

Izražaj CD44 na velikim monocitima nakon infarkta miokarda kod štakora koji su konzumirali bijelo vino

Šimić, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:152317>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Antonela Šimić

**IZRAŽAJ CD44 NA VELIKIM MONOCITIMA NAKON INFARKTA MIOKARDA
KOD ŠTAKORA KOJI SU KONZUMIRALI BIJELO VINO**

Diplomski rad

Akadska godina 2019./2020.

Mentor: prof. dr. sc. Anita Markotić

Split, 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Antonela Šimić

**IZRAŽAJ CD44 NA VELIKIM MONOCITIMA NAKON INFARKTA MIOKARDA
KOD ŠTAKORA KOJI SU KONZUMIRALI BIJELO VINO**

Diplomski rad

Akadska godina 2019./2020.

Mentor: prof. dr. sc. Anita Markotić

Split, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska kemija i biokemija
Tema rada: je prihvaćena na sjednici vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Anita Markotić
Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Anita Markotić

Izražaj CD44 na velikim monocitima nakon infarkta miokarda kod štakora koji su konzumirali bijelo vino

Antonela Šimić, broj indeksa 156

Sažetak:

Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti postotak subpopulacije velikih monocita i izražaj CD44 na velikim monocitima u perifernoj krvi nakon infarkta miokarda štakora koji su 4 tjedna konzumirali bijelo vino ili vodu. Pokusi su izvedeni na mužjacima štakora soja Sprague Dawley koji su randomizacijom podijeljeni u dvije skupine (ispitnu i kontrolnu) s po 9 životinja. Ispitna skupina pila je 28 dana vodu i vino, a kontrolna skupina samo vodu. Nakon 28 dana, životinjama je izazvan infarkt miokarda, a 24 sata nakon je uzorkovana njihova krv. Krv je analizirana metodom protočne citometrije, a rezultati su uspoređeni s rezultatima kontrolne skupine.

Konzumacija bijeloga vina nije utjecala na postotak subpopulacije velikih monocita no dovela je do četverostrukoga povećanja izražaja CD44 na njima. CD44 potiče protuupalno djelovanje te također sudjeluje u transformacij fibroblasta u miofibroblaste i zbog toga njegov pojačan izražaj otkriva mogući povoljan utjecaj vina na mehanizme cijeljenja srčanoga tkiva.

Diplomski rad je izrađen u sklopu HRZZ 8652 projekta, „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“ voditelja prof. dr. sc. Mladena Bobana.

Diplomski rad sadrži rezultate znanstvenih istraživanja provedenih u Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju i u Laboratoriju za biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Ključne riječi: infarkt miokarda, CD44, veliki monociti, bijelo vino

Rad sadrži: 53 stranice, 8 slika, 1 tablicu, 94 reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, izv. prof., predsjednik
2. dr. sc. Tatjana Zemunik, prof., član
3. dr. sc. Anita Markotić, prof., član-mentor

Datum obrane: 15. listopada 2020.

Rad je u tiskanom i u elektroničkom obliku (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Medical School and Faculty of Chemistry and Technology
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Republic of Croatia

Scientific area: Biomedical Sciences
Scientific field: Pharmacy
Teaching subject: Medical Chemistry and Biochemistry
Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, Faculty Council of School of Medicine
Faculty of Medicine Mentor: prof. dr. sc. Anita Markotić
Technical assistance: prof. dr. sc. Anita Markotić

Expression of CD44 at large monocytes following myocardial infarction in rats drinking white wine
Antonela Šimić, index number 156

Summary:

The aim of this study was to determine the percentage of large monocyte subpopulation and CD44 expression on large monocytes in peripheral blood after myocardial infarction in rats that consumed white wine or water for 4 weeks. The experiments were performed on male Sprague Dawley rats that were randomly divided into two groups of 9 animals each. One group, the test group, drank water and wine for 28 days, and the other group, the control group, drank only water. After 28 days, we induced a myocardial infarction in animals and 24 hours later their blood was sampled. Blood was analyzed by flow cytometry, and the results were compared with the results of the control group.

Consumption of white wine did not affect the percentage of subpopulation of large monocytes but led to a fourfold increase in CD44 expression on them. CD44 stimulates anti-inflammatory activity and also participates in the transformation of fibroblasts into myofibroblasts and therefore its enhanced expression reveals the possible beneficial effect of wine on the healing mechanisms of cardiac tissue.

Thesis was prepared as part of the Croatian Science Foundation 8652 project, "Biological effects of wine: the impact of vinification technology, deal alcoholization and aging of wine" led by prof. dr. sc. Mladen Boban.

The diploma thesis contains the results of scientific research conducted in the Department of Basic and Clinical Pharmacology and in the Laboratory of Biochemistry of the Medical Faculty of the University of Split.

Key words: myocardial infarction, CD44, large monocytes, white wine

Thesis contains: 53 pages, 8 figures, 1 table, 94 references

Original in: Croatian

Defence Committee:

1. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, izv. prof., chair person
2. dr. sc. Tatjana Zemunik, prof., member
3. dr. sc. Anita Markotić, prof., member-supervisor

Defence date: October 15th, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of School of Medicine Split, Šoltanska 2.

Diplomski rad je izrađen u sklopu HRZZ 8652 projekta, „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“ voditelja prof. dr. sc. Mladena Bobana.

Diplomski rad sadrži rezultate znanstvenih istraživanja provedenih u Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju i u Laboratoriju za biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Infarkt miokarda.....	2
1.1.1	Epidemiologija.....	2
1.1.2	Simptomi.....	3
1.1.2.1	Bol.....	3
1.1.2.2	Povezani simptomi.....	4
1.1.3	Faktori rizika.....	4
1.1.3.1	Prehrana.....	6
1.1.4	Patogeneza infarkta miokarda.....	7
1.1.4.1	Ateroskleroza.....	7
1.1.4.2	Ostali uzročnici infarkta miokarda.....	8
1.1.5	Izgled miokarda nakon infarkta.....	9
1.1.5.1	Makroskopski izgled miokarda nakon infarkta.....	9
1.1.5.2	Mikroskopski izgled miokarda nakon infarkta.....	10
1.1.6	Prevenција infarkta miokarda.....	10
1.1.7	Urođeni imunološki odgovor kod infarkta miokarda.....	11
1.1.7.1	Upala.....	12
1.1.8	Vino i infarkt miokarda.....	16
1.2	Biljeg CD44.....	18
1.2.1	Građa i distribucija u tkivima.....	18
1.2.2	Izoforme.....	19
1.2.3.	Interakcija CD44 receptora s ligandima.....	19
1.2.4	Funkcija.....	19
2	CILJEVI I HIPOTEZE.....	20
2.1	Ciljevi istraživanja.....	21
2.2	Hipoteze.....	21

3	MATERIJALI I METODE.....	22
3.1	Pokusne životinje.....	23
3.2	Ustroj istraživanja.....	24
3.3	Protočna citometrija	25
3.4	Obrada podataka	26
3.5	Statistička obrada.....	28
4	REZULTATI.....	29
4.1	Postotak CD44+ velikih monocita	30
4.2	Izražaj CD44+ na velikim monocitima	30
5	RASPRAVA	32
6	ZAKLJUČCI.....	36
7	POPIS CITIRANE LITERATURE	38
8	SAŽETAK	47
9	SUMMARY.....	49
10	ŽIVOTOPIS	51

Zahvala

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Aniti Markotić na uloženom trudu, savjetima i razumijevanju prilikom izrade ovog rada.

Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene tijekom studiranja i učinili ovaj studentski život zabavnijim.

Najveća hvala mojoj mami Maši, sestri Ivi i noni Mariji koje su uvijek vjerovale u mene i moj uspjeh, čak i kad ni sama nisam. Hvala vam na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju.

Ovaj diplomski rad posvećujem tati Saši. Znam da bi bio ponosan.

POPIS OZNAKA I KRATICA

C – kontrolna skupina (engl. *control*)

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

DAMP – molekularni obrasci oštećenja (engl. *damage-associated molecular patterns*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EKG – elektrokardiogram

FITC – fluoresceinski izotiocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*)

FSC – prednje raspršenje (engl. *forward scatter*)

HA – hijaluronska kiselina (engl. *hyaluronic acid*)

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

HMBG1 protein – protein visoke pokretljivosti skupine 1 (engl. *high mobility group box 1 protein*)

hs-CRP – visoko osjetljiv C-reaktivni protein (engl. *high-sensitivity C-reactive protein*)

ICD – unutarstenična domena (engl. *intracellular domain*)

IL-1 – interleukin 1 (engl. *interleukin 1*)

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

IQR – interkvartilni raspon (od engl. *Interquartile Range*)

MI – infarkt miokarda (engl. *myocardial infarction*)

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

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

RAGE – receptor za glikacijske produkte (engl. *receptor for advanced glycation end products*)

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

SSC – postranično raspršenje (engl. *side scatter*)

TLR – receptor sličan Tollu (engl. *Toll-like receptor*)

TNF – faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

VLDL – lipoprotein vrlo male gustoće(engl. *very-low-density lipoprotein*)

W – ispitna skupina (engl. *wine*)

1 UVOD

1.1 Infarkt miokarda

Infarkt miokarda (MI, od engl. *myocardial infarction*) ili srčani udar javlja se kao posljedica potpunoga prekida dotoka krvi koronarnim arterijama i posljedične ishemije koja je dovoljno intenzivna i traje dovoljno dugo da bi došlo do odumiranja stanica miokarda (nekroze) (1). Infarkt miokarda, odnosno srčano zatajenje potiče remodeliranje odnosno pregradnju miokarda. Izraz pregradnja miokarda prvi su upotrijebili Hockman i Buckey, 1982. godine, u modelu infarkta miokarda te je cilj ovoga pojma bio okarakterizirati zamjenu infarktoga tkiva ožiljnim tkivom. Konsenzus međunarodnoga foruma o srčanoj pregradnji objavljen je 2000. godine definirajući ju kao skupinu molekularnih, staničnih i intersticijskih promjena koje se klinički manifestiraju kao promjena u veličini, obliku i funkciji srca uslijed ozljeda miokarda. Postoje dvije vrste srčane pregradnje – fiziološka (adaptivna pregradnja) i patološka pregradnja. Klinička dijagnoza pregradnje temelji se na otkrivanju morfoloških promjena – promjena u promjeru šupljine, mase i geometrije (debljina i oblik zida) područja ožiljka nakon infarkta miokarda. Najčešće korištene metode za otkrivanje ovih promjena su ehokardiografija, ventrikulografija te nuklearna magnetska rezonancija. Kao dijagnostička metoda može se koristiti i detekcija staničnih markera, koja se temelji na činjenici da srčana pregradnja uključuje reekspresiju fetalnih gena. Glavna posljedica pregradnje miokarda je srčana disfunkcija (2).

1.1.1 Epidemiologija

Bolesti srca i krvnih žila vodeći su uzrok smrti u svijetu. Incidencija infarkta miokarda je 5/1000 godišnje u razvijenim zemljama. To je bolest starije životne dobi te muškarci oboljevaju 4 do 5 puta češće nego žene u dobi do 60 godina, dok kasnije ta razlika prema spolovima postaje manja (1). U Europi, čime obuhvaćamo i Republiku Hrvatsku, 45 % ljudi umire zbog kardiovaskularnih bolesti, pri čemu najveći udio nosi ishemijska bolest srca. Kardiovaskularne bolesti češće se javljaju kod osoba koje u obiteljskoj anamnezi imaju srčane bolesti ili aterosklerozu, dijabetes, hipertenziju, pretilu su, puše, premalo se kreću te vode stresan život. Također, ove bolesti je isto tako uvelike moguće prevenirati ili odgoditi samom promjenom načina života (3).

1.1.2 Simptomi

Klasični simptomi srčanoga udara su pritisak, stezanje i bol u prsima te nedostatak daha, no simptomi se mogu razlikovati od osobe do osobe. Ostali najčešći simptomi su bol koja se širi u leđa, čeljust i druga područja gornjega dijela tijela, hladan znoj, mučnina, povraćanje, probavne smetnje, žgaravica, anksioznost, kašalj, iznenadna vrtoglavica i umor (4).

