

# Vino kao modulator rane upalne faze cijeljenja akutnog infarkta miokarda na štakorskom modelu

---

**Ključević, Nikola**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2019**

*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:171:361495>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-14**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**NIKOLA KLJUČEVIĆ**

**VINO KAO MODULATOR RANE UPALNE FAZE CIJELJENJA  
AKUTNOG INFARKTA MIOKARDA NA  
ŠTAKORSKOM MODELU**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, studeni 2019.**

Ova doktorska disertacija izrađena je pod mentorstvom prof.dr.sc.Ivice Grkovića u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu kao dio znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod naslovom: „Biološki učinci vina, utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina (Bio-wine) broj 8652.“

Voditelj i koordinator projekta je prof.dr.sc. Mladen Boban, dr.med. Pokusi na kojima se temelji ova disertacija su provedeni u Nastambi za eksperimentalne životinje, a uzorci su histološki i histokemijski obrađeni i kvantificirani u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju. U istraživanju su sudjelovali istraživači sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, Katedre za farmakologiju i Katedre za biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Pristupnik: Nikola Ključević, dr.med

Mentor: Prof.dr.sc. Ivica Grković, dr.med

## **ZAHVALA**

Sav trud koji je uložen u izradu ovog rada ne bi bio dovoljan bez bezuvjetne potpore moje supruge Marije.

Posebna zahvala ide jednom posebnom čovjeku, mom dragom mentoru, profesoru anatomije Ivici Grkoviću. Njegova strpljivost, dobrotu, marljivost, čovjekoljublje i britkost su mi putokaz kakav čovjek treba biti.

Hvala svim suradnicima na projektu na čelu sa profesorom Mladenom Bobanom.

Hvala mojim roditeljima što su me uvijek podržavali.

Hvala dragom Bogu.

U Splitu, 13.10.2019. godine

dr. Nikola Ključević



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Patološki i patofiziološki mehanizmi nastanka srčanog udara .....	3
1.1.1 Inicijacija upalnog odgovora .....	4
1.1.2 Uloga kisikovih radikala u post-infarktnom upalnom odgovoru .....	5
1.1.3. Komplement .....	6
1.2. NFkB –medijator upalne kaskade .....	6
1.3. Pro-upalni citokini i kemokini u ishemijskoj ozljedi srca .....	7
1.4. Stanični odgovor na ishemiju .....	8
1.4.1. Trombociti .....	9
1.4.2. Neutrofili .....	9
1.4.3. Monociti i makrofazi .....	10
1.4.4. Regulatorni T- limfociti .....	11
1.4.5. Ostale stanice .....	12
1.5. Izvanstanični matriks i matriks metaloproteinaze .....	12
1.5.1.MMP-2 .....	13
1.5.2. MMP 9 .....	14
1.6. TGF- $\beta$ .....	14
1.7. Rezolucija upalne faze cijeljenja infarkta .....	16
1.8. Vino kao kardioprotektivni čimbenik u ishemijskoj bolesti srca .....	18
1.9. Biljezi za histološko praćenje rane upalne faze cijeljenja infarkta .....	20
2.CILJ DISERTACIJE I HIPOTEZE .....	22
2.1. Cilj .....	22
2.2 Hipoteze .....	22
3.METODE I MATERIJALI .....	23
3.1. Etička načela .....	23
3.2. Ustroj istraživanja .....	23
3.3 Pokusne životinje .....	24
3.4. Pokusna vina .....	24
3.5. Protokol pokusa .....	25
3.6. Transdijafragmalni pristup na štakorsko srce .....	28
3.7. Protokol pripreme rezova .....	31

3.8. Imunoflorescencijska tehnika.....	33
3.9. Kvantificiranje podataka i statistička analiza.....	34
3.9.1. Izračun veličine uzorka .....	34
3.9.2. Analiza upalnih markera i statistička raščlamba .....	34
3.9.3. Analiza upalnih stanica i statistička raščlamba.....	35
4. REZULTATI.....	37
4.1. MMP-2 i MMP-9 .....	39
4.2. NF- $\kappa$ B i TGF- $\beta$ 1 .....	42
4.3. MPO i CD68 .....	45
5. RASPRAVA.....	49
5.1. Upalni marker .....	50
5.1.1. MMP .....	50
5.1.2. NF- $\kappa$ B .....	54
5.1.3. TGF- $\beta$ 1 .....	56
5.2. Upalne stanice .....	58
5.2.1. MPO i CD68 .....	58
6. ZAKLJUČAK.....	61
7. OGRANIČENJA PREDLOŽENOG ISTRAŽIVANJA .....	62
8. REFERENCE .....	63
9. SAŽETAK.....	76
10. SUMMARY .....	77
11. ŽIVOTOPIS.....	78

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ATP- adenzin- trifosfat

CD68/microsialin- (eng. cluster of differentiation 68)- transmembranski glikoprotein karakterističan za leukocite mononuklearne loze

DAMP- (eng. danger associated molecular patterns)- oslobađanje specifičnih molekula nakon nekog oštećenja ili nokse koji potiču upalnu reakciju

DAPI- (eng. 4',6-diamino-2-phenylindole)- imunohistokemijski indikator koji se veže na deoksiribonukleinsku kiselinu i omogućuje vizualizaciju staničnih jezgara

GAE- (eng. Gallic acid equivalents)- mjera korištena pri izražaju udjela galične kiseline u vinu što odgovara količini fenola po litri

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

MMP- (eng. matrix metalloproteinase)- obitelj proteaza odgovornih za razgradnju izvanstanične tvari

MPO- (eng. myeloperoxidase)- mijeloperoksidaza- proteolitički enzim

NF-  $\kappa$ B- (eng. nuclear factor kappa B)- transkripcijski čimbenik, jedan od ključnih medijatora upale

PBS- (eng. phosphate buffer saline) – otopina fosfatnog pufera

ROS- (eng. reactive oxygen species)- slobodni kisikovi radikali

TGF- $\beta$ - (eng. transforming growth factor  $\beta$ )- anti-upalni citokin sa pleiotropnim djelovanjem, regulira prijelaz upalne u proliferativnu fazu cijeljenja

TLR- (eng. toll like receptor)- obitelj transmembranskih receptora koji prepoznaju molekularne obrasce povezane sa patogenima te potiču aktivaciju nekoliko kinaza i transkripcijskih čimbenika

WRA- (eng. wine related attenuation)- omjer izražaja upalnih markera/stanica između skupina koje su pile vino i skupina koje su pile vodu

## 1. UVOD

Cijeljenje srčanog mišića nakon ishemijske ozljede ostvaruje se kroz precizno uhodan upalni odgovor koji primarno dovodi do otklanjanja odumrlih stanica i staničnog otpada, uz istovremenu aktivaciju molekularnih signala koji potiču migraciju reparativnih stanica u upalno područje (1). Svakim je danom sve više dokaza da u tom kaskadnom procesu ključnu ulogu ima kočenje i zaustavljanje upalnog odgovora u optimalnom vremenskom periodu kako bi se što bolje formirao ožiljak i kako bi se spriječilo nepovoljne ishode i razvitak post-infarktne komplikacije (2). Budući da i male promjene u arhitekturi srčanog tkiva, odlaganju izvanstanične tvari i fenotipskim karakteristikama stanica jako utječu na geometriju srčanih komora i funkciju klijetki, odstupanja u prostornoj i vremenskoj regulaciji u smislu ubrzanog ali i prolongiranog post-infarktne upalnog odgovora mogu imati jako štetne posljedice za cijeli proces (1, 2). Prekomjerna rana upala kao odgovor na srčanu ishemiju može pojačati raspad izvanstanične tvari (3) što vrlo često rezultira rupturom srčanog mišića, a povećana izražaj pro-upalnih medijatora može dovesti do aktivacije proapoptotskih staničnih putova i potaknuti daljnje propadanje kardiomiocita (1). Nadalje, nedovoljna supresija postishemijske upalne reakcije može dovesti do proširenja upalnog infiltrata i u neinfarcirani dio srčanog mišića i pogoršati ishod u smislu pojačane fibroze i smanjenja diastoličke funkcije srca (4). U početku se vjerovalo da je upalna reakcija na srčanu ozljedu pasivni događaj koji nastaje zbog apoptoze i nekroze ozlijeđenog tkiva, ali danas je široko prihvaćena hipoteza da je inhibicija i rezolucija upalnog odgovora aktivan proces koji zahtijeva aktivaciju staničnih signala i upalnih medijatora (5). Logično je pretpostaviti da razvitak upale kao odgovor na ozljedu nije primarno potekao iz potrebe za cijeljenjem srčanog mišića. Sa evolucijskog gledišta upalna reakcija na ozljedu tkiva razvila se da bi zaštitila organizam od štetnog djelovanja egzogenih infektivnih patogena, dok bi intenzivan i produženi endogeni upalni odgovor mogao biti pretjeran za sterilni okoliš u kojem se razvija ozljeda srčanog mišića te bi mogao biti poguban za očuvanje fine strukture miokarda (5, 6). Istraživači su još prije više od 70 godina opazili da je ishemijska ozljeda srca okidač za intenzivnu upalnu reakciju koja dovodi do leukocitne infiltracije upalnog područja (7). U idućih nekoliko desetljeća utvrđen je štetan učinak neutrofilne infiltracije u peri-infarktnoj zoni te je postavljena hipoteza da post-infarktne upalne reakcije dovodi do citotoksičnih učinaka na preživjele kardiomiocite i do povećanja ishemijske ozljede. Ova je hipoteza testirana 80-ih i 90-ih na velikom broju životinjskih modela, gdje je potvrđeno da neutralizacija nekih specifičnih upalnih medijatora kao što su

