje regeneracije ozljedom oštećenog srčanog mišića.

Zaključak i budućnost

Rezultati ove studije nadopunili su rezultate dosadašnjih studija te pokazali da postkondicioniranje izofluranom djeluje preko sličnih mehanizama koje i prekondicioniranje koristi za smanjenje reperfuzijske ozljede.

Uvidom u dostupnu literaturu utvrđeno je da ne postoje studije na životinjskim modelima u kojima se pratila veličina infarkta duže od 24 sata nakon reperfuzije niti kod ishemijskog niti kod izofluranskog postkondicioniranja. Ova studija je po prvi puta pokazala da postkondicioniranje izofluranom ima za posljedicu smanjenu veličinu infarkta 4. i 14. dan nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Utjecaj na smanjenje veličine kroničnog infarkta bio je znatniji od utjecaja na veličinu subakutnog infarkta, kao i, uostalom, od utjecaja koje je postkondicioniranje hlapljivim anestheticima pokazalo u mnogim kratkoročnim studijama. Navedeno bi se moglo objasniti povoljnim učinkom postkondicioniranja izofluranom na stvaranje i izgled ožiljka, poglavito u pogledu sastava granulacijskog tkiva te obnavljanja infarciranog područja.

Naime, u subakutnoj fazi cijeljenja infarkta štakora postkondicioniranih izofluranom utvrđen je veći broj krvnih žila i miofibroblasta te veći broj progenitornih stanica što je vjerojatno imalo za posljedicu brže cijeljenje infarkta.

Rezultati ovog i drugih istraživanja ukazuju na činjenicu da je postkondicioniranje hlapljivim anestheticima nepravedno zanemareno u kliničkoj praksi, poglavito kod perkutanih koronarnih intervencija. Kako je već navedeno, ishemijsko postkondicioniranje je u tom smislu dalo varijabilne rezultate, kao i u rezultatima studija na životinjama u kojima su učinci praćeni 24 sata od reperfuzije. U kliničkoj praksi, kod kirurške revaskularizacije miokarda koja je nejasno definirana ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, potvrđen je učinak postkondicioniranja sevofluranom [45]. Vjerujemo da bi učinak bio bolji kod primjene u invazivnom kardiološkom laboratoriju, naročito zbog definiranosti modela i uzorka te standardnosti primjene koncentracije anestetika. Dosada je u tom pogledu bio korišten jedino sevofluran, ali kod prekondicioniranja koje je bilo neuspješno jer je anestetik bio primjenjen u izrazito maloj dozi [110]. Jedna klinička studija o utjecaju hlapljivih anestetika na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu i to sa prekondicioniranjem je premalo s obzirom na brojnost kliničkih studija kojima se istražuje ishemijsko postkondicioniranje.

Na daljnja razmišljanja navode nas u novijoj preglednoj studiji Sanade i sur. koji iznose potencijalno loš utjecaj komorbiditeta i starosti bolesnika na uspješnost bilo kojeg oblika postkondicioniranja. Autori navode da postoji velika potreba za stvaranjem novih, jasno definiranih kliničkih studija kako bi se taj problem razjasnio. Zaključuju kako uspjeh postkondicioniranja ovisi o težini komorbiditeta, trenutnom stanju bolesnika i lijekovima koje uzima te o jaćini kardiprotektivnog signala. Naime, smanjenje kardiprotektivnog učinka u nekim stanjima ne znaći zaustavljanje svih protektivnih putova [20].

U tom smislu smatram da buduće kliničke studije trebaju imati jasno definirane kriterije uzorka u smislu raspona godina, eventualnih komorbiditeta te kriterije mjesta i dućine trajanja okluzije odnosno trajanja simptoma. Sörensön i sur. su u novijim kliničkim studijama pokazali da ishemijsko postkondicioniranje ima učinak ako se radi o velikom području srca ugroženom ishemijom [111, 112]. Nadalje, Chen i sur. su na zećevima pokazali da preduga okluzija koronarne žile također smanjuje uspjeh postkondicioniranja sevofluranom [113]. Obje studije navode na zaključak da postkondicioniranje ima smisla u onim slučajevima kada ishemija nije ireverzibilno oštetila cijelo ugroćeno područje, koje mora biti dovoljno veliko da se pokaže utjecaj postkondicioniranja na smanjenje broja apoptotskih stanica.