Simptomi srčanoga udara, kao i njihova težina, variraju od osobe do osobe. Kod nekih se javlja blaga bol, kod nekih umjerena, dok neki uopće nemaju simptoma. Kod nekih se osoba kao prvi znak pojavi iznenadni srčani udar, no uglavnom je pravilo da što osoba ima više simptoma, veća je vjerojatnost da će doći do infarkta miokarda. Iako kod nekih ljudi do infarkta dolazi iznenada, kod većine se znakovi upozorenja i simptomi pojave satima, danima pa čak i tjednima unaprijed. Najranije upozorenje je uglavnom ponavljajuća bol u prsima ili pritisak (angina) koja se javlja kod povećane aktivnosti, a smanjuje se mirovanjem. Angina je uzrokovana privremenim smanjenjem dotoka krvi u srce (5).

1.1.2.1 Bol

Bol je definirana kao neugodno osjetilno ili osjećano subjektivno iskustvo povezano sa stvarnim ili potencijalnim ozljedama te predstavlja jedan od glavnih uzroka ljudske patnje. Razlikujemo akutnu i kroničnu bol. Akutna bol uglavnom nastaje naglo i uzrokovana je nečim specifičnim te obično ne traje duže od nekoliko mjeseci. S druge strane kronična je bol perzistentna te traje više mjeseci ili čak godina.

Akutna bol u prsima je simptom uzrokovan potencijalno fatalnim bolestima te širokom diferencijalnom dijagnozom. Aterosklerotska bolest koronarnih arterija najčešći je uzrok akutne boli u prsima koja je posljedica ishemije miokarda. Dakle, akutna bol u prsima je važan simptom potencijalnoga infarkta miokarda (6). Bol u prsima često se opisuje kao osjećaj stiskanja, pritiska ili stezanja. Bol se najčešće širi u lijevu ruku, ali može i u gornji dio trbuha, leđa, vrat, donju čeljust ili desnu ruku. Bol kod infarkta miokarda ne popušta mirovanjem i primjenom nitroglicerina (1).

1.1.2.2 Povezani simptomi

Bol u prsima često je praćena znojenjem, mučninom, povraćanjem, vrtoglavicom, gubitkom daha te anksioznošću. Osobe sa infarktom miokarda često djeluju uzbuđeno ili preplašeno, imaju tahikardiju te dišu ubrzano. Također dolazi do pada krvnoga tlaka. Usljed velikoga infarkta miokarda može doći do akutnoga plućnoga edema pri čemu te osobe ne mogu doći do daha i guše se (1).

Važno je naglasiti da neće sve osobe imati sve simptome te da će se težina simptoma razlikovati od osobe do osobe. Također, veća je vjerojatnost da će žene osjetiti mučninu, povraćanje, bol u donjoj čeljusti i leđima te kratkoću daha (4).

1.1.3 Faktori rizika

Faktore rizika za infarkt miokarda dijelimo na konstitucijske i okolišne. Na konstitucijske čimbenike ne možemo utjecati te oni uključuju dob, spol te genetsko nasljeđe. Okolišni čimbenici su oni promjenjivi te se na njih može utjecati promjenom načina života pojedinca.

Žene svoj prvi infarkt miokarda u prosjeku doživljavaju 6 do 10 godina kasnije nego muškarci. Pretpostavlja se da je razlog tomu prirodni zaštitni učinak estrogena koji se u menopauzi smanjuje. Ženski su spolni hormoni povezani s manje aterogenim lipidnim profilom i zdravijom raspodjelom masti. Navedene razlike između žena i muškaraca smanjuju se početkom menopauze i smanjenjem razine estrogena kod žena (7). Ovo se također objašnjava i činjenicom da muškarci u mlađoj životnoj dobi imaju više rizičnih čimbenika, što uključuje povišene razine lipida i pušenje (8).

Kao jedan od rizičnih čimbenika ne smije se izostaviti pozitivna obiteljska anamneza i nasljeđe. Jedna trećina osoba koje su doživjele akutni infarkt miokarda imaju u obiteljskoj anamnezi zabilježenu neku koronarnu ili aterosklerotsku bolest. Nije poznato koliko je pozitivna obiteljska anamneza neovisan čimbenik, a koliko ovisi o običajima i navikama u obitelji (npr. pušenje, smanjena tjelesna aktivnost), ali tradicionalno se smatra da je obiteljska anamneza posljedica genetskoga nasljeđa (9).

Čimbenici na koje možemo utjecati dijele se na one vezane uz životne navike, primjerice prehrana, pušenje, tjelovježba, konzumacija alkohola, stres te kliničke faktore rizika poput hipertenzije, šećerne bolesti, hiperlipidemije i debljine (10).

Pokazalo se da su pušenje, poremećaj lipida te hipertenzija značajniji faktori rizika kod mlađih nego kod starijih ispitanika. Duhan, odnosno pušenje, drugi je najveći uzrok smrtnosti u svijetu, a trenutno je odgovoran za smrt svake desete osobe (11, 12). Pušenje je čimbenik na koji možemo utjecati. Dokazano je da ubrzava razvoj ateroskleroze uzrokujući oštećenje endotela krvnih žila te smanjujući oksigenaciju tkiva. Uz to pušenje dovodi do povećane agregacijske aktivnosti trombocita i potiče stvaranje intravaskularnih ugrušaka (13). Rizik za razvoj akutnoga infarkta miokarda usko je i linearno povezan s brojem dnevno popušanih cigareta, pri čemu je čak i mali broj dnevno popušanih cigareta (primjerice 5 cigareta dnevno) povezan sa značajnim rizikom za razvoj infarkta. Bivši pušači također imaju povećan rizik za razvoj infarkta, ali taj se rizik smanjuje s vremenom nakon prestanka pušenja. Kod osoba koje nisu bile „teški“ pušači rizik se smanjuje kroz 3 do 5 godina, no kod „teških“ pušača i nakon 20 godina od prestanka pušenja još uvijek postoji povećan rizik za razvoj infarkta miokarda. Rizik je povećan kod svih oblika pušenja, čime se obuhvaća i pasivno pušenje. Istraživanje duhanske industrije pokazalo je kako su proizvodi izgaranja cigareta koje tinjaju na niskim temperaturama mnogo toksičniji nego kada se kroz njih provlači zrak, što može objasniti rizike povezane s izlaganjem pasivnom pušenju (14).

Dislipidemija, nezdrava odnosno nenormalna količina lipida u krvi, također je jedan od faktora rizika koje je moguće prevenirati. Tri glavne vrste lipida u krvi su LDL (engl. *low-density lipoprotein*, lipoprotein niske gustoće), HDL (engl. *high-density lipoprotein*, lipoprotein visoke gustoće) i trigliceridi. Dislipidemija obično znači da su razine LDL kolesterola i/ili triglicerida povišene ili da je razina HDL kolesterola snižena (15). Studije su pokazale da smanjenjem ukupnoga kolesterola i LDL kolesterola za 1 % dolazi do smanjenja rizika za koronarnu bolest srca za 2 %. Također smanjenje HDL kolesterola za 1 % može dovesti do povećanja rizika za koronarnu bolest za 2 % (13). Obiteljska hiperkolesterolemija genetski je uzrok preuranjenoga infarkta miokarda zbog cjeloživotnoga povišenoga LDL kolesterola u krvi (16). Pokazano je da je prevalencija obiteljske hiperkolesterolemije sa zajedničkim patogenim genskim mutacijama kod preuranjenoga infarkta miokarda oko 1,3 % do 7 % (17, 18).

Hipertenzija i dijabetes faktori su rizika koji su manje učestali kod mlađih nego kod starijih pacijenata (13). Prema INTERHEART i INTERSTROKE studijama, koje su procijenile doprinos određenih faktora rizika kako u razvijenim, tako i u manje razvijenim zemljama, hipertenzija se navodi kao čimbenik koji najviše doprinosi ukupnoj smrtnosti i treći najveći uzrok izgubljenih godina zdravoga života (19, 20, 21). I sistolička i dijastolička hipertenzija pridonose povećanom riziku za infarkt miokarda, što je veći krvni tlak to je veći rizik (22, 23). Povišeni krvni tlak dovodi do povećanog mehaničkog naprežanja krvnih žila te može dovesti do ubrzanog nastanka ateroskleroze (24).

Stres i manjak tjelesne aktivnosti manje su učestali uzroci infarkta miokarda (13).

Osobe koje su već preživjele infarkt miokarda, u usporedbi s općom populacijom, posebice starije osobe te osobe sa hipertenzijom i dijabetesom, imaju veći rizik za razvoj novoga infarkta (25).

1.1.3.1 Prehrana

Osobe koje imaju povećan rizik za razvoj infarkta miokarda potrebno je savjetovati kako pravilnom prehranom mogu smanjiti taj rizik. Pod pravilnom prehranom najčešće se podrazumijeva mediteranski način prehrane. On se temelji na uzorcima hrane tipičnim za Kretu, veći dio Grčke i južnu Italiju u ranim šezdesetima, gdje je očekivani životni vijek bio jedan od najviših na svijetu, a stopa koronarne bolesti bila je među najnižim (26). Mediteranski način prehrane karakterizira konzumacija maslinovoga ulja, većih količina voća i povrća, pogotovo mahunarki koje su bogate vlaknima, cjelovitih žitarica, ribe i morskih plodova, orašastih plodova i polinezasićenih masti. Također je potrebo smanjiti unos crvenoga mesa na jednom do dva puta tjedno te unos slatkoga. Uz sve to, preporuča se umjerena konzumacija vina uz obrok (27).

Studije pokazuju da umjerena konzumacija alkohola pridonosi smanjenju rizika za razvoj infarkta miokarda, dok se pretjerana konzumacija alkohola povezuje s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Redovita umjerena konzumacija alkohola (1 – 2 pića dnevno) povezana je s povećanjem HDL kolesterola te poboljšanjem endotelne funkcije, inzulinske osjetljivosti, optimiranjem koagulacijske i fibrinolitičke kaskade te time smanjenim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (28).

1.1.4 Patogeneza infarkta miokarda

Razmatrajući patogenezu, razlikujemo dvije vrste infarkta miokarda: transmuralni i subendokardijalni, multifokalni infarkt miokarda.

Transmuralni infarkt miokarda zahvaća cijelu stijenku klijetke. Najčešće nastaje nakon začepljenja jedne od glavnih koronarnih arterija te je ograničen na područje koje ta arterija opskrbljuje krvlju.

Subendokardijalni, multifokalni infarkt miokarda često nastaje kod šoka, krvarenja ili traume. Dakle u ovom slučaju razlog infarkta nije ateroskleroza krvne žile već hipotenzivna epizoda (1).

1.1.4.1 Ateroskleroza

Za nastanak ateroskleroze odgovorni su brojni čimbenici, ali smatra se da je hiperkolesterolemija najvažniji rizični čimbenik. Ostali rizični čimbenici su hipertenzija, šećerna bolest, smanjena razina HDL kolesterola, pretilost, pušenje, smanjena tjelesna aktivnost, stres i drugi. Vrlo je vjerojatno da će se kod određene osobe brže razviti ateroskleroza ukoliko je osoba istovremeno pod utjecajem nekoliko rizičnih čimbenika.

Hiperkolesterolemija i hipertenzija potiču stvaranje kisikovih slobodnih radikala u endotelnim stanicama krvnih žila. Slobodni radikali unose se u organizam i pušenjem jer se nalaze u dimu cigarete. Oni imaju središnju ulogu u aktivaciji i oštećenju endotelnih stanica.

Hiperkolesterolemija je najvažniji rizični čimbenik jer LDL kolesterol prodire kroz neoštećeni endotel te se pod djelovanjem lipoperoksidaze i slobodnih radikala kisika oksidira. Oksidirani LDL imaju drugačija svojstva od LDL-a. Njima nisu potrebni LDL-receptori za ulazak u stanice već im je to omogućeno pomoću receptora-čistača na makrofagima. Također, potiču endotelne stanice da luče citokine i kemokine koji privlače monocite u subendotelni prostor čime se oni pretvaraju u makrofage. Makrofagi nemaju sposobnost regulacije ulaska oksidiranog LDL-a, kojom se inače regulira unos neoksidiranih čestica LDL u sprezi s izražajem njihovih receptora na plazma membranama. Zbog toga, oksidirani LDL ulazi u makrofage u nereguliranim, neograničenim količinama. Time makrofagi bivaju prepunjeni kolesterolom i transformiraju se u pjenaste stanice. Uz makrofage, u subendotelni prostor su

privučeni i limfociti T koji lučenjem citokina potiču stanice endotela da luče adhezijske molekule. To omogućava prijanjanje većega broja monocita za stijenke krvnih žila.