adhezijske molekule, citokini i kemokini dovodi do značajnog smanjenja veličine infarkta (4). Nažalost, unatoč obećavajućim saznanjima prikupljenim na eksperimentalnim životinjama, translacija istraživanja na ljude se pokazala neuspješnom, a razne antiupalne terapijske strategije fokusirane na inhibiciju leukocita pokazale nedostatnima u smanjenju ishemijske ozljede (8). Aktivirani kemokini djeluju kroz dva mehanizma: aktiviranjem signala koji dovode do privlačenja upalnih stanica u infarcirano područje, te kvalitativnom modulacijom upalnog infiltrata, pri čemu su neutrofilni prvi leukociti koji migriraju na mjesto ozljede, a nedugo sa njima migriraju pro-upalni monociti i limfociti (5). Više od četvrt stoljeća, neutrofilni su smatrani glavnim izvorom proteolitičkih enzima koji pridonose razgradnji mrtvih stanica i izvanstaničnog matriksa u ranoj upalnoj fazi cijeljenja, no isto tako i povisuju mogućnost razvoja nepovoljnih štetnih ishoda u procesu pregradnje srca, upravo zbog svojih neselektivnih proteolitičkih i citotoksičnih učinaka (2). Jedan od niza intervencijsko-terapijskih postupaka u pokušaju smanjenja veličine infarciranog područja temelji se na prevenciji morfoloških promjena neutrofila koje su im potrebne da bi započeli međustanične interakcije i infiltraciju u tkivo (9). Nadalje, unatoč najnovijim reperfuzijskim strategijama pacijenti koji prežive srčani udar imaju veliki rizik od razvijanja srčanog zatajenja, primarno jer njihovo srce prolazi kroz proces koji se zove ventrikularno remodeliranje (ventricular remodelling). Taj termin je osmislila Janice M. Pfeffer 1985 (10), a odnosi se na komplikacije srčanog udara povezane sa razvojem geometrijskih, morfoloških, molekularnih i funkcijskih promjena srčanih klijetki (što rezultira njihovom dilatacijom i disfunkcijom srčanog mišića), kao i epigenetske, molekularne i funkcionalne promjene kardiomiocita i drugih stanica u infarciranom području. Ozbiljnost post-infarktne komplikacije ne ovisi samo o veličini zahvaćenog područja u akutnoj fazi, već je i izravno povezana sa kvalitativnim osobitostima upalnog odgovora (11). Remodeliranje srčanog mišića dovodi do gubitka ili hipertrofije miocita, povećanja veličine i broja fibroblasta te promjena u koronarnoj vaskularnoj strukturi i funkciji (12). To je dinamičan i kompleksan proces koji rezultira aktivacijom kardiomiocita, fibroblasta i izvanstaničnog matriksa, a može biti fiziološki i patološki (13). Do patološkog remodeliranja dolazi kroz tri obrasca:

- a) koncentrično remodeliranje- sistolička disfunkcija srca koja dovodi do rasta u debljini kardiomiocita,
- b) ekscentrično remodeliranje: zbog dijastoličke disfunkcije srca dolazi do dilatacije kardiomiocita,
- c) post-infarktno remodeliranje-uključuje kombiniranu sistoličku i dijastoličku disfunkciju zbog promjena u području ožiljka (14).

Iako su suvremeni terapijski postupci smanjili rani mortalitet, primarno kroz strategiju rane reperfuzije, još uvijek nema klinički značajne metode kojom bi se izravno djelovalo na proces cijeljenja, a incidencija srčanog zatajenja je još uvijek neprihvatljivo visoka. Pronalaženje novih metoda kojima bi se djelovalo na samu upalnu kaskadu moglo bi smanjiti duljinu trajanja ishemijske faze, optimizirati cijeljenje i smanjiti učestalost post-infarktnih komplikacija (11). Iz tog razloga je nužno bolje razumijevanje rane upalne faze cijeljenja jer procesi koji se tada odvijaju diktiraju i izravno utječu na kasnija zbivanja.

### **1.1. Patološki i patofiziološki mehanizmi nastanka srčanog udara**

Ishemija srca najčešće nastaje kao posljedica začepjenja koronarnih arterija, i to u anatomskom području koje začepljena krvna žila opskrbljuje (15). Rekanalizacija okludirane žile je preduvjet zaustavljanja ireverzibilnog odumiranja kardiomiocita, no tijekom ponovnog uspostavljanja krvotoka dolazi i do nepoželjnog fenomena tzv. reperfuzijske ozljede.

Reperfuzijska ozljeda nastaje zbog aktivacije apoptotskih procesa (16), mikrovaskularne disfunkcije i pojačanog upalnog odgovora (17), što zajedno dovodi do dodatnog oštećenja srčanog mišića. Ishemija uzrokuje odumiranje stanica procesom nekroze koju prati infiltracija upalnih stanica, i dok proces reperfuzije smanjuje broj nekrotičnih stanica istovremeno povećava odumiranje stanica procesom apoptoze (18).

Budući da srce ne može zadovoljiti energetske potrebe u anaerobnim uvjetima (da bi očuvalo neometano odvijanje ključnih staničnih ciklusa), stalna opskrba kisikom je neizostavan uvjet za očuvanje srčane funkcije i viabilnosti (11). U ishemičnom srcu dolazi do poremećaja u ciklusu oksidativne fosforilacije i nakupljanja viška visokoenergetskih fosfata. Zbog nemogućnosti stvaranja ATP-a, dolazi do poremećaja u radu Na/K pumpe, pretjeranog izlaska kalija iz stanice i preopterećenja stanice priljevom vode i natrija te posljedičnog bubrenja stanice. Zbog nedostatka kisika, onemogućeni su aerobni metabolički procesi, te kompenzacijski dolazi do prelaska na anoksične cikluse. Rezultat toga je nakupljanje laktata, već desetak sekundi nakon okluzije. ATP je osim toga ključan i za očuvanje kontraktilne funkcije srca (djelovanje na aktin i miozin mikrofilamente), a na kojima u nedostatku istog, oštećenja nastaju već nakon 60 sekundi. Unutar nekoliko minuta dolazi do reverzibilnih strukturalnih promjena kardiomiocita koje uključuju bubrenje stanica i staničnih organela (mitohondriji) te velikog utroška rezervi glikogena. Ireverzibilna ishemijska ozljeda se razvija nakon 20-40 minuta ishemijske, a očituje se pucanjem sarkoleme i prisutnošću amorfnih

precipitata u mitohondrijima (15). Dominantni način odumiranja kardiomiocita je koagulacijska nekroza, iako se smatra da i apoptoza pridonosi gubitku stanica. Nekrotične stanice oslobađaju unutarstanični sadržaj, što potiče aktivaciju endogenih imunskih mehanizama. Receptori na površini stanica su osjetljivi na ligande koji se oslobađaju prilikom ozljede tkiva, te dolazi do aktivacije upalne kaskade.

Cijeljenje infarkta se može opisati kroz tri međusobno preklapajuće faze (19):

1. Akutna upalna (inflamatorna) faza
2. Subakutna proliferacijska (granulacijska) faza
3. Kronična maturacijska faza (sazrijevanja i formiranja zrelog ožiljka).

Akutnu ili upalnu fazu karakterizira otpuštanje pro-upalnih citokina i kemokina i infiltracija upalnih stanica u infarcirano područje uz degradaciju izvanstaničnog matriksa (20). Tijekom upalne faze cijeljenja srčanog infarkta, aktivacija imunskih signalnih putova dovodi do indukcije kemokina i citokina koji potiču infiltraciju infarciranog područja neutrofilima i pro-upalnim monocitima koji fagocitozom uklanjaju mrtve stanične ostatke. Programirana stanična smrt neutrofila (apoptoza) označava kraj prve faze cijeljenja kada dolazi do aktivacije anti-upalnih signala i fagocitoze leukocitnog infiltrata (21). TLR, komplement i slobodni kisikovi radikali igraju ključnu ulogu u razvijanju upalnog odgovora preko aktivacije (NF)- $\kappa$ B transkripcijskog čimbenika (11).

### **1.1.1 Inicijacija upalnog odgovora**

Nakon nastanka infarkta miokarda, nekrotične stanice oslobađaju unutarstanični sadržaj koji potakne upalni odgovor organizma kroz aktivaciju unutarnjih imunoloških mehanizama. Dosad je opisano nekoliko mogućih teorija o inicijaciji upalne kaskade, a opće prihvaćen je stav da dolazi do preklapanja kroz mehanizme pozitivne i negativne povratne sprege (22). Usljed degradacije izvanstanične tvari i stanične smrti dolazi do oslobađanja specifičnih molekula koje potiču upalnu reakciju, a poznate su pod zajedničkim nazivom signali opasnosti (danger signals) ili DAMP-ovi (danger-associated molecular patterns) (23). U teoriji, svaka molekula koja se u normalnim uvjetima nalazi u stanici ili gradi staničnu membranu je potencijalni DAMP ukoliko dođe do njenog oslobađanja prilikom stanične smrti. Endogeni ligandi oslobođeni iz oštećenog tkiva kao što su fragmenti hijalurona, heat-shock proteini, High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), ATP i mitohondrijska DNA se smatraju ključnim „signalima opasnosti“ u ozlijeđenom miokardu i stimuliraju upalnu

kaskadu preko TLR-a (Toll like receptor), (4, 24-26). TLR predstavlja obitelj transmembranskih receptora koji prepoznaju molekularne obrasce povezane s patogenima te potiču aktivaciju nekoliko kinaza i transkripcijskih čimbenika (11). U odsustvu egzogenih patogena, promjene izvanstaničnog matriksa zbog propadanja tkiva mogu aktivirati imunološki sustav kroz TLR aktivacijske putove. Do danas je pronađeno 12 članova TLR-a obitelji u sisavaca, no njihova uloga u srčanoj patologiji je slabo istražena. TLR 4 je prisutan u srcu, te je značajno povišen u infarktima na štakorskom i mišjem modelu, kao i u uzorcima pacijenata koji su razvili kardiomiopatiju (27). Izražaj TLR-a u srcu dovodi do promjena u funkciji i viabilnosti kardiomiocita i endotelnih stanica tijekom ishemije, dok izražaj TLR-a u stanicama koje migriraju u ishemični miokard posreduje ključne mehanizme cijeljenja ishemijske ozljede (23, 28). TLR se stoga mogu opisati kao most između ishemijske ozljede srca i aktivacije upalnih medijatora iz razloga što se aktivira kroz ligande koji nastaju u ozljedi. Endogeni aktivatori TLR-a su jako značajni kao potencijalne „farmakološke mete“ i velika je vjerojatnost sigurne primjene inhibitora TLR-a jer se aktiviraju isključivo uslijed ozljede, no ta ideja je još uvijek u eksperimentalnoj fazi i daleko od kliničke primjene (23)

### **1.1.2 Uloga kisikovih radikala u post-infarktnom upalnom odgovoru**

Kisikovi radikali su molekule sa nesparenim elektronom u vanjskoj orbiti, te su zbog toga jako reaktivni i sudjeluju u brojnim biokemijskim reakcijama (29). Reagiraju izravno sa lipidima stanične membrane, proteinima i sa DNK uzrokujući staničnu smrt, ključni su u procesu fagocitoze.

U fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između stvaranja kisikovih radikala i njihove razgradnje enzimima (katalaza, glutation peroksidaza i superoksid dismutaza) i unutarstaničnim antioksidansima. No, u ishemiji dolazi do pretjeranog nakupljanja kisikovih radikala zbog iscrpljenih mehanizama razgradnje, kao i zbog pojačanog stvaranja *de-novo* (11). Stvaranje slobodnih kisikovih radikala u ishemičnom tkivu direktno potiče upalnu kaskadu dok pojačano stvaranje slobodnih radikala nadvlada endogeni antioksidativni obrambeni potencijal (30, 31). Smatra se da slobodni radikali djeluju na citokine i kemokine kroz aktivaciju NF- $\kappa$ B čimbenika (30, 31).



### 1.1.3. Komplement

Komplement je jako važan čimbenik imunskog sustava koji sudjeluje u brojnim imunopatološkim stanjima i bolestima, kao i u fiziološkim uvjetima. Oslobođanje građevnih elemenata stanične membrane nekrotičnih kardiomiocita dovodi do aktivacije komplement kaskade (32) i to putem tri različita mehanizma opisana kao klasični, alternativni i lektinski put (33). Brojne studije su pokazale da ishemijska ozljeda srca dovodi do aktivacije komplementa. Hill i Ward su prvi dokazali da ishemijska ozljeda srca može potaknuti aktivaciju komplement kaskade na štakorskom modelu infarkta miokarda (34), a Pinckard i suradnici su pokazali da oslobođanje sadržaja nekrotičnih stanica aktivira C1, C3 i C4 komponente komplementa (32) kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda. Aktivacija komplementa igra ulogu u migraciji neutrofila i monocita u ozlijeđeni miokard (35), i to u prvim satima ishemije što implicira važnost aktivacije komplementa u ranoj fazi cijeljenja.

### 1.2. NFκB –medijator upalne kaskade

Nuklearni faktor kappa B (NF-κB) je transkripcijski čimbenik koji igra ključnu ulogu u aktivaciji gena uključenih u fiziološke procese kao i gena koji kodiraju odgovor na ozljedu i upalu. Prvi je put opisan u aktiviranim B limfocitima kao čimbenik za gene koji kodiraju κ-lance imunoglobulina (36). Iako je do danas sadržao isto ime, dokazano je da NF-κB nije regulator κ-lakih lanaca, niti je specifičan samo za B limfocite, niti je nuklearni faktor u pravom smislu te riječi (37). Prisutan je u svim tipovima stanica, a ovisno o stanju aktivacije, nalazi se u jezgri i u citoplazmi i regulira veliki broj različitih gena koji kontroliraju različite stanične odgovore (38). Može biti aktiviran nizom stimulansa uključujući slobodne radikale, komplement, hipoksiju, pro-upalne citokine, oksidativni stres, bakterije, viruse i ishemiju (37, 39-41), te je uključen u regulaciju sazrijevanja i preživljavanja brojnih tipova stanica, uključujući kardiomiocite (39). Ima jako široku imunološku ulogu, te je bitan u diferencijaciji stanica imunskog sustava i u posredovanju brojnih signalnih putova uključujući TLR (37). Obitelj NF-κB transkripcijskih faktora uključuje nekoliko podjedinica (p50, p52, p65, c-Rel, and Rel B) za koje se smatra da sudjeluju u odgovoru na srčanu ishemiju (40). Podjedinice p50, p52, p65, c-Rel, and Rel B dijele zajedničku Rel homolognu domenu i formiraju heterodimere (najčešće p50/p65, p50/p50, or p65/ p65) koji se nalaze u citosolu i vezani su za inhibitorne IκB proteine. Da bi došlo do aktivacije NF-κB potrebna je fosforilacija inhibitora

NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) preko I $\kappa$ B kinase (IKK). Taj proces omogućuje translokaciju iz citosola u jezgru, gdje onda dolazi do vezivanja za promotor regiju odgovarajućeg gena (42). Aktivacija NF- $\kappa$ B aktivira gene koji dovode do prepisivanja faktora koji imaju pro-upalnu zadaću i anti-upalnu zadaću (42), te igra značajnu ulogu u patofiziologiji endotelne disfunkcije, nestabilne angine pectoris, akutnog infarkta i srčanog zatajenja (43). Opisana su dva puta aktivacije NF- $\kappa$ B: kanonski (klasični) i ne-kanonski (alternativni) put (37), a razlikuju se po multiproteinskim kompleksima koji reguliraju odvajanje I $\kappa$ B podjedinice. Kanonski put je jako važan u regulaciji upale i kontroli proliferacije i apoptoze limfoidnih stanica tijekom imunskog odgovora, dok je ne-kanonski put povezan sa razvitkom limfopoetskih organa. Aktivacija kanonskim putem se događa u minutama nakon podražaja, dok je ne-kanonski odgovor dosta sporiji i omogućuje dugo-djelujuću aktivnost NF- $\kappa$ B (37). Najčešći stimulansi koji pokreću kanonsku aktivaciju NF- $\kappa$ B su citokini (TNF- $\alpha$  i IL-1) i lipopolisaharidi oslobođeni iz patogenih mikroorganizama. Aktivacija je jako brza (unutar 10 minuta) i ne zahtjeva de novo sintezu proteina (44). NF- $\kappa$ B sigurno sudjeluje u regulaciji bar tri genetska obrasca ovisno o staničnom milijeju i vremenu aktivacije: hipertrofiji (45), hipoksiji/ ishemiji (46) i kroničnoj citotoksičnosti zbog produljenog upalnog odgovora (47), te igra središnju ulogu u upali regulirajući izražaj brojnih citokina i kemokina, adhezijskih molekula i staničnih receptora.

### **1.3. Pro-upalni citokini i kemokini u ishemijskoj ozljedi srca**

Brojne su studije u kojima je prikazana aktivacija citokina u infarciranom srcu (48-50). Najkonzistentiji upalni citokini koji su pronađeni na eksperimentalnim modelima i više puta dokazani i potvrđeni u infarciranom srcu su TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 (51-53). Do stimulacije citokina dolazi preko nekoliko mehanizama kao što su aktivacija komplementa, nakupljanje kisikovih radikala i aktivacija NF- $\kappa$ B. Jedna od najvažnijih osobina citokina je njihova raznovrsnost i pleiotropnost. Jedan citokin može modulirati široki spektar bioloških mehanizama i djelovati na različite vrste stanica, a isto tako nekoliko citokina često imaju preklapajuće djelovanje i mogu djelovati na iste stanice sa sličnim ili suprotnim učincima (53). Zbog multifunkcionalnih i često preklapajućih efekata, još je uvijek nedovoljno razjašnjeno djelovanje i uloga u cijeljenju ishemijske ozljede srca. Citokini imaju sposobnost i samoprodukcije kroz pozitivnu povratnu spregu djelujući na NF- $\kappa$ B (54).

Kemokini igraju ključnu ulogu u migraciji leukocita u upalnu zonu, ali i u njihovoj aktivaciji, degranulaciji i apoptozi.

Dijele se u dvije kategorije:

1. homeostatski kemokini (konstitutivni), odgovorni za promet bijelih krvnih stanica u fiziološkim uvjetima i formiranju limfoidnih organa;
2. inducibilni kemokini koji se aktiviraju na upalne ili imunosne podražaje, uglavnom se aktiviraju kada treba potaknuti migraciju leukocita u novonastalo upalno područje (55).

Iako je ova podjela kemokina prilično pojednostavljena, daje osnovni uvid u njihove uloge kod patoloških stanja. Prilikom nakupljanja kisikovih radikala, aktivacije komplementa, TLR putova ili NF- $\kappa$ B aktivacije dolazi do aktivacije inducibilnih kemokina, koji dovode do leukocitne ekstravazacije u infarcirano područje (11). I CC kemokini (potentni kemoatraktanti mononuklearnih stanica) i CXC kemokini (pokretači neutrofilne migracije) su povišeni u infarciranom srcu. Tri najvažnija mehanizma djelovanja na upalnu kaskadu su: migracija neutrofilnih stanica u infarcirano područje (3), diferencijacija makrofaga, te utjecaj na izražaj citokina kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  i IL-10 (25). Predominanti mehanizam supresije kemokina bi mogla biti deaktivacija kemokinetičkih signala preko TGF- $\beta$  i IL-10 (5).

#### **1.4. Stanični odgovor na ishemiju**

Već je uvodno napomenuto da nekrotični kardiomiociti kroz oslobađanje signala opasnosti aktivno pridonose pokretanju unutarnjeg imunosnog odgovora. Aktivacija komplementa, kisikovih radikala i kemokina sudjeluje u migraciji neutrofila u infarcirani miokard.

Oslobađanjem proteolitičkih enzima neutrofilni sudjeluju u „čišćenju“ infarciranog područja od mrtvih stanica i staničnih ostataka, te secerniraju proupalne medijatore koji pojačavaju migraciju mononukleara u upalno područje (21). Kaskada upalnog odgovora u infarciranom srcu je povezana i sa aktivacijom endotelnih adhezijskih svojstava i povećanom permeabilnosti mikrovaskulature. Smatra se da su trombociti prve stanice koje procesom ekstravazacije dolaze na mjesto ozljede (56). Zatim dolazi do infiltracije leukocitnih subpopulacija (neutrofilni, limfociti, monociti) kojima je zadatak očistiti infarcirano područje od mrtvih stanica i izvanstaničnih ostataka. Stoga možemo reći da te stanice igraju ključnu ulogu u procesu reparacije i pripreme za pregradnju i stvaranje kolagenskog ožiljka kojim cijeli ozlijeđeno tkivo.