Uz navedeno, mora se naći primjerenost doze te načina primjene hlapljivog anestetika, kao i razmotriti mogući aditivni učinak više signala postkondicioniranja [114]. Kada se navedeno definira, postupak postkondicioniranja naći će svoje stalno mjesto u kliničkoj praksi.

Nedostaci studije:

Nedostatak ovog istraživanja jest što smo tijekom operacije u prednjoj interventrikularnoj brazdi podvezali zajedno arteriju i venu, a to nije slučaj kod nastanka infarkta srca u ljudi.

Nedostatak je i sam mehanizam nastanka okluzije krvne žile koji se razlikuje u eksperimentalnom modelu i praksi. Naime, u našem istraživanju okluzija krvne žile je postignuta naglo i izvana, dok se u stvarnosti začepljenje događa trombozom aterosklerotskog plaka koji se formira godinama. Ova disertacija je rađena na mladim štakorima kod kojih nije postojao komorbiditet koji često postoji kod pacijenata sa infarktom miokarda. Pri tome je u prvom redu zanemaren utjecaj dijabetesa, hipertenzije i hiperlipidemije koji potencijalno može biti značajan. Djelomičan nedostatak istraživanja je i način mjerenja veličine infarkta kod kojeg zbog tehničkih ograničenja nije, kao u većine kratkoročnih studija, u obzir uzimana procjena veličine „ugroženog područja“ (engl. *area at risk*) u odnosu na veličinu infarkta.

6. ZAKLJUČCI

1. Postkondicioniranje izofluranom značajno smanjuje veličinu infarkta mjerenu u subakutnoj i kroničnoj fazi cijeljenja nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede u štakora.
2. Izofluransko postkondicioniranje značajno povećava udio VEGF pozitivnih stanica u granulacijskom tkivu tijekom subakutne faze cijeljenja infarkta. 14. dan nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede nema značajne razlike u izražaju VEGF-a među skupinama.
3. Iz značajno većeg broja CD31 i nestin imunoreaktivnih krvnih žila te α SMA imunoreaktivnih miofibroblasta nađenih 4.-og dana nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede u izofluranske skupine štakora zaključujemo da postkondicioniranje izofluranom ima povoljan učinak na stvaranje granulacijskog tkiva.
4. Postkondicioniranje izofluranom značajno povećava broj nestin pozitivnih progenitornih stanica u subakutnoj fazi cijeljenja ishemijsko-reperfuzijske ozljede.
5. Postkondicioniranje izofluranom značajno smanjuje broj progenitornih stanica i miofibroblasta, a povećava broj i postotak zrelih krvnih žila u kroničnoj fazi cijeljenja ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Navedeno ukazuje da infarcirano područje brže cijeli odnosno da je infarkt izofluranske skupine štakora u toj fazi „zreliji“.
6. U kroničnoj fazi cijeljenja ishemijsko-reperfuzijske ozljede broj nezrelih, „mladih“ kardiomiocita značajno je veći u području infarkta štakora postkondicioniranih izofluranom što dodatno potvrđuje tezu o bržem cijeljenju infarkta.

7. SAŽETAK

Uvidom u literaturu nalazim da je prvi put u nekom istraživanju za ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu srca korišten transdijafragmalni pristup koji omogućuje bolji prikaz ishemičkog područja te manju varijabilnost rezultata.

Istraživanje je po prvi put dokazalo utjecaj postkondicioniranja izofluranom na veličinu infarkta tijekom subakutne i kronične faze cijeljenja ishemijsko-reperfuzijske ozljede.

Utjecaj postkondicioniranja na smanjenje infarkta je tijekom vremena rastao što se može objasniti povoljnim učinkom na stvaranje granulacijskog tkiva (sa 56-59% na 64-68% ovisno o načinu mjerenja veličine infarkta). Naime, postkondicioniranje izofluranom izazvalo je stvaranje značajno većeg broja krvnih žila i miofibroblasta u granulacijskom tkivu tijekom subakutne faze cijeljenja ozljede. Navedeno ima bitan utjecaj na cijeljenje ozljedom zahvaćenog područja, koje je bolje opskrbljeno krvlju i nutrijentima te se bolje kontrahira.