Ateroskleroza se češće stvara na mjestima gdje je endotel mehanički oštećen što može biti jedna od posljedica hipertenzije. Oštećenje endotela potiče agregaciju trombocita te stvaranja mikrotromba. Pušenje također pridonosi sljepljivanju trombocita. Trombocitni faktor rasta i angiotenzin II (koji je povećan u hipertenziji) potiču premještanje glatkih mišićnih stanica te njihovo umnažanje na mjestu oštećenja. Trombocitni faktor rasta potiče i stvaranje receptora-čistača na makrofagima te ponovo nastaju pjenaste stanice. Nakon odumiranja pjenastih stanica, njihov sadržaj kolesterola i ostalih lipida zaostaje u subendotelnom području u obliku masnih traka koje predstavljaju početni stupanj ateroskleroze. Masne trake kasnije mogu nestati ako se obnovi oštećeni endotel. No ako se LDL u krvi konstantno povećava, cijeli se ovaj proces ponavlja i napreduje te na kraju dolazi do stvaranja aterosklerotičnih nakupina ili ateroma. Aterosklerotične nakupine sužavaju promjer krvne žile, smanjuju elastičnost stijenka te posljedično povećavaju krvni tlak. Time se povećava mogućnost pucanja te stijenke krvne žile s posljedičnim krvarenjem u tkivo. Također je moguće da tromb začepi krvnu žilu te dođe do infarkta, primjerice miokarda. Za ovakav ishod ateroskleroze vrlo je bitan sastav tromba, a manje njegova veličina. Manji trombi često imaju tanku vezivnu „kapu“ koja nije dovoljno otporna na mehanički pritisak pa lakše pukne (29).

1.1.4.2 Ostali uzročnici infarkta miokarda

Iako je više od 80 % akutnih infarkta miokarda rezultat ateroskleroze, postoje i neaterosklerotski čimbenici koji uzrokuju infarkt miokarda:

- koronarna okluzija kao posljedica vaskulitisa
- ventrikularna hipertrofija
- embolija koronarnih arterija kao posljedica kolesterola, zraka ili produkata sepe
- primarni koronarni vazospazam
- upotreba droga (poput kokaina, amfetamina, efedrina)
- arteritis
- koronarne anomalije (uključujući aneurizme koronarnih arterija)

- čimbenici koji povećavaju potrebu za kisikom poput vrućice, velikoga napora ili hipertireoze
- čimbenici koji smanjuju isporuku kisika poput teške anemije
- disekcija aorte uz retrogradno zahvaćanje koronarnih arterija
- respiratorne infekcije, osobito gripa.

Također, infarkt miokarda može biti posljedica hipoksije uslijed trovanja ugljičnim monoksidom ili akutnih plućnih poremećaja. Iako vrlo rijetko, dječja koronarna bolest može se primijetiti i s Marfanovim sindromom, Kawasakijskom bolesti, Takayasu arteritisom, progerijom ili Hutchinson-Gilfordovim sindromom te cističnom medijalnom nekrozom. Iako je infarkt miokarda rijedak u djetinjstvu i adolescenciji, djeca sa akutnim infarktom miokarda obično imaju ili akutno upalno stanje koronarnih arterija ili anomaliju lijeve koronarne arterije, dok je kod odraslih češći razlog koronarne bolesti arterija cijeloživotno taloženje ateroma što posljedično izaziva spazam i trombozu koronarnih arterija. Ponekad može doći i do intrauterinoga infarkta miokarda koji je povezan sa stenozom koronarne arterije (30).

1.1.5 Izgled miokarda nakon infarkta

1.1.5.1 Makroskopski izgled miokarda nakon infarkta

Tek nakon što prođe 24 sata od nastanka infarkta miokarda moguće je vidjeti određene makroskopske promjene na srcu. Nakon 24 sata područje infarkta blijede je od okolnoga područja. Tri do pet dana nakon infarkta, područje infarkta poprima žućkastu boju ili može biti pjegasto, a rubovi su tamnocrveni. Na kraju prvoga tjedna je sivožute boje te je područje infarkta mekše od okolnoga tkiva. U drugom tjednu izgleda pjegasto te sadrži crvene i sive zone. Crvene zone predstavljaju područje prokrvljenosti, a sive zone označavaju područja fibroze. Nakon trećega tjedna područje infarkta je crvenosivo, a nakon šest tjedana postaje sivo i nalikuje ožiljku (1).

1.1.5.2 Mikroskopski izgled miokarda nakon infarkta

Mikroskopske promjene odgovaraju makroskopskim promjenama koje se javljaju tijekom cijeljenja. Tijekom prvoga dana promjene su vrlo malene te je teško dijagnosticirati infarkt na ovaj način. Javljaju se početni znakovi oštećenja miokarda, poprečne pruge se vrlo slabo vide i javlja se hiperkontraktilnost. Nakon 24 sata, započinje nekroza miocita te dolazi do nakupljanja leukocita na mjestu oštećenja. Miociti imaju zrnastu ili svijetlu citoplazmu i neoštre obrise, a jezgre im se raspadaju. Nakon trećega dana, miociti se raspadaju, a neki leukociti umiru. Pred kraj prvoga tjedna, područje zahvaćeno infarktom pretvori se u granulacijsko tkivo jer u njega urastaju fibroblasti i angioblasti. Kroz drugi tjedan, granulacijsko tkivo nadomješta oštećeni dio miokarda. Od drugoga do četvrtoga tjedna, u granulacijskom je tkivu sve više kolagena, a nakon četvrtoga tjedna krvne žile i makrofagi se povlače. Na kraju šestoga tjedna dolazi do stvaranja ožiljka (1).

1.1.6 Prevencija infarkta miokarda

Prevencija infarkta miokarda može biti primarna i sekundarna. Primarna prevencija odnosi se na korake koje svaki pojedinac poduzima kako bi spriječio nastanak bolesti, što uključuje održavanje zdravoga načina života, poput prehrane i tjelovježbe. Sekundarna prevencija fokusirana je na smanjenje utjecaja bolesti ranom dijagnozom prije bilo kakvoga trajnoga oštećenja.

Za prevenciju infarkta miokarda najbolje je usredotočiti se na faktore rizika te ih pokušati smanjiti. Mnoga istraživanja pokazuju pozitivan odnos između serumske razine kolesterola i rizika za razvoj koronarne bolesti. Prehrana, okolišni i genetski faktori igraju važne uloge u određivanju razine kolesterola. Mnoge randomizirane studije pokazuju da smanjenje kolesterola u krvi, posebice LDL kolesterola, smanjuje rizik razvoja koronarne bolesti. HDL kolesterol je na suprotan način povezan s razvojem koronarne bolesti srca, odnosno povećana koncentracija HDL kolesterola smanjuje rizik za razvoj koronarne bolesti (31). HDL čestica djeluje kao čistač viška kolesterola iz makrofaga i fibroblasta krvnih žila, preuzimajući aktivnim transportom kolesterol iz tih stanica te ga vraća u jetru. Potom kolesterol izlazi iz jetre u obliku VLDL (engl. *very-low-density lipoprotein*, lipoprotein vrlo male gustoće) čestica i ponovno se raspodjeljuje po svim tkivima.

Prema tome, potrebno je regulirati prehranu na način da se smanji unos masti u organizam, najviše 25 % unesenih dnevnih kalorija smiju biti masti. Također je potrebno smanjiti unos zasićenih masnih kiselina na manje od 7 % svih unesenih kalorija te povećati unos polinezasićenih masnih kiselina (32). Ukoliko osoba ne uspije smanjiti razinu kolesterola u krvi regulacijom prehrane, potrebna je terapija prvenstveno statinima, inhibitorima ključnoga enzima u sintezi kolesterola, hidrosimetilglutaril-CoA reduktaze (31).

Hipertenzija je također jedan od faktora rizika za infarkt miokarda. Uz redovito uzimanje lijekova za snižavanje krvnoga tlaka te redovitu kontrolu krvnoga tlaka i vođenje dnevnika, osobama se također treba savjetovati smanjenje unosa soli, preporuka je unositi manje od 6 g soli dnevno.

Jedan od faktora rizika je i debljina, posebice centralna pretilost odnosno nakupljanje masnoga tkiva pretežito na području trbuha. Preporuča se uvesti određenu tjelesnu aktivnost u dnevnu rutinu, pri čemu je aerobna tjelovježba u trajanju od najmanje 30 minuta dnevno pokazala najveću korist (32).

Pušenje, kao još jedan faktor rizika, udvostručuje šansu za razvoj koronarne bolesti te znatno povećava smrtnost od koronarne bolesti. Također, pušenje djeluje sinergistički s drugim faktorima rizika. Dakle, osobama koje puše, nužno je savjetovati prestanak pušenja kao jedan od načina smanjenja rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

Osobe pod rizikom za razvoj koronarne bolesti srca trebaju smanjiti unos alkohola na manje od 30 ml čistoga alkohola dnevno. Umjerena konzumacija manjih količina alkohola pridonosi smanjenju rizika, dok učestala konzumacija većih količina alkohola povećava rizik za razvoj infarkta miokarda (31).

1.1.7 Urođeni imunološki odgovor kod infarkta miokarda

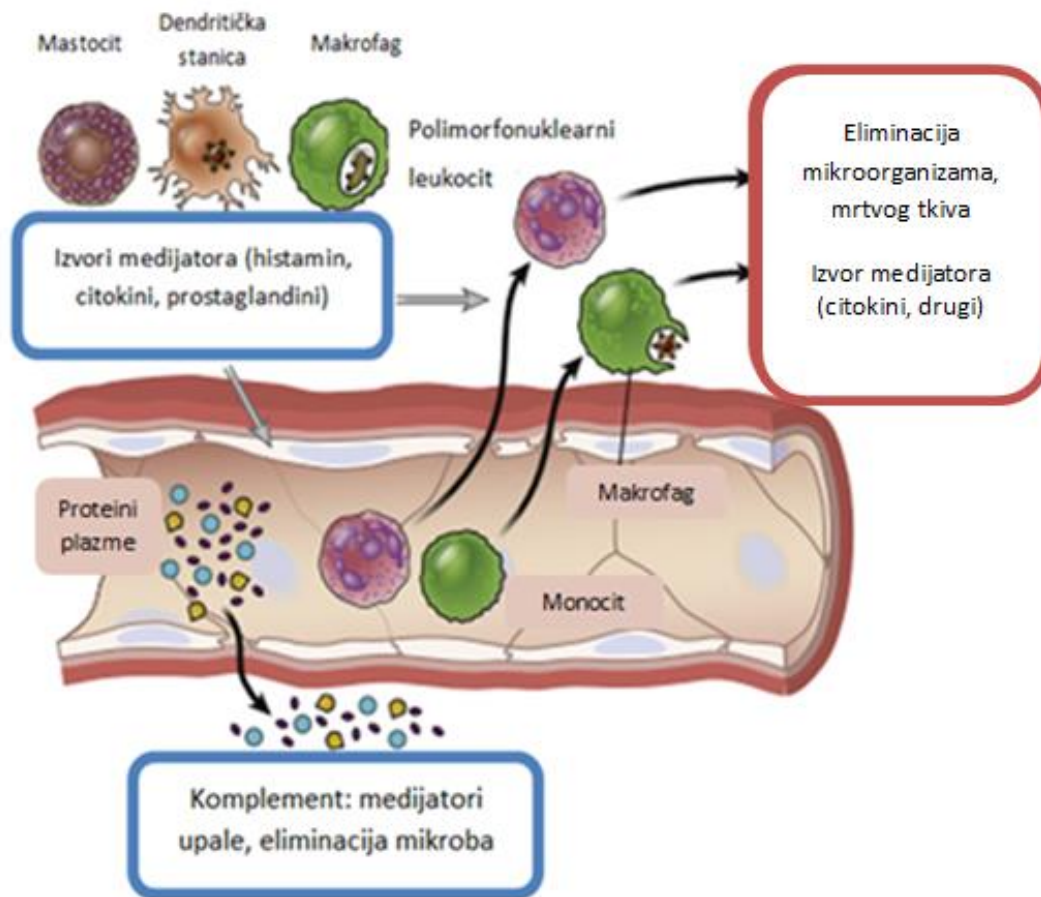
Nakon akutnoga infarkta miokarda, lokalni upalni odgovor tkiva određuje naknadno zarastanje. Tijekom 1980-ih raspravljalo se o ulozi upale u nastanku akutnoga infarkta miokarda pri čemu je nakupljanje leukocita i granulocita prepoznato kao pokretač upale (33, 34, 35). U 1990-ima eksperimentalna su istraživanja dovela u pitanje ulogu leukocita kao posrednika smrti kardiomiocita, sugerirajući da oni mogu igrati samo manju ulogu u

reperfuziji ozljede (36, 37, 38). Međutim, sve je više eksperimentalnih dokaza da je u upalni odgovor uključeno više različitih stanica.