#### 1.4.1. Trombociti

Uz ulogu koju imaju u procesima hemostaze i tromboze, trombociti moduliraju upalni odgovor i predstavljaju poveznicu između ishemijske ozljede i cijeljenja (57). U rani koja cijeli, aktivirani trombociti se nakupljaju u području ozljede te doprinose stvaranju fibrinskog matriksa te oslobađaju kemokine, citokine, faktore rasta i TGF- $\beta$ . Također, trombociti aktiviraju komplement kaskadu i igraju ulogu u ograničavanju upalnog odgovora samo na infarcirano područje (57). Ipak, unatoč dokazanom modulatornom učinku trombocita u upalnom odgovoru, u istraživanju provedenom na trombocitopeničnim miševima nije nađen statistički značajan učinak na re-epitelizaciju kožne rane, angiogenezu ni odlaganje kolagena (58). Igraju li aktivirani trombociti važnu ulogu u upali i cijeljenju ishemijske ozljede srca, još uvijek nije dovoljno istraženo.

#### 1.4.2. Neutrofili

Neutrofili predstavljaju kratko živeće bijele krvne stanice čija je uloga čišćenje infarciranog područja od odumrlih srčanih stanica, a potom podliježu programiranoj staničnoj smrti (59). Migriraju u ozlijeđeno područje jako brzo nakon infarkta. Da bi došlo do transmigracije neutrofila iz krvi u ozlijeđeno tkivo, potrebna je njihova interakcija sa aktiviranim endotelnim stanicama što uključuje nekoliko koraka kroz adhezijsku kaskadu. Prvo, leukociti iz krvi budu „uhvaćeni“ za endotelne stanice pomoću adhezijskih receptora poznatih po imenu selektini. Selektini dovode do prijanjanja leukocita za aktivirani endotel, naročito u području post-kapilarnih venula. Sastoje se od tri podvrste: L-selektini (CD62L), E-selektini (CD62E) i P-selektini (CD62-P9) i svi su uključeni migraciju leukocita u tkivo (11). Selektini neće dovesti do čvrste adhezije i migracije leukocita u tkivo ukoliko se ne aktivira druga skupina receptora –integrini. To su heterodimerni transmembranski glikoproteini koji se sastoje od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice međusobno povezane nekovalentnim vezama i transportiranim na površinu kao kompleks (60). Iako je uloga integrina i selektina dobro poznata, o samoj dijapedezi leukocita kroz krvnu žilu se malo zna. Leukociti najvjerojatnije prolaze endotelnu barijeru kroz pukotine (junctions) između susjednih endotelnih stanica kojima je primarna uloga održavanje vaskularnog integriteta i regulacija permeabilnosti stanica. Endotelne stanice nisu „pasivni promatrači“ dijapedeze leukocita i osim što sudjeluju u ekspresiji ključnih adhezijskih

molekula, aktivno reguliraju poroznost interendotelnih spojeva, za koje se smatra da se kroz njih odvija leukocitna transmigracija (11). Kao sve stanice koje umiru apoptozom, programirani neutrofili privlače fagocite (makrofage) proizvodeći „find me“ signale (kao što su lipidni medijatori i nukleotidi) i „eat me“ signale (kao što je lizofosfatidilkolin), omogućujući vlastitu razgradnju. Apoptotični granulociti umanjuju upalnu reakciju kroz dva mehanizma:

1. oslobađajući medijatore koji inhibiraju daljnju migraciju neutrofila u tkivo (anexin A1 i laktoferin (61)). Ovi isti medijatori djeluju kemotaktično na fagocite i pridonose smanjenju postojećeg neutrofilnog infiltrata.
2. prilikom fagocitoze neutrofila, u makrofazima se aktiviraju i oslobađaju anti-upalni citokini.

Prema literaturi, moduliranje gustoće neutrofilnog infiltrata i razine aktivnosti u prvim satima nakon infarkta utječe na ranu upalnu fazu cijeljenja, kao i na sve kasnije subakutne faze oporavka (1, 2). Ovu tvrdnju potvrđuje i činjenica da je proteolitički enzim mijeloperoksidaza (MPO), koji primarno oslobađaju aktivirani neutrofili, povezan sa većim rizikom od atrijske i ventrikulske fibrilacije, što može imati izrazito loše učinke na cijeljenje infarkta u post-akutnoj fazi (62).

### **1.4.3. Monociti i makrofazi**

Nakon rane neutrofilne infiltracije, iduće stanice koje migriraju u infarcirano područje su monociti i limfociti (63, 64). Monociti i makrofazi, kao i neutrofili, infiltriraju područje infarkta gotovo neposredno po nastanku akutnog infarkta. Imaju cijeli niz do sada poznatih uloga, od oslobađanja pro-upalnih spojeva, čišćenja od mrtvih ostataka stanica i izvanstaničnog matriksa, pa do stvaranja pro-angiogenih spojeva koji potiču stvaranje ožiljka (65). Rana indukcija CC kemokina MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) posreduje ranu infiltraciju monocitima koji imaju izražena fagocitna svojstva. Nakon infiltracije, njihov fenotip je podložan stalnoj modulaciji ovisno o citokinskom miljeu i prisutnosti čimbenika rasta, koji u konačnici dovode do diferencijacije monocita u makrofage (65). Zbog njihove sposobnosti da izlučuju inhibitorne medijatore kao što su IL-10 i TGF- $\beta$ , igraju važnu ulogu kao negativni regulatori upale (inhibitori). Funkcionalno su heterogeni i imaju kompleksne uloge u upalnim uvjetima. Kod miša su dokumentirane dvije subpopulacije monocita:

- 1) brojnija subpopulacija upalnih miocita koji migriraju u ozlijeđeno područje i uzrokuju visoku ekspresiju CC kemokin receptora CCR2
- 2) manja podvrsta domicilnih monocita koji se nalaze u tkivu (66).

Sličan model monocitnih subpopulacija za različitim učincima je opisan i kod ljudi (67). Makrofazi djeluju na način da proizvode medijatore koji potiskuju upalu, kao i kroz fagocitozu upalnih leukocita. Unatoč tim saznanjima i dosad provedenih iscrpnim istraživanjima, znanje o samim interakcijama i načinu djelovanja na leukocite ostaje nepoznat, ali izgledno je da ključ razumijevanja uloge monocita i makrofaga u prostorno-vremenskim odnosima u cijeljenju infarkta srca leži u identifikaciji subpopulacija i njihovih uloga (5). Do sada su identificirane dvije subpopulacije makrofaga (68), klasično aktivirani M1 makrofazi koji imaju veliki mikrobicidni potencijal i luče velike količine upalnih medijatora i alternativno aktivirani M2. Subpopulacije monocita također migriraju u infarcirani miokard i sudjeluju u regulaciji upalnog odgovora i cijeljenju ožiljka. Podijela makrofaga u literaturi se opisuje i kao M1- pro-upalni i M2- anti-upalni/pro-reparativni, s tim da M1 subpopulacija dominira područjem tri dana od inicijalnog događaja. Stoga, produljena prisutnost M1 subpopulacije može produljiti i pojačati trajanje rane upalne faze cijeljenja i negativno utjecati na konačan ishod (69).

#### **1.4.4. Regulatorni T- limfociti**

U upalnim stanjima, aktivacija kemokina i adhezijskih signala rezultira limfocitnom infiltracijom nelimfoidnog tkiva. Osim T-limfocita koji migriraju u ozlijeđeno područje gdje oslobađaju pro-upalne medijatore, imunostni sustav također stvara populaciju T-stanica čiji je zadatak supresija upalnog odgovora. To su regulatorni CD4/CD25 T-limfociti (70). Postoje dokazi koji upućuju na to da bi regulatorni T-limfociti mogli sudjelovati u smanjivanju post-infarktne upalne odgovora. Kod miševa kod kojih je odstranjen kemokinski receptor CCR5 došlo je do pojačanog upalnog odgovora i povećane aktivnosti matriks metaloproteinaza u perfundiranom miokardu. Povećana upala kod tih životinja bila je povezana sa smanjenom infiltracijom infarciranog miokarda sa regulatornim CD4/CD25 T-limfocitima (71). Regulatorni T-limfociti bi mogli modulirati fenotip makrofaga i smanjiti post-infarktne upale sekrecijom medijatora kao što su IL10 i TGF- $\beta$  (71).

#### **1.4.5. Ostale stanice**

Fibroblasti su najbrojnije ne-kardiomiocitne stanice u srcu te se nalaze u intersticiju i perivaskularnom prostoru. Možda bi mogli igrati ulogu „stražarskih stanica“ te odgovoriti na ishemiju i ozljedu kardiomiocita aktivirajući proinflamatorne citokine i kemokine (72). Endotelne stanice također aktivno sudjeluju u post-infarktnom upalnom odgovoru. Citokini koji se oslobode u zoni infarkta induciraju izražaj adhezijskih molekula na površini endotelne stanice, kada dolazi do interakcije sa cirkulirajućim neutrofilima. Endotelne stanice su također bitan izvor pro-upalnih citokina u infarciranom srcu. Endotelne stanice bi također mogle biti važan izvor upalnih proteina, a dokazano je da aktivacija endotela i izražaj adhezijskih molekula kao što su selektini i integrini te unutarstaničnih adhezijskih molekula (ICAM-1), predstavljaju ključan korak u migraciji leukocitnih subpopulacija u infarcirano područje (73). Srčani mastociti bi također mogli igrati bitnu ulogu u post-upalnoj reakciji. Naime, nalaze se u perivaskularnom prostoru i sadrže veliki broj u fiziološkim uvjetima inaktivnih pro-upalnih medijatora (kao što je TNF- $\alpha$ ), te su sposobni sudjelovati u sintezi citokina i čimbenika rasta. U ishemičnom srcu, mastociti se brzo degranuliraju kao odgovor na aktivaciju komplementa, adenozina ili nakupljanja slobodnih radikala i oslobađaju svoj unutarstanični sadržaj (52).