U procesu stvaranja kvalitetnijeg granulacijskog tkiva važnu ulogu su imali povećanje izražaja VEGF-a te povećana regenerativna sposobnost infarciranog područja u štakora postkondicioniranih izofluranom. Naime, u navedenoj skupini štakora utvrđen je značajno veći broj nestin pozitivnih progenitornih stanica tijekom proliferacijske faze cijeljenja infarkta. Za pretpostaviti je da su se iz progenitornih stanica razvile subpopulacije stanica koje su omogućile stvaranje kvalitetnijeg granulacijskog tkiva. Navedeno je potvrđeno na primjeru endotelnih progenitornih stanica i krvnih žila koje su se iz njih razvile. Dakle, u granulacijskom tkivu štakora nađen je veći broj krvnih žila nastalih angiogenezom i vaskulogenezom. Zbog navedenih učinaka, infarcirana područja štakora postkondicioniranih izofluranom kvalitetnije su i brže cijelila. Stoga u kroničnoj fazi cijeljenja ishemijsko-reperfuzijske ozljede kod izofluranske skupine štakora nalazimo manje nezrelog granulacijskog tkiva te više zrelih α SMA pozitivnih krvnih žila.

14. dan nakon ozljede broj nezrelih kardiomiocita veći je kod životinja postkondicioniranih izofluranom, što također ide u prilog tezi o bržem cijeljenju područja oštećenog ishemijom i reperfuzijom, u kojem dolazi do zamjene odumrlog srčanog mišića.

Istraživanje naglašava važnost primjene inhalacijskih anestetika tijekom ishemijsko-reperfuzijske ozljede srca te navodi na razmišljanja o kliničkim studijama gdje bi se isti mogli primjenjivati. Jedna od mogućnosti je primjena u reperfuziji nakon perkutane koronarne intervencije (sa dilatacijom koronarne arterije balonom ili postavljanjem „stenta“).

8. SUMMARY

The result of detailed literature search is a finding that this is the first time that an original diaphragmectomy-based approach to produce ischemia-reperfusion model of myocardial damage offers not only better visualization of the heart but also decreases variability of results.

Also, for the first time it was shown that isoflurane postconditioning has a positive influence on the size of infarct in both subacute and chronic phase of healing following the ischemia-reperfusion model of injury.

The positive influence of postconditioning increased with the duration of recovery probably through an increase of formation of mature fibrous tissue (from 56-59% to 64-68% depending on methodology of assessment of infarct size). Postconditioning led to formation of significantly greater number of blood vessels and myofibroblasts in scar tissue during subacute phase of healing. This has an important influence on the process of healing of the entire affected area via better blood/nutrient supply leading to more efficient contractility. Also, better quality of scar tissue was a result of increased expression of VEGF leading to an increase of regenerative capacity of postconditioned animals.

In addition to this, the increased number of nestin positive progenitor cells led to development of mature cells responsible for the process of healing, which in turn led to better and faster recovery. This has been confirmed when both endothelial progenitor cells and blood vessels were taken into account. Hence, in the chronic model of isoflurane postconditioning we found smaller quantity of immature scar tissue and more mature α SMA positive vessels than in acute model.

14 days after injury, the number of mature cardiomyocytes was greater in animals with postconditioning which is an additional proof of faster and more efficient healing which includes replacement of myocytes. This research has also clinical repercussions and implies a possibility of application of volatile anesthetics in situations like percutaneous coronary interventions (with dilatation of the arterial lumen by a balloon or by inserting a stent).