Pojava ishemije nakon akutnoga infarkta miokarda, dovodi do početnoga proupalnoga odgovora čija je svrha uklanjanje nekrotičnih staničnih krhotina iz područja infarkta miokarda (39, 40). Nakon početnoga proupalnoga odgovora slijedi protuupalna, reparacijska faza koja omogućava zarastanje rana i stvaranje ožiljka kako bi se spriječilo pucanje miokarda. Prijelaz između ove dvije faze reguliran je raznim komponentama unutar samoga miokarda poput kardiomiocita, endotelnih stanica i fibroblasta te komponentama imunološkoga odgovora poput neutrofila, monocita, makrofaga, dendritičkih stanica i limfocita.

1.1.7.1 Upala

Upala predstavlja reakciju tkiva kojom se posrednici obrane organizma dovode na mjesto oštećenja (41). Ovaj proces predstavlja prirodni proces zacjeljivanja (29). Prilikom nastanka upale, oslobađa se histamin, tvar P te drugi posrednici iz mastocita i makrofaga (Slika 1.) koji povećavaju lokalni protok krvi. Izljev plazmatskih proteina rezultira otokom, crvenilom i boli. To je popraćeno lokalnim nakupljanjem fagocita kao odgovorom na citokine. Mikroorganizmi ulaze u subendotelni sloj, oslobađaju citokine, uglavnom TNF i IL-1, oštećujući tkivo. Citokini aktiviraju endotel i pokreću kaskadne upalne reakcije (41).

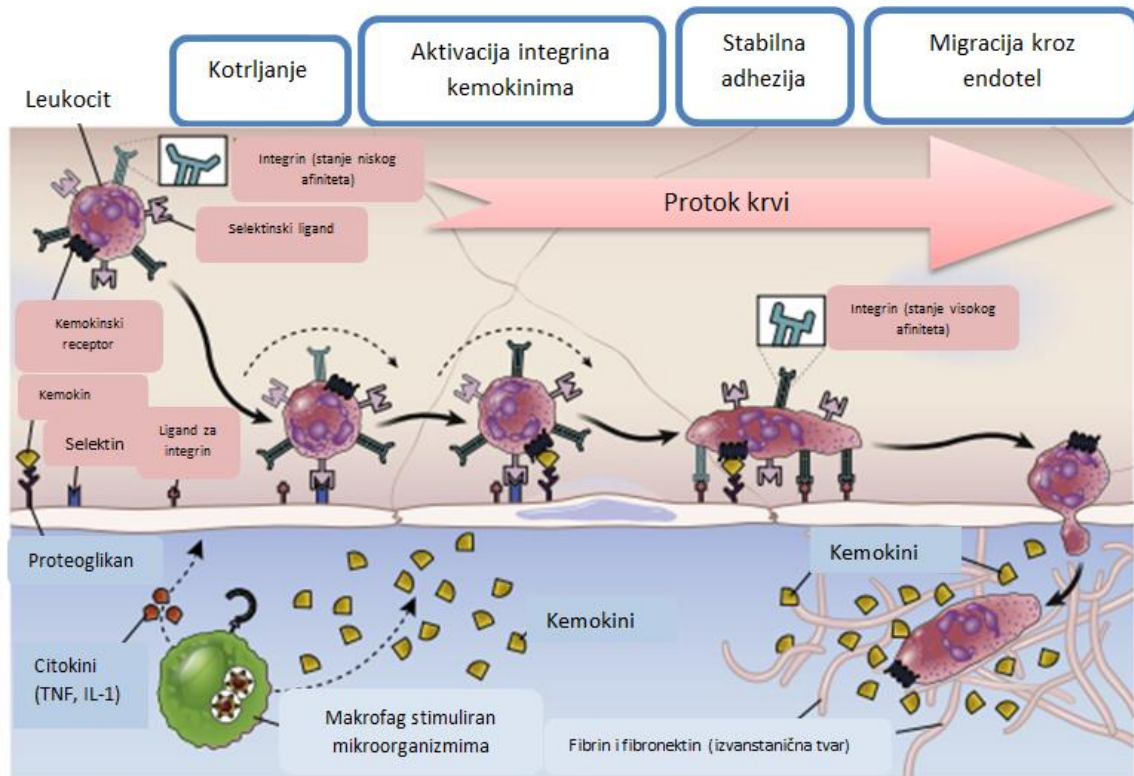


Slika 1. Akutni upalni odgovor. Preuzeto i prevedeno od Abbas i sur. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. (41)

IL-1 i TNF potiču izražaj endotelno E-selektina. E-selektin je adhezijska molekula iz obitelji selektina. Na poticaj nekih drugih molekula, izražava se P-selektin na površini endotela. U uvjetima povećanoga izražaja selektina, monociti i neutrofil, koji inače cirkuliraju slobodno u krvi, vežu se za selektine i pričvršćuju za endotel. S obzirom na to da ta veza nije jaka, tok krvi prekine tu vezu te se ona ponovo uspostavi malo dalje u smjeru kretanja krvi. Ovaj se proces ponavlja i naziva se kotrljanje leukocita.

Osim selektina, na mjestu infekcije, odnosno oštećenja dolazi do otpuštanja kemokina od strane makrofaga i endotelnih stanica (41). Kemokini su velika obitelj kemotaktičnih citokina koji se izlučuju kao odgovor na protuupalne citokine te igraju važnu ulogu u privlačenju monocita, neutrofila i limfocita na mjesto upale (42). Oni se izražavaju u visokoj

koncentraciji na površini endotela te stimuliraju porast afiniteta integrina, druge vrste adhezijskih molekula na leukocitima, za njihove ligande na endotelu (Slika 2.).



Slika 2. Slijed događaja pri migraciji leukocita iz krvi na mjesto infekcije. Preuzeto i prevedeno od Abbas i sur. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system (41).

Kada se integrini čvrsto vežu za svoje ligande na endotelu, prestaje kotrljanje, a stanice leukocita reorganiziraju se i prošire po površini endotela .

Sljedeći korak je stimulacija kretanja leukocita od strane kemokina. Leukociti počnu migrirati između entodelnih stanica do mjesta oštećenja, odnosno infekcije (41).

Osim cirkulirajućih proteina, na mjesto oštećenja dolaze i proteini komplementa. Aktivacija komplementa može imati važnu posredničku ulogu u regrutiranju neutrofila i monocita u oštećeni miokard (43). Nastaju i reaktivni kisikovi spojevi (ROS, od engl. *reactive oxygen species*), uglavnom od strane neutrofila i molekularnih obrazaca povezanih s

oštećenjem tkiva (DAMP, od engl. *damage-associated molecular patterns*) koji su ligandi za receptore poput receptora sličnih Toll-u (TLR, od engl. *Toll-like receptor*) i receptor za glikacijske produkte, RAGE (od engl. *receptor for advanced glycation end products*). Odgovori na DAMP omogućuju eliminaciju oštećenih stanica i početak cijeljenja tkiva te su oni razlog zašto se prirodni odgovori javljaju čak i nakon sterilne ozljede kao što je infarkt miokarda (41). TLR i RAGE putevi pokreću transkripciju proupalnih citokina i kemokina u leukocitima, krvožilnim stanicama i fibroblastima (44). HMGB1 protein (od engl. *high mobility group box 1 protein*), odnosno protein visoke pokretljivosti skupine 1, otpuštaju nekrotične stanice, ali i aktivirane imunološke stanice (45, 46). Ovaj je protein ključni inicijator upale, a veže se za TLR-ove i RAGE. Također utječe i na cijeljenje tkiva na način da pretvara makrofage u fenotip koji djeluje zacjeljujuće, potiče aktivaciju matičnih stanica te neoangiogenezu (47).

Kao i kod drugih oštećenja, glavni citokin koji posreduje protuupalni odgovor nakon akutnoga infarkta miokarda je interleukin 1 (IL-1) te se on oslobađa iz oštećenih kardiomiocita. Pokazalo se da i genetska i farmakološka inhibicija IL-1 smanjuje veličinu infarkta miokarda te sprječava negativnu pregradnju lijevoga ventrikula (48, 49).

Kao još jedan važan citokin kod infarkta miokarda, pokazao se IL-6. On ima proupalnu i protuupalnu ulogu (50). Pokazano je da su povišene razine cirkulirajućega IL-6 povezane s akutnim koronarnim sindromima (51). No Mendelianove randomizirane studije pokazale su da genetski polimorfizmi u signalnom putu IL-6 rezultiraju nižim razinama visoko osjetljivoga C-reaktivnoga proteina (hs-CRP) i smanjenim kardiovaskularnim rizikom (52). Genetska ili farmakološka modulacija IL-6 u eksperimentalnom okruženju akutnoga infarkta miokarda dala je kontroverzne rezultate.

Dakle, imunološki odgovor na infarkt miokarda vrlo je složen te se sastoji od više različitih „igrača“ čije se uloge mijenjaju ovisno u kojoj se reparativnoj fazi nalazi miokard, proupalnoj ili protuupalnoj (42).

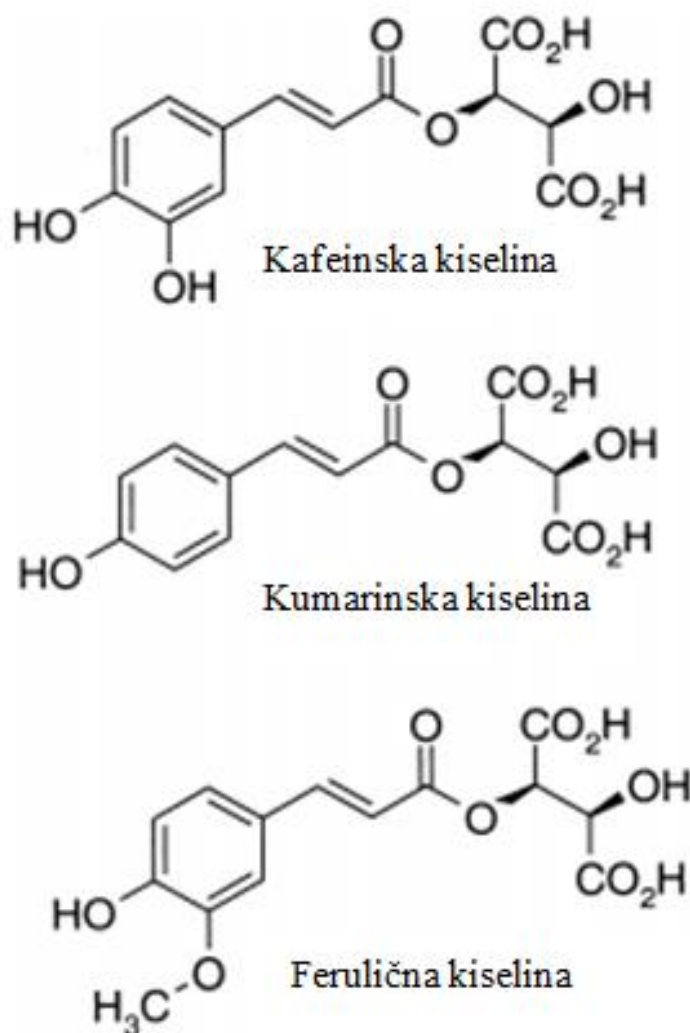
1.1.8 Vino i infarkt miokarda

Odavno je dokazano da kvaliteta vina ovisi o njegovim brojnim sastojcima, vrsti grožđa iz kojega je proizveden te prisustvu odnosno odsustvu i količini upotrijebljenih kemikalija. Prema svom sastavu vino je vrlo složen napitak. Sadrži vodu, alkohol (etanol), estere, aldehide i ketone te organske kiseline (vinska, jabučna, mliječna). Vino također sadrži i sastavnice odgovorne za aromu poput šećera, fenola, minerala, vitamina i lipida.