#### **1.5. Izvanstanični matriks i matriks metaloproteinaze**

Kolagen, laminin i fibronektin su samo neki od brojnih proteina koji izgrađuju izvanstanični matriks miokarda. Za te proteine se smatra sa igraju bitne uloge u odgovoru na razne patofiziološke signale i značajni su u cijeljenju srčanog infarkta (74). Srčani izvanstanični matriks je kompleksna mreža proteina i vlakana u kojima se normalno nalaze ili po potrebi migriraju fibroblasti i leukociti. Osim izražene strukturne uloge (snaga i potpora srčanim stanicama), ima jako važne i ne primarno strukturne zadatke koji su naročito izraženi u patološkim uvjetima (75). Pored u više istraživanja potvrđenog doprinosa u mehaničkoj potpori infarciranog srca, proteini izvanstaničnog matriksa igraju jednu od ključnih uloga u regulaciji upalnog odgovora. Dinamičke promjene u razgradnji izvanstaničnog matriksa dovode do modulacije funkcije i genske ekspresije u fibroblastima, endotelnim stanicama i leukocitima (11). U ranom stadiju nakon infarkta, nakupljanje fragmenata matriksa potiče sintezu citokina, kemokina i pro-upalnih signala, a stvaranje novog matriksa služi kao kostur u koji migriraju leukociti (19). Dokazano je da do pojačane degradacije izvanstaničnog



matriksa dolazi u području granične zone infarkta i da to utječe na veličinu i ekspanziju infarkta (12). Matriks metaloproteinaze (poznate kao i matriksini) su o cinku ovisni enzimi koji razgrađuju komponente izvanstaničnog matriksa, te djeluju i na druge supstrate važne u procesu cijeljenja srčanog infarkta (10) kao što su citokini, kemokini, faktori rasta i adhezijske molekule. Obitelj MMP-aza se klasificira u kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13 i MMP-18), gelatinaze (MMP-2 i MMP-9), stromelizine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrilizine (MMP-7, MMP-26) i MMP membranskog tipa (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 i MMP-25). Ova klasifikacija je složena prema prvotnom kriteriju da je MMP svaki enzim koji ima sposobnost da razgradi bar jedan protein izvanstaničnog matriksa (9, 76).

Najzastupljenije matriks metaloproteinaze u kardiovaskularnim istraživanjima su MMP-2 i MMP-9 (77), naročito u patologiji ishemijske ozljede i cijeljenja infarkta.

### **1.5.1.MMP-2**

U zadnjih desetak godina postalo je jasno da jedna od najraznovrsnijih MMP-aza, MMP-2, ima brojna unutarstanična djelovanja u srčanim miocitima. Prvotno nazvana gelatinazom, uskoro je postala jako atraktivna u smislu moguće terapijske intervencije u ishemijskoj ozljedi srca (78).

Za MMP-2 se trenutno smatra da može modulirati proteine sarkomere i citoskeleta (79-81), mitohondrija i mitohondrijske membrane (81, 82) te jezgru kardiomiocita. U 1-6 dana starim tkivima humanog infarciranog srca, MMP-2 je pronađena u miocitima, fibroblastima, endotelnim i glatko mišićnim stanicama te upalnim stanicama (83).

Do aktivacije MMP-2 dolazi prilikom oksidativnog stresa (9, 84) što rezultira proteolizom nekoliko unutarstaničnih supstrata. Unutarstanična aktivacija MMP-2 kroz glutation ili defosforilaciju pridonosi pojačanom upalnom odgovoru i posljedično većem oštećenju stanica, što može potaknuti disfunkciju srca (85). U ishemijskoj ozljedi aktivacija MMP-2 pridonosi oštećenju miokarda. Iako posreduje ozljedu kontraktilnog aparata, djeluje i korisno u smislu osiguranja strukturalne podrške. Ipak, rana inhibicija MMP-2 bi mogla biti ključna u prevenciji kontraktilne disfunkcije i ruptur srca (9).

Postoje jaki dokazi da MMP-2 ima ulogu unutarstaničnog medijatora ishemijsko-reperfuzijske ozljede i da pridonosi akutnoj reverzibilnoj mehaničkoj disfunkciji koja nastaje neposredno nakon perfuzije („stunning“ ozljeda), (78).



### 1.5.2. MMP 9

Kad je prvi put otkrivena, MMP-9 je nazvana neutrofilna gelatinaza odnosno gelatinaza b. Najzastupljenija je od svih matriks metaloproteinaza koje sudjeluju u procesu cijeljenja ishemijske ozljede srca (86). MMP-9 stvaraju domicilne srčane stanice kao što su kardiomiociti, endotelne stanice i fibroblasti, ali isto tako i leukociti koji infiltriraju infarcirano tkivo nakon ishemijske ozljede (20). Rano nakon infarkta, neutrofili oslobađaju MMP-9, a u kasnijim fazama tu ulogu preuzimaju limfociti, fibroblasti i makrofazi (20). Sve neutrofilne proteaze (elastaze, katepsin G, proteinaza 3) potiču aktivaciju MMP-9 (87). U neutrofilima, MMP-9 se sintetizira tijekom granulocitne diferencijacije u koštanoj srži (87). MMP-9 je u neutrofilima pohranjena u granulama a oslobađa se na kemotaktični podražaj upalnih medijatora te doprinosi ranim promjenama nakon infarkta razgrađujući izvanstanični matriks i potičući infiltraciju makrofaga u infarcirano područje (74).

Slobodni kisikovi radikali mogu aktivirati MMP-9, i to izravno i posredno preko aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (88). Bond i suradnici su dokazali da u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila dolazi do povišenja MMP-9 preko NF- $\kappa$ B aktivacije (89). Također, inhibicija transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B smanjuje stvaranje MMP-9 u glatkim mišićnim stanicama kao i u makrofazima (38, 39). MMP-9 ima na svojoj promotorskoj regiji vezno mjesto za NF- $\kappa$ B. Za MMP-2 još uvijek nema dogovora, no moguće je da NF- $\kappa$ B modulira aktivaciju MMP-2 izravno kroz interakciju za drugim transkripcijskim faktorima ili posredno pojačavajući ekspresiju MMP-1 (90). Inhibicija NF- $\kappa$ B može modulirati aktivnost MMP-ova izravno i/ili posredno, što rezultira poboljšanjem ishoda ventrikulskog remodeliranja, naročito, dilatacije lijeve klijetke. Proteoliza citokina i kemokina posredovana MMP-9 je još jedan od načina na koje MMP-9 utječe na migraciju leukocita i stvaranje povratne sprege (91). MMP-9 osim izražene uloge u upalnoj fazi cijeljenja infarkta, pridonosi i procesu granulacije i kontrakcije rane i pomaže odlaganje kolagena, odnosno djeluje na formiranje i kvalitetu ožiljka, što je jako važno za regionalnu i globalnu funkciju lijevog ventrikula (86)

### 1.6. TGF- $\beta$

Transformirajući faktor rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) je ključni regulator sve tri faze cijeljenja infarkta srca, te je jako važan u vremenskoj koordinaciji cijelog procesa (13). To je pleiotropni citokin

koji sudjeluje u regulaciji brojnih staničnih funkcija, među kojima su regulacija dinamike upalnog procesa, odlaganje izvanstanične tvari te proliferacija, diferencijacija i rast stanica (92). Dosad su kod sisavaca otkrivene 3 strukturno slične izoforme TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, 2 i 3), koje su kodirane preko 3 različita gena (92). TGF- $\beta$ 1 izoforma je najčešća i nalazi se u svim tkivima i stanicama. Iako su *in-vitro* funkcije sve tri izoforme slične, *in-vivo* učinci su različiti. TGF- $\beta$  je izrazito multifunkcionalan protein, te ostvaruje više različitih učinaka na razne vrste stanica koje su uključene u široki spektar bioloških procesa kao što su embriogeneza, stanični rast i diferencijacija, stanična proliferacija i preživljenje, fibroza te regulacija imunskog i upalnog odgovora. Sve tri izoforme ovog čimbenika su povišene u ishemiji. Bioaktivnost TGF- $\beta$  je povišena tijekom prvih sati nakon infarkta, ali prisutnost pro-upalnih medijatora u ovom stadiju bi mogla smanjiti stanični odgovor na TGF- $\beta$ , odgađajući diferencijaciju miofibroblasta i odlaganje matriksa dok rana nije očišćena od mrtvih stanica i staničnog otpada (8).

U infarciranom srcu, TGF- $\beta$  igra ključnu ulogu u patogenezi ventrikularnog remodeliranja kroz učinak primarno na upalnu i fazu proliferacije (13). Prema eksperimentalnim studijama, danas prevladava stajalište da je TGF- $\beta$  ključni čimbenik za tranziciju od upalne faze prema formiranju ožiljka nakon srčanog udara. No, razlog još uvijek nedovoljno razjašnjene uloge leži u neobičnoj biologiji TGF- $\beta$  i posljedičnoj aktivaciji, i zadivljujućoj raznolikosti staničnog odgovora (13).

TGF- $\beta$  prisutan u femtomolarnim koncentracijama inducira kemotaksiju monocita (93), dok u pikomolarnim koncentracijama aktivira monocite, stimulira sintezu citokina, kemokina i čimbenika rasta (93, 94), te pojačava ekspresiju integrina. Za razliku od aktivirajućeg djelovanja na periferne monocite, djelovanje na zrele makrofage je u pravilu supresivno, te dovodi do smanjenja citokinske i kemokinske sinteze i nakupljanja kisikovih radikala (95). Femtomolarne koncentracije TGF- $\beta$ 1 ostvaruju izravni kemotaktični učinak na neutrofile (96) i monocite (93), što je jako važno u procesu infiltracije upalnog područja leukocitima. TGF- $\beta$  potiskuje upalnu reakciju kroz smanjen izražaj upalnih citokina i kemokina i kroz deaktivaciju makrofaga, te kroz poticanje transdiferencijacije i sazrijevanja miofibroblasta i očuvanje komponenti matriksa. TGF- $\beta$  bi mogao biti ključni posrednik u regulaciji brojnih događaja povezanih sa cijeljenjem srčanog infarkta. Ima važnu ulogu u privlačenju monocita u infarcirano područje, te u poticanju stvaranja granulacijskog tkiva (13). Aktivacija TGF- $\beta$  signalnih putova sudjeluje u supresiji pro-upalnih citokina i kemokina u infarciranom srcu što rezultira razgradnjom i fagocitozom upalnog infiltrata. Nadalje, TGF- $\beta$  regulira odlaganje fibroznog tkiva i posreduje stvaranje miofibroblasta (97) kroz indukciju sinteze proteina

izvanstaničnog matriksa te kroz promociju očuvanja već stvorenog matriksa preko povećanog stvaranja tkivnih inhibitora metaloproteinaza. Iako postoje dokazi da se aktivirani TGF- $\beta$ 1 nalazi u izvanstaničnoj srčanoj tekućini već 3-5 sati nakon reperfuzije (98), mehanizam odgovoran za aktivaciju još uvijek nije dovoljno istražen i razumljiv. TGF- $\beta$  ima važnu ulogu i u nastajanju fibroze (99), te inducira pretvorbu fibroblasta u miofibroblaste (100) i potiče sintezu proteina izvanstaničnog matriksa.