9. LITERATURA

1. I. Damjanov, S.J., M. Nola, ed. *Patologija*. 3. ed. 2010, Medicinska naklada: Zagreb.
2. Heestermans, T., et al., *The golden hour of prehospital reperfusion with triple antiplatelet therapy: a sub-analysis from the Ongoing Tirofiban in Myocardial Evaluation 2 (On-TIME 2) trial early initiation of triple antiplatelet therapy*. *Am Heart J*, 2010. **160**(6): p. 1079-84.
3. Freude, B., et al., *Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**(2): p. 197-208.
4. Eefting, F., et al., *Role of apoptosis in reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 414-26.
5. Gross, G.J. and J.A. Auchampach, *Reperfusion injury: does it exist?* *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(1): p. 12-8.
6. Vilahur, G., et al., *Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(3): p. 522-33.
7. Krause, S. and M.L. Hess, *Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia*. *Circ Res*, 1984. **55**(2): p. 176-84.
8. du Toit, E.F. and L.H. Opie, *Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion*. *Circ Res*, 1992. **70**(5): p. 960-7.
9. Thompson-Gorman, S.L. and J.L. Zweier, *Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(12): p. 6656-63.
10. Piper, H.M., et al., *Calcium and sodium control in hypoxic-reoxygenated cardiomyocytes*. *Basic Res Cardiol*, 1993. **88**(5): p. 471-82.
11. Zorov, D.B., et al., *Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore*. *Cardiovasc Res*, 2009. **83**(2): p. 213-25.
12. Dorge, H., R. Schulz, and G. Heusch, *Pathophysiology of hibernation, stunning, and ischemic preconditioning*. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1998. **46 Suppl 2**: p. 255-62; discussion 263.
13. Brosh, D., et al., *Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality*. *Am J Cardiol*, 2007. **99**(4): p. 442-5.
14. Okamoto, F., et al., *Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1986. **92**(3 Pt 2): p. 613-20.
15. Kin, H., et al., *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(1): p. 74-85.
16. Piper, H.M., Y. Abdallah, and C. Schafer, *The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 365-71.
17. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(2): p. H579-88.
18. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. *Circulation*, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
19. Morin, D., et al., *Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection*. *Curr Med Chem*, 2009. **16**(33): p. 4382-98.

20. Sanada, S., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(5): p. H1723-41.
21. Chiari, P.C., et al., *Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits*. Anesthesiology, 2005. **102**(1): p. 102-9.
22. Feng, J., et al., *Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling*. Anesthesiology, 2006. **104**(5): p. 1004-14.
23. Krolkowski, J.G., et al., *Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo*. Can J Anaesth, 2006. **53**(2): p. 174-82.
24. Yao, Y.T., et al., *Sevoflurane postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury: the role of radical oxygen species, extracellular signal-related kinases 1/2 and mitochondrial permeability transition pore*. Mol Biol Rep. **37**(5): p. 2439-46.
25. Li, D.Y., et al., *Role of ERK1/2 in the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion*. Apoptosis, 2006. **11**(6): p. 923-30.
26. Takatani, T., et al., *Taurine prevents the ischemia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes through Akt/caspase-9 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(2): p. 484-9.
27. Desagher, S. and J.C. Martinou, *Mitochondria as the central control point of apoptosis*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(9): p. 369-77.
28. Inamura, Y., et al., *Sevoflurane postconditioning prevents activation of caspase 3 and 9 through antiapoptotic signaling after myocardial ischemia-reperfusion*. J Anesth, 2010. **24**(2): p. 215-24.
29. Pravdic, D., et al., *Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(2): p. 220-32.
30. Pagel, P.S., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase enhances isoflurane-induced protection against myocardial infarction during early reperfusion in vivo*. Anesth Analg, 2006. **102**(5): p. 1348-54.
31. Krolkowski, J.G., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels*. Anesth Analg, 2005. **101**(6): p. 1590-6.
32. Feng, J., et al., *Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta*. Anesthesiology, 2005. **103**(5): p. 987-95.
33. Ge, Z.D., et al., *Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism*. Anesthesiology, 2010. **112**(1): p. 73-85.
34. Das, A., L. Xi, and R.C. Kukreja, *Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12944-55.
35. Kim, Y.M., C.A. Bombeck, and T.R. Billiar, *Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis*. Circ Res, 1999. **84**(3): p. 253-6.
36. Babaei, S., et al., *Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor*. Circ Res, 1998. **82**(9): p. 1007-15.
37. Babaei, S. and D.J. Stewart, *Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(1): p. 190-200.