Jednostavni fenoli spojevi su koji sadrže aromatski prsten i jednu ili više hidroksilnih skupina. Polifenoli su spojevi koji sadrže više fenolnih prstenova u strukturi (53). Fenolni spojevi su uvijek prisutni i oni značajno doprinose boji, okusu, gorčini i adstringentnosti konačnoga proizvoda. Pored njihove izravne uloge, fenolni spojevi također mogu pridonijeti osjetilnim i kemijskim kvalitetama vina zbog njihove interakcije s drugim spojevima, primjerice proteinima i polisaharidima. Na fenolni sastav vina utječu tri faktora; priroda, odnosno sorta grožđa, njegov stupanj sazrijevanja, priroda tla i klima te tehnike vinifikacije i starost vina (54). Fenoli također predstavljaju ključni konzervans vina i osnovu dugoga starenja. Fenoli su spojevi koji lako oksidiraju i zbog njih vino postaje smeđe ukoliko je izloženo zraku. Spojevi koji se lako i brzo oksidiraju u pravilu su dobri antioksidansi što također vrijedi i za vino. Vinski fenoli uključuju neflavonoide; hidroksicinamate, hidroksibenzoate i stilbene te flavonoide; flavanole, flavonole i antocijanidine (53).

Interes za fenolne spojeve u vinu povećao se u posljednjih nekoliko godina zbog njihovoga potencijalno korisnoga djelovanja na ljudsko zdravlje.

Bijela se vina obično prave iz tekućega dijela soka od grožđa, bez doticaja sa sjemenkama i pokožicom, što je glavni razlog relativno niskoga udjela polifenola u bijelim vinima u usporedbi s crnim vinima (54). Flavonoidi se uglavnom nalaze u sjemenkama i pokožici grožđa pa ih iz toga razloga nema toliko u bijelom vinu. Od neflavonoidnih spojeva, hidroksicinamati su najbitniji fenoli u bijelom vinu. Oni prvi podliježu oksidaciji i potiču tamnjenje bijeloga vina, odnosno prelazak u smeđu boju što obično predstavlja problem. Postoje tri glavna hidroksicinamata u grožđu i vinu koja se temelje na kafeinskoj, kumarinskoj i ferulinskoj kiselini. Ovih jednostavnih hidroksicinamičnih kiselina nema u grožđu, već ove kiseline postoje kao esteri vinske kiseline.



Slika 3. Kafeinska, kumarinska i ferulična kiselina kao esteri vinske kiseline. Preuzeto i prevedeno od Waterhouse AL. Wine Phenolics (53).

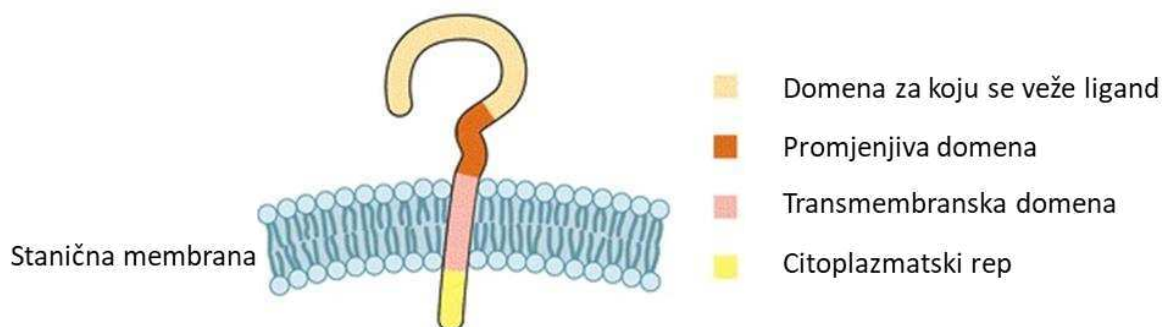
Koristi umjerene konzumacije alkohola za oporavak, odnosno preživljavanje nakon infarkta miokarda dokazane su u više različitih studija. U većini dosad provedenih studija vezanih za zaštitu i oporavak miokarda, bilo je korišteno crno vino zbog visokoga sadržaja antioksidansa, posebice polifenola (55). Crno vino i njegove komponente štite miokard od ishemijskoga oštećenja (56). Polifenoli iz vina povećavaju razinu HDL kolesterola u krvi, a istovremeno sprječavaju podizanje razine LDL kolesterola, a time i njegovu oksidaciju čime se prevenira nastanak masnih plakova (57). S druge strane, sve je više dokaza da se koristi bijeloga vina na zdravlje temelji upravo na djelovanju polifenola. Komponente bijeloga vina,

poput hidroksicinaminskih kiselina (kafeinska kiselina) i monofenola (tirozol), imaju antioksidacijska svojstva što rezultira višestrukim korisnim kardiovaskularnim učincima (55). Tirozol pokazuje protuupalno, antiapoptotsko i antioksidativno djelovanje (58). Prema istraživanju Bertellija i suradnika iz 2002. godine, tirozol i kafeinska kiselina, kao sastavnice bijeloga vina mogu inhibirati određene upalne citokine poput IL-1 beta i IL-6. Niske koncentracije ovih fenola, koje se mogu naći u krvotoku nakon umjerene konzumacije bijeloga vina, značajno inhibiraju oslobađanje nekoliko upalnih citokina (59).

1.2 Biljeg CD44

1.2.1 Građa i distribucija u tkivima

CD44 je transmembranski glikoprotein. Kodiran je jednim genom na kromosomskom lokusu 11p13 (60, 61). CD44 je izražen posvuda u ljudskom organizmu te ima molekulsku masu od 85 do 200 kDa (61). Njegove primarne domene su izvanstranična, transmembranska i unutarstanična/citoplazmatska domena (61). Izvanstanična domena ulazi u interakciju s vanjskim mikrookolišem (60), transmembranska domena osigurava put za interakciju s ko-faktorima i adaptivnim proteinima (60, 63), a unutarstanična domena djeluje na nuklearnu lokalizaciju i transkripcijsko posredovanje (64, 63).



Slika 4. Građa CD44. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Chen i sur. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications (65).

1.2.2 Izoforme

Zahvaljujući umetanju egzona na specifičnim mjestima unutar izvanstanične domene moguće je stvaranje raznih izoformi CD44 (66). Varijantne izoforme CD44 sadrže egzone 6-15 spojene na različitim mjestima između egzona 5 i 16 standardne izoforme (67, 68). Izražaj određenih izoformi CD44 bitan je za progresiju određenih humanih tumora (69, 70).

1.2.3. Interakcija CD44 receptora s ligandima

CD44 ulazi u interakciju s mnogo različitih liganada. Te su interakcije presudne za mnoge njegove stanične funkcije. Ligandi za CD44 su hijaluronska kiselina ili hijaluronan (HA, engl. *hyaluronic acid*), osteoponin, kolageni i matriks metaloproteinaze (MMPs, engl. *matrix metalloproteinases*) (67).

Hijaluronan je glikozaminoglikan koji je komponenta proteogikana izvanstaničnoga matriksa. Smatra se glavnim ligandom za CD44 (71). Interakcije hijaluronana i CD44 bitne su za oblikovanje staničnoga rasta, razvoj, adheziju i migraciju (72) pa tako i za remodeliranje miokarda nakon infarkta.

1.2.4 Funkcija

CD44 receptor posreduje migraciju, proliferaciju i preživljavanje tumorskih stanica putem signalizacije posredovane hijaluronanom (73 – 78). Kako bi se tumor mogao širiti i migrirati u udaljene organe, potrebno je stvaranje novih krvnih žila, odnosno angiogeneza. Dosadašnje studije su identificirale CD44 na endotelnim stanicama (79, 80) te on kontrolira stvaranje krvnih žila (81, 82).

CD44 djeluje i kao transkripcijski faktor. CD44 se može podvrgnuti sekvencionalnoj, proteolitičkoj obradi čime se otcjepljuje njegova unutarstanična domena CD44-ICD (od engl. *intracellular domain*). CD44-ICD translocira se u jezgru i aktivira transkripciju gena. Postoji mogućnost da je ICD glavni modulator metastaziranja karcinoma, što ukazuje da CD44 posreduje metastaziranje (71).

2 CILJEVI I HIPOTEZE

2.1 Ciljevi istraživanja

U perifernoj krvi nakon infarkta miokarda štakora koji su četiri tjedna konzumirali bijelo vino (W, od engl. wine) ili samo vodu (C, od engl. control), odrediti:

1. postotak subpopulacije velikih monocita
2. izražaj CD44 na velikim monocitima.

2.2 Hipoteze

Konzumacija bijeloga vina kroz četiri tjedna, smanjit će:

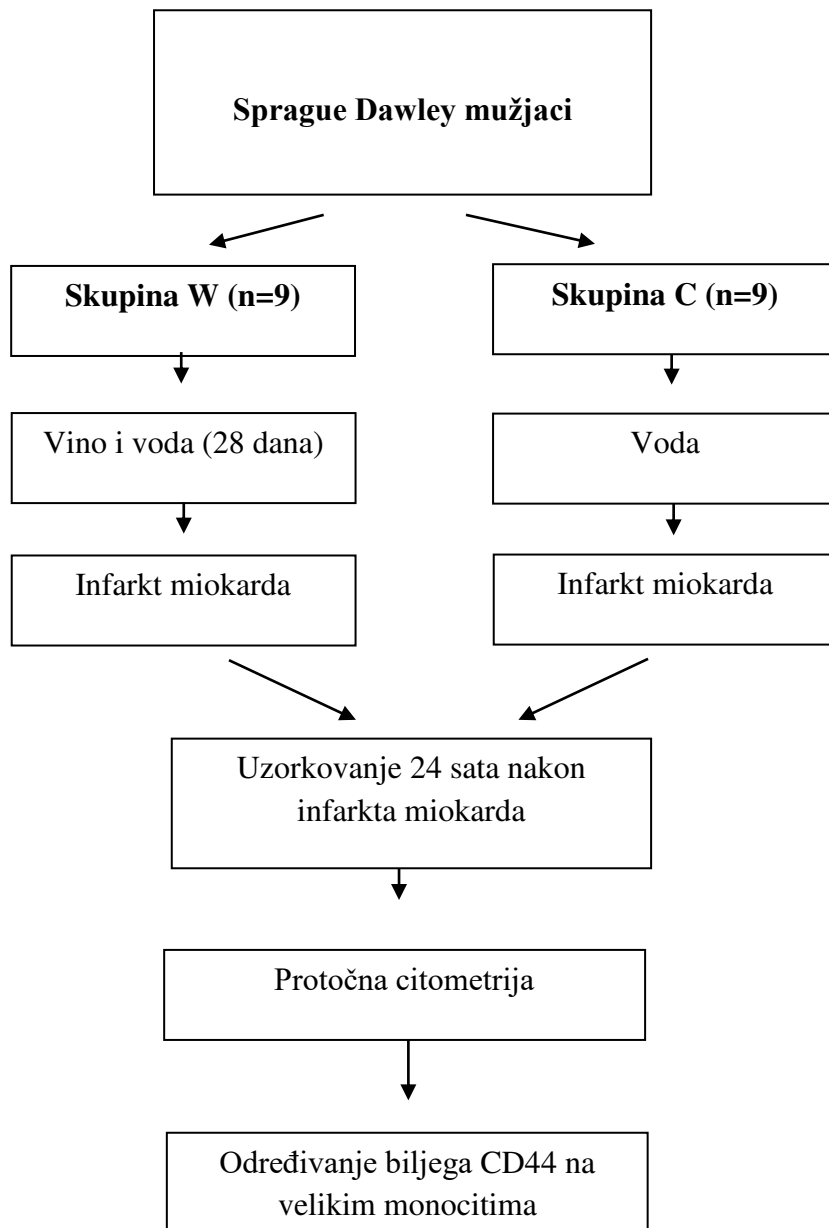
1. postotak velikih monocita
2. izražaj CD44 na velikim monocitima.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Pokusne životinje

Pokuse na mužjacima štakora soja Sprague Dawley odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Splitu (dokument br. 2181-198-03-04-13-0042) kao i Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede (dokument br. 525-10/0255-16-7). Štakori su uzgajani prema „Vodič za njegu i upotrebu laboratorijskih životinja” (NIH, Bethesda, SAD, 1985.) u kontroliranim uvjetima (temperatura, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$; raspored svjetla, 14 sati svjetlo i 10 sati mrak) u Nastambi za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu, hraneći se standardnom hranom s.r.t. Mucedola 3.9 kcal/g *ad libitum* (Settimo Milanese, Milano, Italija).

3.2 Ustroj istraživanja



Slika 5 . Hodogram istraživanja.