### **1.7. Rezolucija upalne faze cijeljenja infarkta**

Možda najvažniji stanični mehanizam odgovoran za prijelaz iz upalnog u proliferacijski stadij cijeljenja je fagocitoza odumrlih stanica u ozlijeđenom tkivu. Taj proces ujedno dovodi i do aktivne supresije upale jer fagociti osim što „čiste“ područje od odumrlih stanica, ujedno i oslobađaju signale koji potiču apoptozu upalnih stanica. Nakon apoptoze, odumrle leukocite fagocitiraju makrofazi, prilikom čega dolazi do još jače inhibicije upale i aktivacije anti-upalnih citokina i signalnih puteva. Produženi ili pojačani upalni signali mogu pojačati štetne ishode aktivirajući proteaze, aktivirajući pro-apoptotske kaskade u kardiomiocitima što nužno pojačava razgradnju matriksa (101, 102). Supresija upale uključuje cijeli spektar inhibitornih signala, uključujući citokine TGF- $\beta$  i IL-10, te razne druge unutarstanične medijatore koji inhibiraju pro-upalnu kaskadu (4). Neselektivna inhibicija upale se dosad nije pokazala kao klinički relevantna, a u nekim slučajevima je imala i štetne posljedice. Sadašnje smjernice ne preporučuju korištenje anti-upalne terapije širokog spektra (kortikosteroidi i NSAID) kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda (103). Bolje razumijevanje biologije upale dovelo je do zaključka da ciljana inhibicija određenih upalnih puteva može djelovati protektivno na infarcirano srce, ali bez ometanja fiziološkog slijeda upalnog odgovora. Dokazano je da neutralizacija nekih specifičnih upalnih medijatora (uključujući integrine, adhezijske molekule, citokine i kemokine) smanjuje veličinu infarkta na životinjskim modelima kod ishemijsko- reperfuzijskog modela ishemijske ozljede. Nažalost, nije se uspjelo translirati eksperimentalne koncepte u uspješan terapijski pristup. Iako se anti-integrinski pristup pokazao jako uspješnim u smanjenju veličine infarkta na eksperimentalnim životinjama, klinički pokusi nisu pokazali da rana CD11/CD18 inhibicija integrina ima učinka kod ljudi (104). Isto tako, inhibicija komplement kaskade nije poboljšala ishode kod pacijenta koji su bili podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji nakon infarkta srca (105).

Postavlja se pitanje zašto se rana inhibicija upale pokazala neuspješnom u smanjenju ishemijske ozljede kod pacijenata sa akutnim infarktom kad je na eksperimentalnim modelima više puta potvrđena kao korisna? Jedan od problema sigurno bi mogao biti neobjavljivanje negativnih rezultata što je uzrokovalo veliki broj objavljenih pozitivnih rezultata u odnosu na negativne te dovelo do krivih zaključaka jer ne reflektira sveukupno iskustvo istraživanja na tu temu. Iako je translacija rezultata dobivenih na životinjskim eksperimentima na ljude često mukotrpan proces, možemo reći da su životinjski modeli i dalje neophodni u proučavanju niza specifičnih molekularnih signala i obrazaca koje nismo u mogućnosti istražiti na ljudima (21). Kod istraživanja na životinjama, pri samom postavljanju studije, mora se voditi računa da se po mogućnosti odstrani sva moguća varijabilnost između životinja (da se razlikuju samo po intervenciji, a unutar skupine da budu što sličnije) kako bi rezultati bili što snažniji i reprezentativniji te da bismo bili sigurni da je upravo ta razlika između istraživanih skupina dovela do značajnog rezultata (otklanjanje pristranosti). Nadalje, pacijenti koji razviju infarkt srca jako se razlikuju i niz je raznih čimbenika koji mogu utjecati na konačan ishod. Primjerice, prisutnost komorbiditeta (dijabetes, hipertenzija, hiperlipidemija), starost, spol, genetika, tip koronarne bolesti, te politerapija nizom farmakoloških pripravaka mogu imati značajan utjecaj na upalni odgovor nakon infarkta, pa se ova kompleksnost ne može projicirati ni na jedan životinjski model (21). Također, većina zaključaka sa animalnih modela izvodi se iz životinja koje su u pravilu mlađe (što implicira jači imunosni odgovor na ozljedu) (106), dok je kod ljudi infarkt srca uglavnom bolest ljudi u zrelijim godinama (>50). Stoga saznanja sa eksperimentalnih modela ne moraju nužno imati prediktivnu vrijednost i garantirati uspjeh unutar kliničkog konteksta.

Zbog neuspjeha pokusnih pristupa temeljenih na aplikaciji neselektivnih inhibitora upale, došlo je do smanjenja entuzijazma vezanog za translaciju istraživanja u tom području, ali sve boljim upoznavanjem upalne kaskade i signalnih molekula opet je porastao interes za ovo područje. Iz razloga što nekontrolirani izražaj, vremensko produljenje i prostorna ekspanzija upale rezultira pojačanim odgovorom i povisuje mogućnosti razvoja disfunkcije i drugih nepovoljnih komplikacija, negativna regulacija upalne kaskade mogla bi igrati ključnu ulogu u patogenezi srčanog zatajenja kod pacijenata koji prežive akutni infarkt srca (8).

## 1.8. Vino kao kardioprotektivni čimbenik u ishemijskoj bolesti srca

Vino je vodena otopina (blizu 78% udio vode) raznih kemijskih komponenti, uključujući aledhide, estere, ketone, lipide, minerale, organske kiseline, fenole, šećere i vitamine (107). Zbog još uvijek nedovoljnog broja epidemioloških studija i *in vivo* dokaza, te prisutnosti raznih varijabli kao što su dob, sklonost alkoholizmu, kompleksnost sastojaka vina i slično, još uvijek ne možemo sa sigurnošću tvrditi ni koja je komponenta vina blagotvorna, ni u kojem scenariju, a često ni u kojoj koncentraciji (107). Stoga možemo reći da je vino je vrlo kompleksan proizvod, što zbog tehnologije proizvodnje, što zbog toga što sadrži na stotine spojeva različitih kemijskih struktura i svojstava (108). Rezultati dosadašnjih epidemioloških studija pokazuju da umjerena konzumacija vina ima povoljne učinke na ljudsko zdravlje, posebice na kardiovaskularni sustav (109-111). Vino usporava razvoj aterosklerotskih pojava putem antioksidacijskog, protu-upalnog, antikoagulantnog učinka te pozitivnim djelovanjem na lipidni status (112-117). Osim alkohola, polifenoli u vinu smatraju se najodgovornijima za ove učinke, iako mehanizmi njihovog djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni (118, 119). Potencijalni protuupalni učinak vina i njegovih bioaktivnih komponenti, naročito polifenola je predmet višegodišnjeg kontinuiranog istraživanja i do sada su objavljene brojne studije koje govore u prilog blagotvornog djelovanja na kardiovaskularni sustav općenito. Poznato je da polifenoli, kao do sada najviše istražene komponente vina, pridonose smanjenju intenziteta upalnog odgovora, što je i dokazano eksperimentima gdje su kao intervencija korištene izolirane polifenolne komponente vina, polifenolni ekstrakti i crno vino. Nekoliko studija iz literature (120-122) govore u prilog tome da resveratrol, kao najjača polifenolna komponenta crnog vina, ima vrlo jaka moduirajuća svojstva na ishemijsku bolest općenito. Primjera za tu tvrdnju je nekoliko. Na *in vitro* izoliranim mišjim srcima tretiranim resveratrolom, došlo je do smanjenja veličine infarkta i poboljšanjem post-infarktne funkcije klijetki (122) u smislu smanjenja ožiljka i inhibicije apoptoze preživjelih stanica (122, 123). Postoje i dokazi da resveratrol ostvaruje svoj blagotvorni učinak u prevenciji kardiovaskularne patologije kroz modulaciju ekspresije citokina (107), te također može imati značajnu ulogu kao prekondicionirajući farmakološki agens. U nešto novijim studijama, pokazano je da resveratrol smanjuje pojavnost post-infarktne aritmija, posebice ventrikularne tahikardije i opći mortalitet ispitivanih životinja (124, 125). Poznato je pak da su bijelo vino i njegove komponente mnogo manje istraženi, vjerojatno jer je siromašniji polifenolima, zbog načina i tehnologije proizvodnje. Tehnološki postupci proizvodnje značajno utječu na kvalitetu i kemijski sastav bijelog vina. Dok se većina današnjih bijelih vina proizvodi tehnologijama

koje sprječavaju brzu oksidaciju nakon otvaranja boce, proizvodnja organskih vina koja ne sadrže konzervanse sve je popularnija. Među takvim su vinima i tradicionalna macerirana bijela vina kod kojih se nakon fermentacije kontakt s čvrstim dijelovima grožđa (pokožice i sjemenke) nastavlja još tjednima ili mjesecima (126). To omogućuje dodatnu ekstrakciju fenolnih spojeva iz pokožica i sjemenki što rezultira vinima specifične zlatne boje i visokog sadržaja polifenola (126-128). Posljedične visoke koncentracije polifenola nastaju i zbog njihove dobre topljivosti u etanolu tijekom maceracije, a nakon završene fermentacije (129). Za razliku od maceriranog koje je slično crnom vinu po polifenolskom sastavu, standardno bijelo vino sadrži jednostavne monofenole kao što su tirozol i kafeična kiselina čiji su antioksidativni i anti-upalni učinci već predloženi u *in vitro* studijama (130), ali i na ljudima (131). Tirozol, bioaktivna fenolska komponenta iz bijelog vina posjeduje jak biološki potencijal uključujući antioksidativni, anti-apoptotski i anti-upalni učinak (132-135). Anti-upalni učinak nekih od individualnih sastojaka bijelog vina je već opisan na nekim modelima, no utjecaj bijelog vina na cijeljenje ožiljka nakon infarkta srca još uvijek nije istražen.