38. Kawaguchi, M., et al., *Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Circulation*. **123**(6): p. 594-604.
39. Heindl, B., et al., *Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing postischemic adhesion of polymorphonuclear neutrophils*. *Anesthesiology*, 1999. **91**(2): p. 521-30.
40. Chappell, D., et al., *Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx*. *Anesthesiology*, 2010. **115**(3): p. 483-91.
41. Lucchinetti, E., et al., *Anaesthetic preconditioning but not postconditioning prevents early activation of the deleterious cardiac remodelling programme: evidence of opposing genomic responses in cardioprotection by pre- and postconditioning*. *Br J Anaesth*, 2005. **95**(2): p. 140-52.
42. Zhang, F., et al., *Sevoflurane postconditioning converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm*. *Eur J Anaesthesiol*, 2009. **26**(9): p. 766-71.
43. Urdaneta, F., et al., *Treating myocardial stunning randomly, with either propofol or isoflurane following transient coronary occlusion and reperfusion in pigs*. *Ann Card Anaesth*, 2009. **12**(2): p. 113-21.
44. Guerrero Orriach, J.L., et al., *Prolonged sevoflurane administration in the off-pump coronary artery bypass graft surgery: Beneficial effects*. *J Crit Care*, 2013.
45. De Hert, S.G., et al., *Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration*. *Anesthesiology*, 2004. **101**(2): p. 299-310.
46. Fishbein, M.C., D. Maclean, and P.R. Maroko, *The histopathologic evolution of myocardial infarction*. *Chest*, 1978. **73**(6): p. 843-9.
47. Pfeffer, M.A., et al., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. *Circ Res*, 1979. **44**(4): p. 503-12.
48. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(11-12): p. 1907-39.
49. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **48**(3): p. 504-11.
50. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
51. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(5): p. 349-63.
52. Frangogiannis, N.G., et al., *Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion*. *Circulation*, 1998. **98**(7): p. 687-98.
53. Sun, J., et al., *Improvement in cardiac function after bone marrow cell therapy is associated with an increase in myocardial inflammation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(1): p. H43-50.
54. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. *Lancet*, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
55. McSweeney, S.J., et al., *Improved heart function follows enhanced inflammatory cell recruitment and angiogenesis in 11betaHSD1-deficient mice post-MI*. *Cardiovasc Res*, 2010. **88**(1): p. 159-67.
56. van Amerongen, M.J., et al., *Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(3): p. 818-29.

57. Liu, X., et al., *Nitric oxide inhalation improves microvascular flow and decreases infarction size after myocardial ischemia and reperfusion*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(8): p. 808-17.
58. Kido, M., et al., *Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(11): p. 2116-24.
59. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10344-9.
60. Chen, L., A. Endler, and F. Shibasaki, *Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors*. Exp Mol Med, 2009. **41**(12): p. 849-57.
61. Nagy, J.A., A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, *VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis*. Trends Cardiovasc Med, 2003. **13**(5): p. 169-75.
62. Ren, G., et al., *Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(1): p. 71-9.
63. Yaoita, H., et al., *Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(3): p. 630-41.
64. Zymek, P., et al., *The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2315-23.
65. Hellstrom, M., et al., *Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis*. J Cell Biol, 2001. **153**(3): p. 543-53.
66. Zhao, Z.Q., et al., *Improvement in cardiac function with small intestine extracellular matrix is associated with recruitment of C-kit cells, myofibroblasts, and macrophages after myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(12): p. 1250-61.
67. Zhou, R.H., et al., *Vascular endothelial growth factor activation of sterol regulatory element binding protein: a potential role in angiogenesis*. Circ Res, 2004. **95**(5): p. 471-8.
68. Kim, S.H., et al., *Hypoxia-inducible vascular endothelial growth factor-engineered mesenchymal stem cells prevent myocardial ischemic injury*. Mol Ther, 2011. **19**(4): p. 741-50.
69. Wang, C., et al., *Extracellular signal-regulated kinases trigger isoflurane preconditioning concomitant with upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in rats*. Anesth Analg, 2006. **103**(2): p. 281-8, table of contents.
70. Frangogiannis, N.G., L.H. Michael, and M.L. Entman, *Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb)*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(1): p. 89-100.
71. Gabbiani, G., *Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(3): p. 545-8.
72. Woodfin, A., M.B. Voisin, and S. Nourshargh, *PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(12): p. 2514-23.
73. Park, S., et al., *PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(6): p. C1468-84.
74. Bagi, Z., et al., *PECAM-1 mediates NO-dependent dilation of arterioles to high temporal gradients of shear stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(8): p. 1590-5.
75. Wiese, C., et al., *Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2510-22.
76. Calderone, A., *Nestin+ cells and healing the infarcted heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(1): p. H1-9.