Mušjaci štakora Sprague Dawley randomizacijom su podijeljeni u dvije skupine s po 9 životinja; skupina koja pije vino i vodu odvojeno 28 dana pred operaciju (ispitna skupina, W) te skupina koja pije samo vodu (kontrolna skupina, C). Skupina W imala je pristup vinu tijekom 24 sata, a pristup vodi tijekom 6 sati. Svježa voda (50 mL) stavljena je u kaveze svakoga jutra u 9:00 sati u specijalne pojilice, a u 15:00 sati je mjereno volumen popijene vode

i vina. Potom je voda uklanjana do sljedećega jutra, a u pojilicu je dodano 30 mL bijeloga vina („Graševina Krauthaker vintage 2015.“). Na osnovi svakodnevnoga mjerenja u 15:00 sati, štakori su prosječno konzumirali 10 ± 1 mL vina.

Životinje su pred izazivanje infarkta miokarda izvagane kako bi se izračunala optimalna doza smjese anestetika Ketaminola (Ketaminol 10, 1,2 ml/kg, Intervet International, Nizozemska) i Ksilazina (Xylapan, 0,4 ml/kg, Vetoquintol, Švicarska) prema tablici koja se koristi pri Laboratoriju za neurokardiologiju. Mješavina anestetika injektirana je u desni stražnji mišićni odjeljak natkoljenice. Pomoću arterijskih katetera 16 G i 17 G provedena je endotrahealna intubacija. Snimljeni su i kontrolni EKG-i (Cardioline Delta 1, Beltsville, Maryland, SAD).

Životinja je bila priključena na respirator (SAR 830, CWE Inc, SAD) namješten na 59 udisaja/min. Nakon gornje medijalne laparotomije, pomoću kirurškoga mikroskopa (Leica, M520 MC1, Švicarska), napravljen je središnji rez prednje polovice dijafragme, potom je podvezana lijeva prednja silazna koronarna arterija (sa 7,0 neresorbirajućim koncem) oko 2 mm od ruba uške lijeve pretkomore. Boja površine lijeve komore trenutno se mijenjala (bljedilo) i širila do vrha srca.

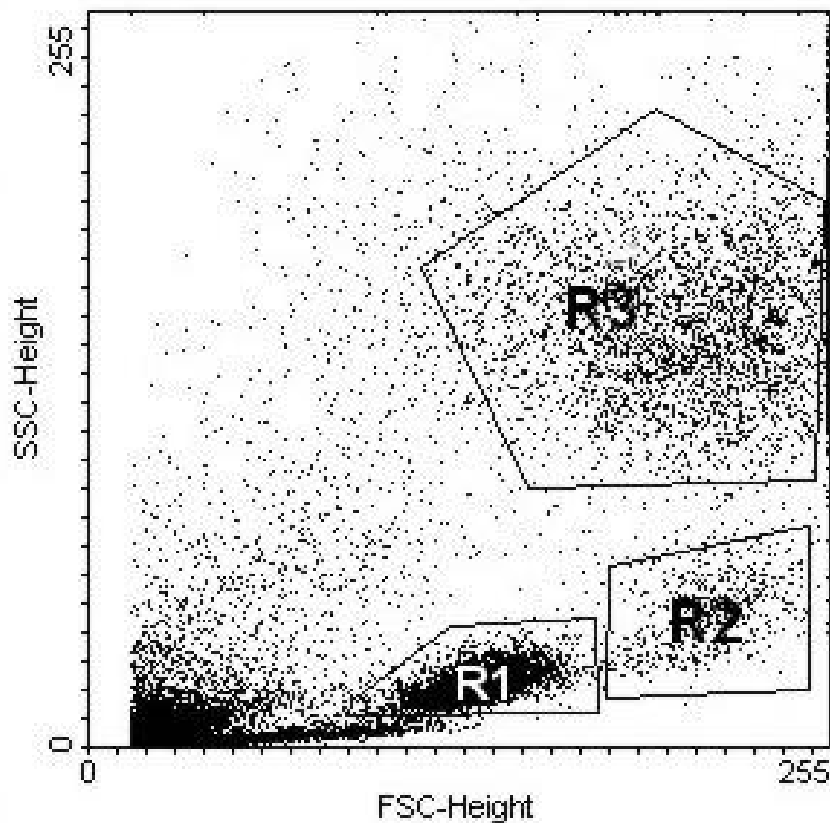
Potom je životinja bila skinuta s respiratora te nakon zašivanja trbušnoga zida i kože prebačena u novi kavez. Sve su životinje postoperativno praćene. EKG snimanjem potvrđena je dijagnoza infarkta miokarda. Preživjele životinje žrtvovane su nakon 24 sata.

3.3 Protočna citometrija

Krv je uzorkovana iz srca u epruvetu s EDTA antikoagulansom. Prije dodavanja protutijela na CD44 100 mikrolitara pune krvi obrađeno je protutijelom na Fc receptore (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka) kako bi se spriječila kasnija nespecifična vezanja CD44 na Fc receptore. Potom je dodano protutijelo na CD44 (konjugirano s kromogenom FITC; BD Pharmingen) te je uzorak inkubiran 20 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Nakon lize eritrocita pomoću otopine za lizu (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), fluorescencija FITC kromogena vezanoga za CD44 monocita obojenih uzorka izmjerena je pomoću BD Accuri C6 (BD Biosciences, Belgija) protočnoga citometra (92). Kao negativna kontrola za postavljanje odgovarajućega pozitivnoga područja korišteni su neobojeni uzorci.

3.4 Obrada podataka

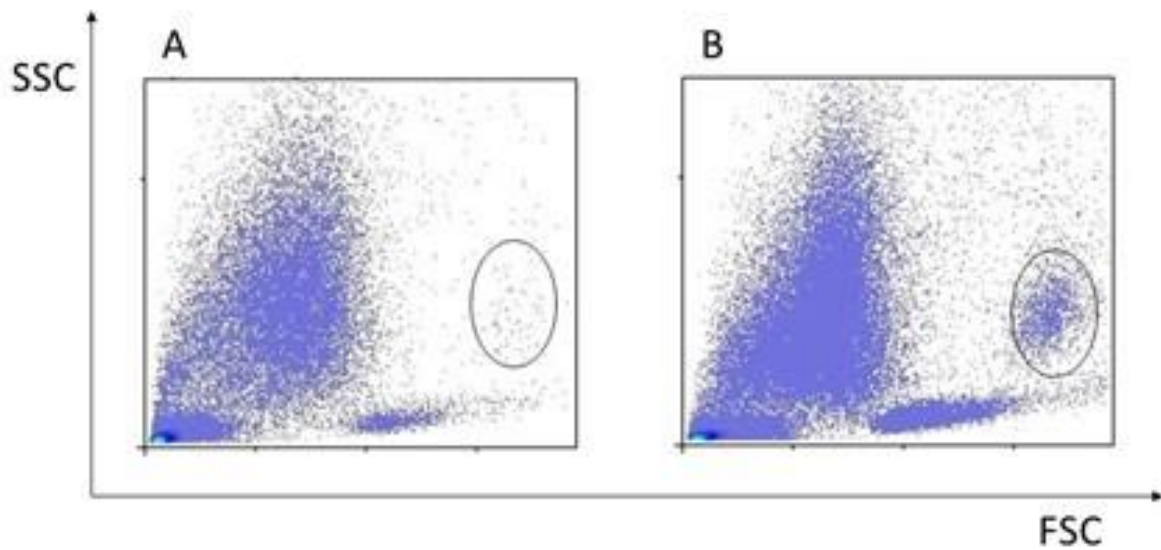
Fluorescencija pojedinačnih leukocita prikazuje se u citogramima s koordinatnim osima FSC (prednje raspršenje, engl. *forward scatter*)/SSC (postranično raspršenje, engl. *side scatter*). FSC parametar približno je proporcionalan promjeru, a SSC parametar ukazuje na granuliranost stanice. Na citogramu ljudskih nepobuđenih leukocita, limfociti (R1) pojavljuju se prije monocita (R2) uz os x jer su limfociti manje stanice od monocita. Limfociti i monociti pojavljuju se prije granulocita (R3) uz os y jer limfociti i monociti imaju manju unutarstaničnu zrnatost (granulaciju) u odnosu na granulocite.



Slika 6. Citogram ljudskih leukocita

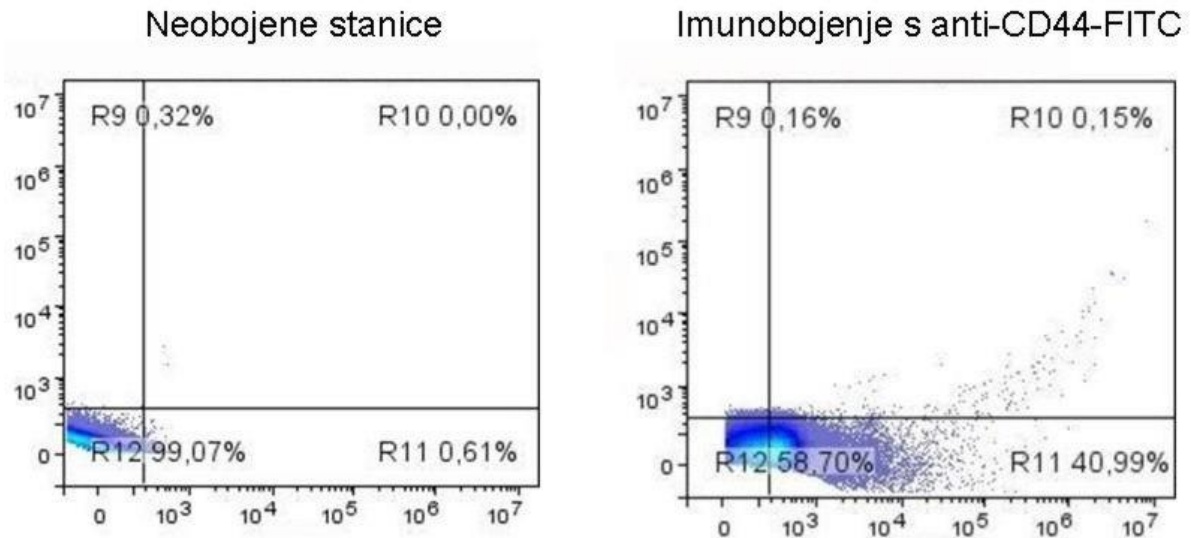
Kod upalne aktivacije monocita oni mogu biti povećani jer su prepunjeni sekretornim mješanicama koje dovode upalne biljege na njihovu površinu (83, 84).

Veliki monociti zapaženi su kod istraživanja infarkta miokarda kako je prikazano na slici 7. (85) te je u ovom diplomskom radu istraživana postotak upravo te subpopulacije, pozitivne na biljeg CD44 kod skupine koja je pila vino. Uz postotak CD44+ velikih monocita, određivan je i prosječni izražaj CD44 po jednom velikom monocitu.



Slika 7. Reprezentativna područja velikih monocita kod neoperiranih (A) i operiranih štakora koji su pili samo vodu (B). Kod neoperiranih štakora poticaj aktiviranja monocita je zanemariv.

Prosječni izražaj biljega CD44 po jednoj stanici određen je parametrom medijan intenziteta fluorescencije. Postavljanje odgovarajućega pozitivnoga područja CD44 postignuto je eliminacijom signala neobojenih stanica kao negativnoga, prema slici 8.



Slika 8. Postavljena granica u odnosu na neobojene stanice (kod $3 \cdot 10^2$ logaritamske skale na osi x) za stanice koje su imunobojene protutijelom na CD44.

3.5 Statistička obrada

Za međusobno uspoređivanje skupina, korišten je Mann Whitney test unutar Past 3.X softvera (Hammer, Harper and Ryan, 2001, University of Oslo, Norveška) sa značajnošću postavljenom na $P < 0,05$. Veličina uzorka izračunata je na temelju Meadove jednadžbe resursa.