Imajući na umu ohrabrujuća saznanja iz literature kojima su potvrđeni brojne kardioprotektivne učinke crnog vina na koronarnu bolest srca, naš je cilj bio istražiti potencijalni blagotvorni učinak standardnog i maceriranog bijelog vina na cijeljenje akutnog infarkta miokarda i ispitati modulira li prekondicioniranje bijelim vinom kvalitetu i kvantitetu upalnog odgovora na eksperimentalnom štakorskom modelu.

## 1.9. Biljezi za histološko praćenje rane upalne faze cijeljenja infarkta

Dinamičan proces cijeljenja infarkta srca najbolje se može opisati podjelom u tri već spomenute faze (19). Rana upalna faza cijeljenja je razdoblje najjače infiltracije upalnim stanicama i stvaranja upalnih citokina. Njihov zadatak je čišćenje staničnih ostataka i pripremanje područja za proliferaciju, angiogenezu i sazrijevanje ožiljka. Da bi se optimalno procijenile osobitosti te faze, nužno je procijeniti izražaj nekih od ključnih medijatora koji posreduju i moduliraju upalnu kaskadu kao i kvantificirati kvalitetu upalnog infiltrata.

Za potrebe ove disertacije korištena su 4 markera akutne upale: MMP-2, MMP-9, NF- $\kappa$ B i TGF- $\beta$ 1 i dva biljega za diferencijaciju upalnih stanica: MPO i CD68.

MMP-2 je pronađena u miocitima, fibroblastima, endotelnim i glatko mišićnim stanicama te upalnim stanicama (83). Do aktivacije MMP-2 dolazi prilikom oksidativnog stresa (9, 84) što rezultira proteolizom nekoliko unutarstaničnih supstrata. Unutarstanična aktivacija MMP-2 kroz glutation ili defosforilaciju pridonosi pojačanom upalnom odgovoru i posljedično većem oštećenju stanica te može potaknuti disfunkciju srca (85). U ishemijskoj ozljedi aktivacija MMP-2 pridonosi oštećenju miokarda.

MMP-9 stvaraju domicilne srčane stanice kao što su kardiomiociti, endotelne stanice i fibroblasti, ali isto tako i leukociti koji infiltriraju infarcirano tkivo nakon ishemijske ozljede (20). MMP-9 su u neutrofilima pohranjeni u granulama te se oslobađaju na kemotaktični podražaj upalnih medijatora te doprinose ranim promjenama nakon infarkta razgrađujući izvanstanični matriks i potičući infiltraciju makrofaga u infarcirano područje (74).

NF- $\kappa$ B je obitelj transkripcijskih faktora za koje je dokazano da sudjeluju u aktivaciji gena uključenih u fiziološke procese kao i gena koji kodiraju odgovor na ozljedu i upalu.

Aktivacija NF- $\kappa$ B igra značajnu ulogu u patofiziologiji endotelne disfunkcije, nestabilne angine pectoris, akutnog infarkta i srčanog zatajenja (43).

TGF- $\beta$ 1 pleiotropni citokin koji sudjeluje u regulaciji brojnih staničnih funkcija, među kojima su regulacija dinamike upalnog procesa, odlaganje izvanstanične tvari te proliferacija, diferencijacija i rast stanica. TGF- $\beta$ 1 ostvaruje dvostruku ulogu u procesu cijeljenja srčanog infarkta, doprinoseći rezoluciji upale kroz deaktivaciju makrofaga, u isto vrijeme ostvarujući utjecaj na proces fibroze (136, 137). Stoga bi TGF- $\beta$  mogli smatrati ključnim okidačem odgovoranim za prijelaz iz upalne u proliferacijsku fazu cijeljenja.



MPO je proteolitički enzim prisutan u polimorfonuklearima. Nalazi se u lizosomalnim granulama i oslobađa se iz neutrofilnih stanica tijekom njihove aktivacije. Ima važnu ulogu u cijeljenju nakon infarkta miokarda (62, 138).

CD68/makrosialin je glikozirani transmembranski glikoprotein prisutan na mononuklearnim fagocitima, uključujući makrofage, te se rutinski koristi za imunohistokemijsku detekciju tih stanica (138).



## **2.CILJ DISERTACIJE I HIPOTEZE**

### **2.1. Cilj**

1. Glavni cilj našeg istraživanja bio je dokazati da umjerenom konzumacijom vina ostvarujemo kardioprotektivni učinak koji dolazi do punog izražaja tijekom cijeljenja akutnog infarkta miokarda.
2. Drugi cilj našeg istraživanja bio je „titrirati“ ranu (upalnu fazu) cijeljenja akutnog infarkta miokarda kvantitativnom i kvalitativnom analizom infarciranog i rubnog ishemičnog, kao i neinfarciranog dijela miokarda s obzirom na izražaj gore navedenih upalnih markera i upalnih stanica koji se javljaju neposredno nakon infarkta i tijekom prvih 24 sata od inicijalnog događaja na štakorskom modelu.
3. Konačno, važan cilj nam je bio staviti saznanja koja imamo o upalnoj fazi cijeljenja infarkta miokarda u odnos s umjerenom konzumacijom bijelog vina kroz ispitivanje blagotvornog učinka prekondicioniranja standardnom i maceriranom Graševinom na izražaj upalnih markera i prisutnost upalnih stanica u srčanom tkivu nakon 24 sata od infarkta na štakorskom modelu.

### **2.2 Hipoteze**

1. Prekondicioniranje standardnim i maceriranim bijelim vinom smanjuje izražaj MMP-2 i MMP-9 u ranoj upalnoj fazi cijeljenja akutnog infarkta miokarda.
2. Izražaj transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B biti će smanjen u infarciranom srčanom tkivu životinja koje su konzumirale vino.
3. Neće biti razlike u ekspresiji regulatora dinamike upalnog procesa TGF- $\beta$ 1 između ispitivanih skupina.
4. Izražaj MPO pozitivnih stanica će u reprezentativnim peri-infarktним zonama biti manji u vinskim skupinama.
5. Izražaj CD68 pozitivnih stanica će u reprezentativnim peri-infarktним zonama biti manji u vinskim skupinama.
6. Postojati će razlike u kvaliteti upalnog infiltrata između standardne i macerirane Graševine.

### **3.METODE I MATERIJALI**

#### **3.1. Etička načela**

Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane na temelju članka 21. Zakona o zaštiti životinja je donijelo rješenje (Klasa:UP/I-322-01/15-01/38, Ur. broj: 525-10/0255-16-7) kojim se odobrava provođenje dijela glavnog projekta koji se odnosi na eksperimentalno istraživanje koje će biti sastavni dio ove doktorske disertacije. Također, Etičko povjerenje gore navedene institucije temeljem članka 34. Zakona o zaštiti životinja (Klasa: 322-01/15-01/853, UR. Broj 525-15-3) i Poslovnika o radu etičkog povjerenstva je donijelo POZITIVNO mišljenje o provođenju i znanstvenoj utemeljenosti projekta.

Za sva istraživanja unutar glavnog projekta pribavljeno je i pozitivno mišljenje 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.).

Svi postupci i eksperimentalni protokoli su usklađeni sa ARRIVE smjernicama i u skladu su sa Direktivom Europske Unije 2010/63/EU za pokuse na životinjama.

#### **3.2. Ustroj istraživanja**

Istraživanje ima oblik prospektivnog, randomiziranog pokusa koje procjenjuje razvoj infarkta miokarda u štakora te utjecaj prekondicioniranja bijelim vinom i maceriranim bijelim vinom na isti. Ovo istraživanje je dio znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod naslovom: Biološki učinci vina, utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina (Bio-wine) broj 8652.

Istraživanje je provedeno pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, koji je kao ustanova i nositelj projekta. Voditelj i koordinator projekta je prof.dr.sc. Mladen Boban, dr.med. Pokusi su provedeni u Nastambi za eksperimentalne životinje, a uzorci su histološki i histokemijski obrađeni i kvantificirani u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

U istraživanju na kojem se temelji ova disertacija su sudjelovali istraživači sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju te Katedre za farmakologiju i Katedre za medicinsku biokemiju.

### 3.3 Pokusne životinje

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su Sprague-Dawley štakori (*rattus norvegicus*) muškog spola, starosti 9-11 tjedana, tjelesne mase na početku pokusa 150 +/- 5 grama koje su preuzete iz Nastambe za pokusne životinje Medicinskog fakulteta. Životinje su tijekom pokusa boravile u Nastambi u kontroliranim uvjetima (odgovarajuća vlažnost i temperatura sobe, s 12-12 satnim izmjenama svjetlo-tama). Hranjene su standardnom hranom za štakore (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija). Boravile su po jedna u svakom kavezu, a stelja je mijenjana jednom tjedno. Ukupno 72 životinje su randomizirane su u 6 skupina:

WO- konzumacija vode potom podvezivanje LAD,

WW- konzumacija standardne Graševine i vode, potom podvezivanje LAD,

PW- konzumacija macerirane Graševine i vode, potom podvezivanje LAD,

SWO- konzumacija vode, potom „sham“ operacija,

SWW- konzumacija vina, potom „sham“ operacija,

CONT- konzumacija vode, bez operacije .

Za detalje pogledati dijagram toka istraživanja (Slika 1).