77. El-Helou, V., et al., *Resident nestin+ neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium*. Hypertension, 2005. **46**(5): p. 1219-25.
78. Beguin, P.C., et al., *Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts*. J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 813-20.
79. Beguin, P.C., et al., *The phenotype and potential origin of nestin+ cardiac myocyte-like cells following infarction*. J Appl Physiol, 2009. **107**(4): p. 1241-8.
80. Mokry, J., et al., *Nestin expression by newly formed human blood vessels*. Stem Cells Dev, 2004. **13**(6): p. 658-64.
81. El-Helou, V., et al., *The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(5): p. 694-702.
82. Aljinovic, J., et al., *Histological differences in healing following experimental transmural infarction in rats*. Histol Histopathol, 2010. **25**(12): p. 1507-17.
83. Brener, S.J., et al., *Relationship between myocardial reperfusion, infarct size, and mortality: the INFUSE-AMI (Intracoronary Abciximab and Aspiration Thrombectomy in Patients With Large Anterior Myocardial Infarction) trial*. JACC Cardiovasc Interv, 2013. **6**(7): p. 718-24.
84. Skyschally, A., et al., *Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(5): p. 469-83.
85. Dwyer, N.B., et al., *No Cardioprotective Benefit of Ischemic Postconditioning in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction*. J Interv Cardiol, 2013. **26**(5): p. 482-90.
86. Hahn, J.Y., et al., *Ischemic Postconditioning During Primary Percutaneous Coronary Intervention: The Effects of Postconditioning on Myocardial Reperfusion in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (POST) Randomized Trial*. Circulation, 2013. **128**(17): p. 1889-96.
87. Gong, J.S., et al., *Sevoflurane postconditioning attenuates reperfusion-induced ventricular arrhythmias in isolated rat hearts exposed to ischemia/reperfusion injury*. Mol Biol Rep. **39**(6): p. 6417-25.
88. Redel, A., et al., *Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(10): p. 1186-91.
89. Frassdorf, J., S. De Hert, and W. Schlack, *Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury*. Br J Anaesth, 2009. **103**(1): p. 89-98.
90. Obal, D., et al., *One MAC of sevoflurane provides protection against reperfusion injury in the rat heart in vivo*. Br J Anaesth, 2001. **87**(6): p. 905-11.
91. Yao, Y.Y., et al., *Activation of Akt and cardioprotection against reperfusion injury are maximal with only five minutes of sevoflurane postconditioning in isolated rat hearts*. J Zhejiang Univ Sci B, 2013. **14**(6): p. 511-7.
92. Thom, T., et al., *Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2006. **113**(6): p. e85-151.
93. Dhingra, S., et al., *Preserving prostaglandin e2 level prevents rejection of implanted allogeneic mesenchymal stem cells and restores postinfarction ventricular function*. Circulation, 2013. **128**(26 Suppl 1): p. S69-78.
94. Yeh, T.S., et al., *Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction*. Biomaterials, 2013.
95. Chintalgattu, V., D.M. Nair, and L.C. Katwa, *Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(3): p. 277-86.