4 REZULTATI

4.1 Postotak CD44+ velikih monocita

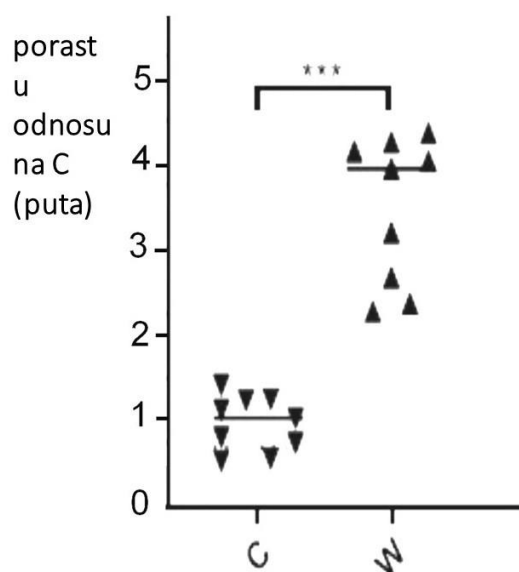
Veliki monociti	Kontrolna skupina		Ispitivana skupina	
	Medijan	IQR	Medijan	IQR
CD44+	97,5	95-99,55	99,4	96,75-99,7

IQR- interkvartilni raspon (od engl. *Interquartile Range*)

Nije bilo statistički značajne razlike. $P > 0,05$ za vino vs. kontrolna skupina.

4.2 Izražaj CD44+ na velikim monocitima

Omjer promjene izražaja CD44 ispitne i kontrolne skupine prikazan je na slici 9.



Slika 9. Izražaj CD44 na velikim monocitima W skupine u odnosu na kontrolnu C skupinu.

Medijan intenziteta fluorescencije (MFI) predstavljen je kao omjer promjene u odnosu na kontrolu.

*** $P < 0,001$.

Izražaj CD44 na velikim monocitima štakora koji su pili vino (W) bio je povećan 3,9 puta ($P < 0,001$) u odnosu na skupinu koja je pila samo vodu (C). Interval pouzdanosti CI (engl. *confidence interval*) bio je od 2,28 do 4,82.

5 RASPRAVA

Cilj ove studije bio je procijeniti utjecaj četverotjedne, umjerene konzumacije bijeloga vina na izražaj upalnoga markera CD44 na velikim monocitima, 24 sata nakon kirurški izazvanoga infarkta miokarda. Veliki su monociti većega promjera i granuliranosti u odnosu na uobičajene monocite. Povećani su zbog svoje prepunjenosti sekretornim mješanicama, koje pupaju iz Golgija, gdje se odvija posttranslacijska modifikacija upalnih biljega, a potom njihova ugradnja u plazma membranu (83, 84).

Glavna uloga imunološkoga sustava je odgovor na ozljedu i infekciju. Urođeni imunološki sustav, koji prvi reagira, sastoji se od stanica mijeloidne loze koje uključuju monocite i neutrofile. Tijekom ozljeda, ove se stanice brzo akumuliraju kako bi eliminirale mrtvo ili umiruće tkivo. Životinjski modeli ukazuju na to da monociti upravljaju započinjanjem i zaključenjem upale, kao i procesom cijeljenja nakon infarkta miokarda (86). Odmah nakon infarkta miokarda i pojave ishemijske, dolazi do njihova prodiranja na mjesto oštećenja, kao i neutrofila i limfocita (87).

Postinfarktna upala aktivan je proces koji zahtijeva aktivaciju višestrukih inhibicijskih puteva. Pravovremeno rješavanje upale nakon infarkta miokarda zahtijeva koordinirano djelovanje nekoliko različitih vrsta stanica i uključuje sudjelovanje izvanstaničnoga matriksa. Dokazi sugeriraju da neutrofilni, mononuklearne stanice, endotelne stanice i periciti doprinose suzbijanju i razrješavanju upalne reakcije; štoviše, promjene u sastavu izvanstaničnoga matriksa također sudjeluju u potiskivanju upalnih signala (88). U ovom istraživanju, izabran je vremenski okvir od 24 sata nakon infarkta jer se značajna miocitoza javlja tek nakon 24 sata (89).

Imunohistokemijska ispitivanja na miševima, pokazala su da je CD44 uglavnom lokaliziran na infiltrirajućim stanicama nakon 24 sata reperfuzije. Nakon 3 do 7 dana reperfuzije CD44 je izrazito induciran u miokardu koji je doživio infarkt i to na makrofagima, miofibroblastima te endotelnim stanicama. Dokazano je da miševi kod kojih je izbačen gen za CD44 imaju produljenu infiltraciju upalnim leukocitima (90).

Nakon ozljede, odnosno infarkta miokarda, prvo reagiraju akutne upalne stanice. Ovom odgovoru prethodi taloženje hijaluronata. Vezanjem hijaluronata dolazi do nakupljanja upalnih stanica, a CD44 modulira izgled stanica. Pojačana sinteza hijaluronata u ozlijeđenim stanicama može biti jedan od izvora hijaluronata koji je uključen u mehanizam privlačenja upalnih stanica. Enzim mijeloperoksidaze, koji je povezan sa neutrofilima u ranoj upali, dovodi do razgradnje hijaluronata čime se stvaraju slobodni radikali. No, neutrofilni imaju

kratak poluživot od 6 do 7 sati te potom nestaju iz rane. Mononuklearne stanice (limfociti i monociti), dolaze na mjesto rane dok neutrofilni nestaju. Monociti također sadrže mijeloperoksidazu, ali samo jednu trećinu od razine koju sadrže neutrofilni. Kako monociti sazrijevaju u makrofage, ovaj se enzim gubi. Monocit, odnosno makrofag, glavna je stanica cijeloga odgovora u cijeljenju rana. Ako je rana sterilna, poput one u infarktu miokarda, cijeli se proces može odvijati bez neutrofila, ali u nedostatku makrofaga, proces zacjeljivanja rane prestaje. Isto tako, hijaluronat je posrednik između izvanstaničnoga matriksa rane i dolaznih upalnih stanica. Hijaluronat sintetiziran u oštećenim endotelnim stanicama, brzo se cijepa. Hijaluronat, niske molekulske mase, visoko je angiogen te osigurava opskrbu krvlju i cijeljenje (91).

Uloga monocitnoga CD44 ključna je nakon što stanice prođu endotelnu barijeru te dođe do vezanja i međudjelovanja s hijaluronatom izvanstaničnoga matriksa. Kod miševa s izbačenim genom za CD44 dolazi do povećanoga izražaja proupalnih citokina u miokardu zahvaćenom infarktom.

Dobro je poznato da infarkt miokarda uništava mrežu hijaluronata u izvanstaničnom matriksu (90), a hijaluronat je vrlo bitan za održavanje strukture tkiva i regulaciju upale (92). Tijekom prvih 1-2 tjedana nakon infarkta miokarda, važan je proces razgradnje izvanstaničnoga matriksa, uključujući infarktom pokidane lance hijaluronata (93). Nakon vezanja hijaluronata izvanstaničnoga matriksa i monocitnoga CD44, monociti su potaknuti na lučenje citokina koji stimuliraju proliferaciju fibroblasta (94). Određena populacija fibroblasta predodređena je da postane populacijom miofibroblasta koja počinje izražavati aktin i miozin glatkih mišića (91). Miofibroblasti sintetiziraju kolagen i hijaluronat koji se zatim izlučuju u izvanstanični matriks te se postiže remodeliranje srčanoga tkiva. Presudna uloga CD44 dokazana je i pokusima s anti-CD44 (94). Naime, sprječavanje međudjelovanja CD44 i hijaluronata otežava cijeljenje srčanoga tkiva.

Ovo je istraživanje bilo fokusirano na CD44+ subpopulaciju velikih monocita. Kod štakora koji su pili vino, došlo je do upečatljivoga porasta izražaja CD44 na monocitima. Izražaj CD44 na svakom velikom monocitu bio je četverostruko veći u odnosu na kontrolu koja je pila samo vodu što je karakterističan nalaz uzrokovan konzumacijom bijeloga vina.

Vrlo je malo istraživanja *in vitro* modela infarkta miokarda kod kojih se istražuje učinak bijelih vina. Iako su bijela vina siromašnija polifenolima u odnosu na crna vina, u mnogim se

zemljama, pa tako i u Hrvatskoj, konzumiraju više nego crna vina. Iz toga razloga, vrlo je zanimljivo proučiti njihovo potencijalno korisno djelovanje.

Unatoč karakterističnom nalazu ove studije, moramo biti svjesni i njezinih ograničenja. S obzirom na to da tijekom istraživanja nisu izolirani pojedini neflavonoidi iz korištenoga bijeloga vina te nije ispitan njihov pojedinačni utjecaj, ne može se reći koja je komponenta vina odgovorna za zapažene učinke. Svakako treba spomenuti da je bijelo vino relativno bogato neflavonoidnim spojevima, od kojih su najznačajniji hidroksicinamati.

Ograničenje ove studije, također je problem translacije rezultata na ljude. Istraživanje je provedeno na mužjacima zdravih, odraslih štakora, neposredno nakon njihove spolne zrelosti, a infarkt miokarda kod ljudi češće se javlja u starijoj životnoj dobi te je popraćeno i raznim drugim zdravstvenim problemima.

Značajan utjecaj vina zapažen u ovoj studiji, svakako je dobar poticaj za nastavak istraživanja.

6 ZAKLJUČCI

1. Konzumacija vina prije infarkta miokarda nije utjecala na postotak CD44+ velikih monocita 24h nakon infarkta.
2. Konzumacija vina prije infarkta miokarda izazvala je četverostruko povećanje izražaja CD44 na velikim monocitima 24h nakon infarkta.

7 POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str 269-275
2. Azevedo PS, i sur. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2016;106(1):62–69.
3. HZJZ: Odjel za srčano žilne bolesti [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. [citirano 2020Mar31]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/>
4. Macon BL. Acute Myocardial Infarction. Healthline [Internet]. [obnovljeno 2018Sep28; citirano 2020Apr20]. Dostupno na: <https://www.healthline.com/>
5. Mayo Clinic. Heart attack [Internet]. [citirano 2020Jul30]. Dostupno na: <https://www.mayoclinic.org/>
6. dos Santos SM, de Araújo TL, Cavalcante TF, Galindo Neto NM. Acute pain in myocardial infarction: analysis of concept. *Rev Gaucha Enferm*. 2015 Sep;36(3):102-8.
7. Pedersen LR, Frestad D, Michelsen MM, Mygind ND, Rasmussen H, Suhrs HE, i sur. Risk Factors for Myocardial Infarction in Women and Men: A Review of the Current Literature. *Curr Pharm Des*. 2016;22(25):3835-52.
8. Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, i sur. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *European Heart Journal*. 2008 April; 932-40.
9. Ivanuša M. Procjena rizika bolesnika s akutnim infarktomiokarda u županijskoj bolnici na temelju odrednica intrahospitalnog letaliteta [disertacija]. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet. 2007.
10. Dugani SB, Melendez APA, Reka R, Hydoub YM, McCafferty SN, Murad MH, i sur. Risk factors associated with premature myocardial infarction: a systematic review protocol. *BMJ Open*. 2019;9(2):e023647.
11. WHO. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2009: Implementing smoke-free environments [Internet]. Geneva: World Health Organization; 1948 – 2020 [citirano 2020Jun20]. Dostupno na: www.who.int/
12. WHO. WHO report on the global tobacco epidemic, 2013: enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship [Internet]. Geneva: World Health Organization; 1948 – 2020 [citirano 2020Jun20]. Dostupno na: www.who.int/

13. Lisowska A, Makarewicz-Wujec M, Filipiak KJ. Risk factors, prognosis, and secondary prevention of myocardial infarction in young adults in Poland. *Kardiologia Polska* 2016; 74,10:1148–1153.
14. Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D et al.. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet*. 2006 Aug 19;368(9536):647-58.
15. Roland J. Dyslipidemia: What You Need to Know. Healthline [Internet]. [obnovljeno 2018Sep29; citirano 2020Jul25]. Dostupno na: <https://www.healthline.com/>
16. Cui Y, Li S, Zhang F, Song J, Lee C, Wu M, i sur. Prevalence of familial hypercholesterolemia in patients with premature myocardial infarction. *Clin Cardiol*. 2019 Mar;42(3):385-390.
17. Koivisto UM, Hämäläinen L, Taskinen MR, Kettunen K, Kontula K. Prevalence of familial hypercholesterolemia among young north Karelian patients with coronary heart disease: a study based on diagnosis by polymerase chain reaction. *J Lipid Res*. 1993;34(2):269-277.
18. Wald DS, Bangash FA, Bestwick JP. Prevalence of DNA-confirmed familial hypercholesterolaemia in young patients with myocardial infarction. *Eur J Intern Med*. 2015;26(2):127-130.
19. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, i sur. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*. 2010;376:112–23.
20. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanans F, i sur. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*. 2004;364(9438):937–952.
21. Pistoia F, Sacco S, Degan D, Tiseo C, Ornello R, Carolei A. Hypertension and Stroke: Epidemiological Aspects and Clinical Evaluation. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*. 2015;23(1): 9–18.
22. Kannel WB, Schwartz MJ, McNamara PM. Blood pressure and the risk of coronary heart disease. *The Framingham study*. *Dis Chest*. 1969;56:43-52.
23. Kannel WB, Gorton T, Schwartz MJ. Systolic versus diastolic blood pressure and risk of coronary heart disease. *The Framingham study*. *Am J Cardiol*. 1971;27:335-46.
24. Dunn FG. Hypertension and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1983 Feb;1(2 Pt 1):528-32.