96. Urbich, C., et al., *Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(5): p. 733-42.
97. Benjamin, L.E., et al., *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.
98. Cao, Y., et al., *Update on therapeutic neovascularization*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 639-48.
99. Ismail, J.A., et al., *Immunohistologic labeling of murine endothelium*. Cardiovasc Pathol, 2003. **12**(2): p. 82-90.
100. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(2): p. 255-78.
101. Turner, N.A. and K.E. Porter, *Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2013. **6**(1): p. 5.
102. Scobioala, S., et al., *Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes*. FASEB J, 2008. **22**(4): p. 1021-31.
103. Tang, J., et al., *Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway*. Exp Cell Res, 2009. **315**(20): p. 3521-31.
104. Markel, T.A., et al., *VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(6): p. H2308-14.
105. El-Helou, V., et al., *Cardiac resident nestin(+) cells participate in reparative vascularisation*. J Cell Physiol, 2013. **228**(9): p. 1844-53.
106. Tamura, Y., et al., *Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 582-9.
107. Beguin, P.C., et al., *Nestin (+) stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart*. J Cell Physiol, 2011. **226**(5): p. 1157-65.
108. Mokry, J., et al., *Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted patients*. Virchows Arch, 2008. **453**(1): p. 33-41.
109. Fukuhara, S., et al., *Endogenous bone-marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in the acute infarction model*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(1): p. 67-72.
110. Landoni, G., et al., *Cardiac protection with volatile anesthetics in stenting procedures*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2008. **22**(4): p. 543-7.
111. Sorensson, P., et al., *Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction*. Heart, 2010. **96**(21): p. 1710-5.
112. Sorensson, P., et al., *Long-term impact of postconditioning on infarct size and left ventricular ejection fraction in patients with ST-elevation myocardial infarction*. BMC Cardiovasc Disord, 2013. **13**: p. 22.
113. Chen, D., et al., *The effect of sevoflurane postconditioning on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rabbits*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(5): p. 6049-57.
114. Tessier-Vetzel, D., et al., *Isoflurane inhaled at the onset of reperfusion potentiates the cardioprotective effect of ischemic postconditioning through a NO-dependent mechanism*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(3): p. 487-92.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivan Agnić

Adresa: Put Radoševca 30, Split

Telefon: 021/ 461-236

e-mail: agnic33@gmail.com

Datum i mjesto rođenja: 02.05.1979.g. Split, Hrvatska

OBRAZOVANJE:

1993.-1997. IV. Gimnazija „Marko Marulić“, prirodoslovno-matematički smjer, u Splitu

1997.-2003. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2004.-2006. Poslijediplomski znanstveni doktorski studij „Klinička medicina“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu

2008.-2012. Specijalizantski staž na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje

2009.-2012. polaznik Naprednog održavanja života-Advanced Life Support (ALS) tečajeva u organizaciji Europskog i Hrvatskog društva za reanimatologiju

2012.- instruktor Naprednog održavanja života (ALS-a)

NASTAVNI RAD:

2004.-2006. Izvođenje nastave iz predmeta Anatomija za studente svih smjerova na Medicinskom fakultetu u Splitu

2013.- Sudjelovanje u nastavi pri Katedri za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje

RADNO ISKUSTVO:

2003.-2004. Pripravnički staž u Kliničkoj bolnici Split

2004.-2006. Asistent na Katedri za anatomiju Medicinskog fakulteta u Splitu

2006.-2007. Liječnik pri Domu zdravlja Splitsko-dalmatinske županije

2007.-2008. Liječnik pri Ustanovi za hitnu medicinsku pomoć Splitsko-dalmatinske županije

2008.-2012. Liječnik specijalizant pri Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBC-a Split

2013.- Liječnik specijalist pri Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBC-a Split

ZNANSTVENI RADOVI U CC ČASOPISIMA:

1. Isoflurane post-conditioning stimulates the proliferative phase of myocardial recovery in an ischemia-reperfusion model of heart injury in rats. **Agnić I**, Vukojević K, Saraga-Babić M, Filipović N, Grković I. *Histol Histopathol.* 2013 Jul 12. [Epub ahead of print]
2. Mortality after surgery in Europe: a 7 day cohort study. Pearse RM, Moreno RP, Bauer P, Pelosi P, Metnitz P, Spies C, Vallet B, Vincent JL, Hoeft A, Rhodes A; European Surgical Outcomes Study (EuSOS) group for the Trials groups of the European Society of Intensive Care Medicine and the European Society of Anaesthesiology. *Lancet.* 2012 Sep 22;380(9847):1059-65. (**član EuSOS grupe**)

POGLAVLJA U KNJIZI:

1. Jukić, Marko; **Agnić, Ivan**; Krobot, Renata.

Klinička anesteziologija, drugo, dopunjeno i izmijenjeno izdanje

Jukić, Marko ; Husedžinović, Ino ; Kvolik, Slavica ; Majerić Kogler, Višnja ; Perić, Mladen ; Žunić, Josip (ur.). Zagreb, Medicinska naklada, 2013.

35. poglavlje, Opća anestezija za kirurške postupke Str. 580-600.