25. Johansson S, Rosengren A, Young K, Jennings E. Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017 Feb 7;17(1):53.
26. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.* 1995 Jun;61(6 Suppl):1402S-1406S.
27. La Torre G, Saulle R, Di Murro F, Siliquini R, Firenze A, Maurici M, i sur. Mediterranean diet adherence and synergy with acute myocardial infarction and its determinants: A multicenter case-control study in Italy. *PLoS One.* 2018 Mar 15;13(3):e0193360.
28. Mostofsky E, Chahal HS, Mukamal KJ, Rimm EB, Mittleman MA. Alcohol and Immediate Risk of Cardiovascular Events: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *Circulation.* 2016 Mar 8;133(10):979-87.
29. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, i sur. *Patofiziologija.* Zagreb: Medicinska naklada;2011.
30. Zafari AM. Myocardial Infarction. *Medscape [Internet].* [obnovljeno 2019May07; citirano 2020May05]. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/>
31. Manson JE, Tosteson H, Ridker PM, Satterfield S, Hebert P, O'Connor GT, i sur. The primary prevention of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1992 May 21;326(21):1406-16.
32. JCS Joint Working Group. Guidelines for Secondary Prevention of Myocardial Infarction (JCS 2011). 2013;77(1):231-248.
33. Engler R, Covell JW. Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in the dog 1. *Circulation Research.* 1987;61:20–28.
34. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbein GW. Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs 1. *The American Journal of Physiology.* 1986;251:H314–H323.
35. Engler RL, Dahlgren MD, Peterson MA, Dobbs A, Schmid-Schonbein GW. Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3-h experimental myocardial ischemia 1. *The American Journal of Physiology.* 1986;251:H93–100.
36. Mullane K, Engler R. Proclivity of activated neutrophils to cause postischemic cardiac dysfunction: Participation in stunning? *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 1991;5:915–923.

37. Ritter LS, Wilson DS, Williams SK, Copeland JG, McDonagh PF. Early in reperfusion following myocardial ischemia, leukocyte activation is necessary for venular adhesion but not capillary retention. *Microcirculation*. 1995;2:315–327.
38. Suematsu M, DeLano FA, Poole D, Engler RL, Miyasaka M, Zweifach BW. Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Laboratory Investigation*. 1994;70:684–695.
39. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular Research*. 2000;45:651–660.
40. Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewan-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis*. 2001;6:279–290.
41. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Basic immunology: Functions and disorders of the immune system*, Fifth Edition. Canada: Elsevier; 2016.
42. Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, i sur. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2018 Jun;186:73–87.
43. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol*. 2014; 5:101.
44. Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, Mezzapelle R, Rovere Querini P, Venereau E. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol Rev*. 2017;280(1):74–82.
45. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzon M, i sur. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep*. 2004;5(8):825–30.
46. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, i sur. Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7370–7.
47. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 2002.
48. Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117:2670–2683.

49. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *The American Journal of Pathology*. 2008;173:57–67.
50. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*. 1999;99:546–551.
51. Empana JP, Jouven X, Canoui-Poitrine F, Luc G, Tafflet M, Haas B. C-reactive protein, interleukin 6, fibrinogen and risk of sudden death in European middle-aged men: The PRIME study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;30:2047–2052.
52. Swerdlow DI, Holmes MV, Kuchenbaecker KB, Engmann JE, Shah T, Sofat R. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: A Mendelian randomisation analysis. *Lancet*. 2012;379:1214–1224.
53. Waterhouse AL. Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002 957(1), 21–36.
54. Lamçe F, Gozhdari K, Kongoli R, Meta B, Kyçyk O. Evaluation of the content of polyphenols and flavonoids during the fermentation of white wines (cv. Pulëz and Shesh i bardhë) with and without skins. *Albanian j. agric. sci*. 2018.
55. Ključević N, Milat AM, Grga M, Mudnić I, Boban M, Grković I. White Wine Consumption Influences Inflammatory Phase of Repair After Myocardial Infarction in Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*: Nov 2017;7:293-299.
56. Li H, Xia N, Förstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide*. 2012 Feb 15;26(2):102-10.
57. Kulier I. Crno vino i srce. Pliva zdravlje [Internet]. [obnovljeno 2012Dec24, citirano 2020May05]. Dostupno na: <https://www.plivazdravlje.hr/>
58. Bertelli AA, Migliori M, Panichi V, Longoni B, Origlia N, Ferretti A, i sur. Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 May;957:295-301.
59. Bertelli A, i sur. Effect of some white wine phenols in preventing inflammatory cytokine release. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 2002.
60. Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci*. 1992;103(2):293–298.
61. Iczkowski KA. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. *American Journal of Translational Research*. 2010;3:1–7.

62. Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Medical Journal*. 2015;36:273–279.
63. Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med*. 2013;238:324–338.
64. Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, Sasayama T, Araki N, Miki T, i sur. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J. Cell Biol*. 2001;155:755–762.
65. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1–23.
66. Cichy J, Puré E. The liberation of CD44. *J. Cell Biol*. 2003;161:839–843.
67. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol*. 1999;52:189–196.
68. Zeilstra J, Joosten SP, van Andel H, Tolg C, Berns A, Snoek M, i sur. Stem cell CD44v isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling. *Oncogene*. 2014;33:665–670.
69. Günthert U, Stauder R, Mayer B, Terpe HJ, Finke L, Friedrichs K. Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression? *Cancer Surv*. 1995;24:19–42.
70. Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope*. 2009;119:1518–1530.
71. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:18.
72. Mastelić A. Izražaj adhezijskih molekula na granulocitima i monocitima nakon infarkta miokarda kod štakora koji su konzumirali bijelo vino te na tumorskim staničnim linijama nakon tretmana inhibitorom fosfolipaze C [disertacija]. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet. 2020.
73. Bourguignon LY, Gunja-Smith Z, Iida N, Zhu HB, Young LJ, Muller WJ, i sur. CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 1998;176:206–215.
74. Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to

- hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 2004;279:26991–27007.
75. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem.* 2001;276:7327–7336.
76. Kuniyasu H, Oue N, Tsutsumi M, Tahara E, Yasui W. Heparan sulfate enhances invasion by human colon carcinoma cell lines through expression of CD44 variant exon 3. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4067–4072.
77. Wang SJ, Bourguignon LY. Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2006a;132:771–778.
78. Wang SJ, Bourguignon LY. Hyaluronan-CD44 promotes phospholipase C-mediated Ca²⁺ signaling and cisplatin resistance in head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2006b;132:19–24.
79. Liesveld JL, Frediani KE, Harbol AW, DiPersio JF, Abboud CN. Characterization of the adherence of normal and leukemic CD34+ cells to endothelial monolayers. *Leukemia.* 1994;8:2111–2117.
80. Xu Y, Swerlick RA, Sepp N, Bosse D, Ades EW, Lawley TJ. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol.* 1994;102:833–837.
81. Trochon V, Mabilat C, Bertrand P, Legrand Y, Smadja-Joffe F, Soria C, i sur. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis *in vitro*. *Int J Cancer.* 1996;66:664–668.
82. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem.* 2001;276:36770–36778.
83. Glavas D, Markotic A, Valic Z, Kovacic N, Palada I, Martinic R, i sur. Expression of Endothelial Selectin Ligands on Human Leukocytes Following Dive. *Experimental Biology and Medicine.* 2008; 233(9), 1181–1188.
84. Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry Sixth Edition, Proceedings - International Conference on Research Challenges in Information Science. 2014.
85. Režić-Mužinić N, Mastelić A, Benzon B, Markotić A, Mudnić I, Grković I, i

- sur. Expression of adhesion molecules on granulocytes and monocytes following myocardial infarction in rats drinking white wine. 2018; 13(5).
86. Jung K, Kim P, Leuschner F, Gorbатов R, Kim JK, Ueno T, i sur. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circ Res.* 2013;112(6):891–9.
 87. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 2012;110(1):159–73.
 88. Liebetrau C, Hoffmann J, Dorr O, Gaede L, Blumenstein J, Biermann H, i sur. Release kinetics of inflammatory biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. *Circ Res.* 2015;116(5):867–75.
 89. Huang S, Frangogiannis NG. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *Br J Pharmacol.* 2018;175(9):1377–400.
 90. Huebener P, Abou-Khamis T, Zymek P, Bujak M, Ying X, Chatila K, i sur. CD44 Is Critically Involved in Infarct Healing by Regulating the Inflammatory and Fibrotic Response. *J Immunol.* 2008.
 91. Kessiena L, Aya KL, Stern R. Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. *Wound Repair and Regeneration.* 2014; 22(5), 579–593.
 92. McDonald B, Kubes P. Interactions between CD44 and hyaluronan in leukocyte trafficking. *Frontiers in Immunology.* 2015.
 93. Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015.
 94. Henke C, Bitterman P, Roongta U, Ingbar D, Polunovsky V. Induction of fibroblast apoptosis by anti-CD44 antibody: Implications for the treatment of fibroproliferative lung disease. *Am J Pathol.* 1996.

8 SAŽETAK

Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti postotak subpopulacije velikih monocita i izražaj CD44 na velikim monocitima u perifernoj krvi nakon infarkta miokarda štakora koji su 4 tjedna konzumirali bijelo vino ili vodu. Pokusi su izvedeni na mužjacima štakora soja Sprague Dawley koji su randomizacijom podijeljeni u dvije skupine (ispitnu i kontrolnu) s po 9 životinja. Ispitna skupina pila je 28 dana vodu i vino, a kontrolna skupina samo vodu. Nakon 28 dana, životinjama je izazvan infarkt miokarda, a 24 sata nakon je uzorkovana njihova krv. Krv je analizirana metodom protočne citometrije, a rezultati su uspoređeni s rezultatima kontrolne skupine.

Konzumacija bijeloga vina nije utjecala na postotak subpopulacije velikih monocita no dovela je do četverostrukoga povećanja izražaja CD44 na njima. CD44 potiče protuupalno djelovanje te također sudjeluje u transformacij fibroblasta u miofibroblaste i zbog toga njegov pojačan izražaj otkriva mogući povoljan utjecaj vina na mehanizme cijeljenja srčanoga tkiva.

9 SUMMARY

The aim of this study was to determine the percentage of large monocyte subpopulation and CD44 expression on large monocytes in peripheral blood after myocardial infarction in rats that consumed white wine or water for 4 weeks. The experiments were performed on male Sprague Dawley rats that were randomly divided into two groups of 9 animals each. One group, the test group, drank water and wine for 28 days, and the other group, the control group, drank only water. After 28 days, we induced a myocardial infarction in animals and 24 hours later their blood was sampled. Blood was analyzed by flow cytometry, and the results were compared with the results of the control group.

Consumption of white wine did not affect the percentage of subpopulation of large monocytes but led to a fourfold increase in CD44 expression on them. CD44 stimulates anti-inflammatory activity and also participates in the transformation of fibroblasts into myofibroblasts and therefore its enhanced expression reveals the possible beneficial effect of wine on the healing mechanisms of cardiac tissue.

10 ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Antonela Šimić

Datum i mjesto rođenja: 17. studenoga 1996. godine, Rijeka, Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Adresa stanovanja: Brašćine 10, Rijeka

Telefon: +385919526402

E-adresa: antonela.simic11@gmail.com

OBRAZOVANJE

2003. – 2011. OŠ „Kozala“, Rijeka

2011. – 2015. „Salezijanska klasična gimnazija – s pravom javnosti“, Rijeka

2015. – 2020. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer farmacija

STRANI JEZICI

Engleski jezik (aktivno)

Njemački jezik (B1 razina)

AKTIVNOSTI

Stipendist Primorsko-goranske županije

Član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA) (2015.-2019.)

4. Kongres Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (Zagreb, 2017.)

Natjecanje u izradi magistralnih pripravaka (Split, 2019.)

Student Exchange Program (SEP), Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Istanbul, Turska
(2019.)