### 3.4. Pokusna vina

Vina su proizvedena od grožđa sorte Graševina 2015. godine (13% alkohola) u Krauthaker vinariji, Kutjevo, Hrvatska. Graševina je bijelo grožđe nejasnog podrijetla s predjela središnje i istočne Europe, a predstavlja najrašireniju hrvatsku bijelu sortu. Poznata je pod različitim imenima. U Austriji se naziva *Welschriesling*, u Mađarskoj *Olaszrizling*, a u Sloveniji *Laški Rizling*. U najnovijem svjetskom literaturnom zapisu „*Wine Grapes*“ o vinskim sortama upravo je ime Graševina koje se koristi u Hrvatskoj izabrano kao glavni naziv ove sorte grožđa (139). Standardno bijelo vino proizvedeno je vinifikacijskim postupkom uobičajenim za proizvodnju bijelih vina pri čemu se tijekom fermentacije uklanjaju čvrsti dijelova grožđa iz groždanog soka. Macerirano je vino dobiveno od iste sorte grožđa iz istog vinograda i iste godine berbe postupkom produljene maceracije po tradicionalnim gruzijskim principima proizvodnje (126).

U ovom vinifikacijskom postupku groždani sok najprije spontano fermentira u kontaktu s čvrstim dijelovima grožđa. Nakon fermentacije, bez uklanjanja kožica i koštica grožđa, vino je hermetički zatvoreno u spremnike pri konstantnoj temperaturi tijekom 120 dana. Za potrebe istraživanja utjecaja konzumacije maceriranog vina na osobitosti upalnog odgovora nakon infarkta miokarda kod štakora, korišteno je macerirano vino proizvedeno s dodatkom sumpora jer je kao takvo manje sklono oksidaciji i kvarenju. Detaljna enološka analiza vina učinjena je primjenom akreditiranih metoda opisanih u Kompendiju internacionalnih metoda za analizu vina i vinskog mošta Međunarodne organizacije za vinarstvo i vinogradarstvo (OIV 2016). Analiza uključuje pH, gustoću, sadržaj etanola, pepela, ugljikovog dioksida, slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida, te koncentracije ukupnog suhog ekstrakta, reducirajućih šećera, ekstrakta bez šećera, i nehlapljivih kiselih produkata, ukupnih i hlapljivih kiselina, vinske kiseline, jabučne, mliječne, sorbinske i glukonske kiseline, kao i ukupni sadržaj polifenolnih komponenti. Za mjerenje količine fenolnih komponenti korištena je metoda spektrofotometrije. Uzorci su determinirani Folin-Ciocalteu metodom i rezultati izraženi kao ekvivalent trihidroksibenzoične (galne) kiseline po litri (GAE). Ne-flavonoidna komponenta vina je izolirana postupkom precipitacije flavonoida sa formaldehidom, te je tada izračunata razlika između ukupnog broja polifenola i ne-flavonoide komponente da bi se dobila ukupna koncentracija flavonoida. Absorbancije su izmjerene UV-VIS spektrofotometrom (Specord 200, Analytik Jena Inc., Jena, njemačka), a podaci su prikazani kao prosjek tri mjerenja, kao što je već prethodno opisano u literaturi (140)

### **3.5. Protokol pokusa**

U pokus su uvedene po dvije životinje dnevno i u istom ga slijedu završavale. Ukupno trajanje mjerenja je 28 dana. Opis postupaka:

1. Skupine WO, SWO i CONT pile su samo vodu, dostupnu 24 sata. Svježa voda (50 ml) se prilagala štakorima u posebnoj pojilici svaki dan u 15:00 sati kada se mjerio i volumen popijene vode kroz prethodna 24 sata.
2. Skupine WW i SWW su imale vino dostupno 24 sata. Standardno vino se u posebnoj pojilici ostavljalo u količini od 30 ml svaki dan u 15:00 sati, kada se i mjerio volumen popijenog vina kroz prethodna 24 sata. Voda se, u posebnim bočicama (50 ml), donosila

svakodnevno ujutro u 9:00 sati i uklanjala u 15:00 sati istoga dana, kada se obavljala i zamjena vina. Tom prigodom mjerio se volumen popijene vode u proteklih 6 sati.

3. Skupina PW je imala macerirano vino dostupno 24 sata. Mecerirano vino (30 ml) se u posebnoj pojilici donosilo životinjama svaki dan u 15:00 sati kada se mjerio volumen popijenog vina kroz prethodna 24 sata. Voda se, u posebnim bočicama, donosila svakodnevno ujutro u 9:00 sati i uklanjala u 15:00 sati istoga dana, kada se obavljala i zamjena maceriranog vina. Tom prigodom mjerio se volumen popijene vode u proteklih 6 sati.

4. Napitci su se čuvali u hladnjaku na 4 °C, te su se pripremljeni i u označenim bocama, donosili životinjama u Nastambu za eksperimentalne životinje. Bilo je potrebno osigurati dva kompleta bočica za svaku životinju, odnosno svaki napitak.

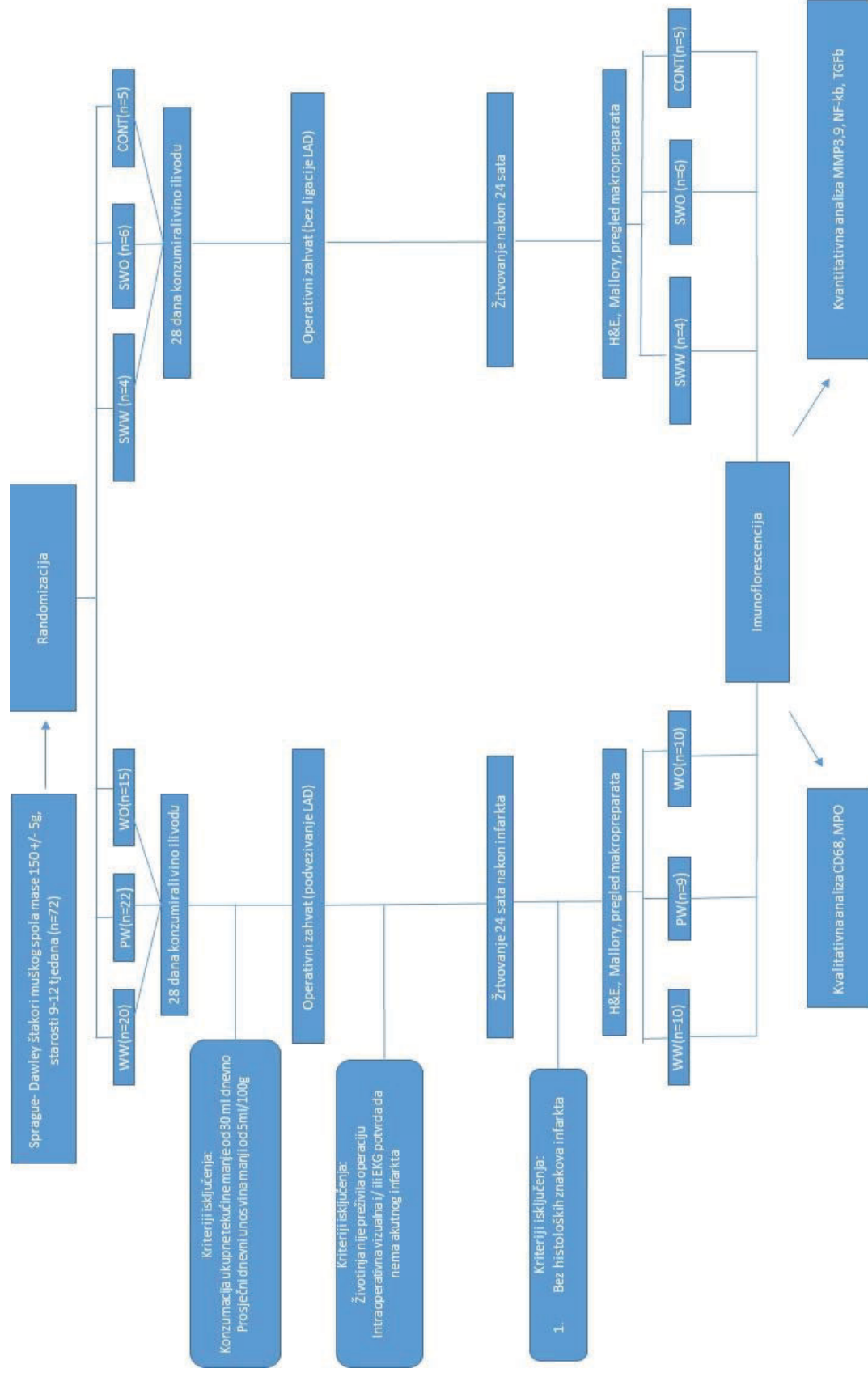
5. Životinje se se hranile *ad libitum*. Svim životinjama je bila dostupna jednaka količina hrane. Svježa hrana, u količini od 300 g se stavljala jednom tjedno u 9:00 sati. Tom prigodom se vagala masa preostale hrane.

6. Masa svake životinje se mjerila jednom tjedno, na početku uvođenja pojedine životinje u pokus i svakih 7 dana nakon toga. Vaganje životinje obavljalo se u 15:00 sati.

7. Svaki od navedenih postupaka bilježio se u kartonu pojedine životinje. Obrasci su se nalazili u prostoriji sa pokusnim životinjama tijekom trajanja pokusa i iznosili kada bi životinja pristupila kirurškom dijelu pokusa.

8. Mijenjanje stelje obavljalo se svakih 7 dana nakon uvođenja životinje u pokus.

Slika 1. Dijagram toka istraživanja



### 3.6. Transdijafragmalni pristup na štakorsko srce

#### *Anestezija životinja i priprema za operaciju*

Prije anesteziranja životinje utvrđena je točna tjelesna masa radi izračuna optimalne doze anestetika prema posebnoj tablici koja se koristi pri Laboratoriju za neurokardiologiju. Životinje su anestezirane intramuskularnom injekcijom kombinacije ketamina (Ketaminol 10, 1,4 ml/kg, Intervet International, Nizozemska) i ksilazina (Xylapan, 0.6 ml/kg, Vetoquintol, Švicarska), i to u stražnju skupinu mišića desne natkoljenice. Nakon što je životinja anestezirana, brijačim aparatom i britvicom je pripremljeno operacijsko polje u području gornjeg abdomena do 1 cm iznad ksifoidnog nastavka prsne kosti.

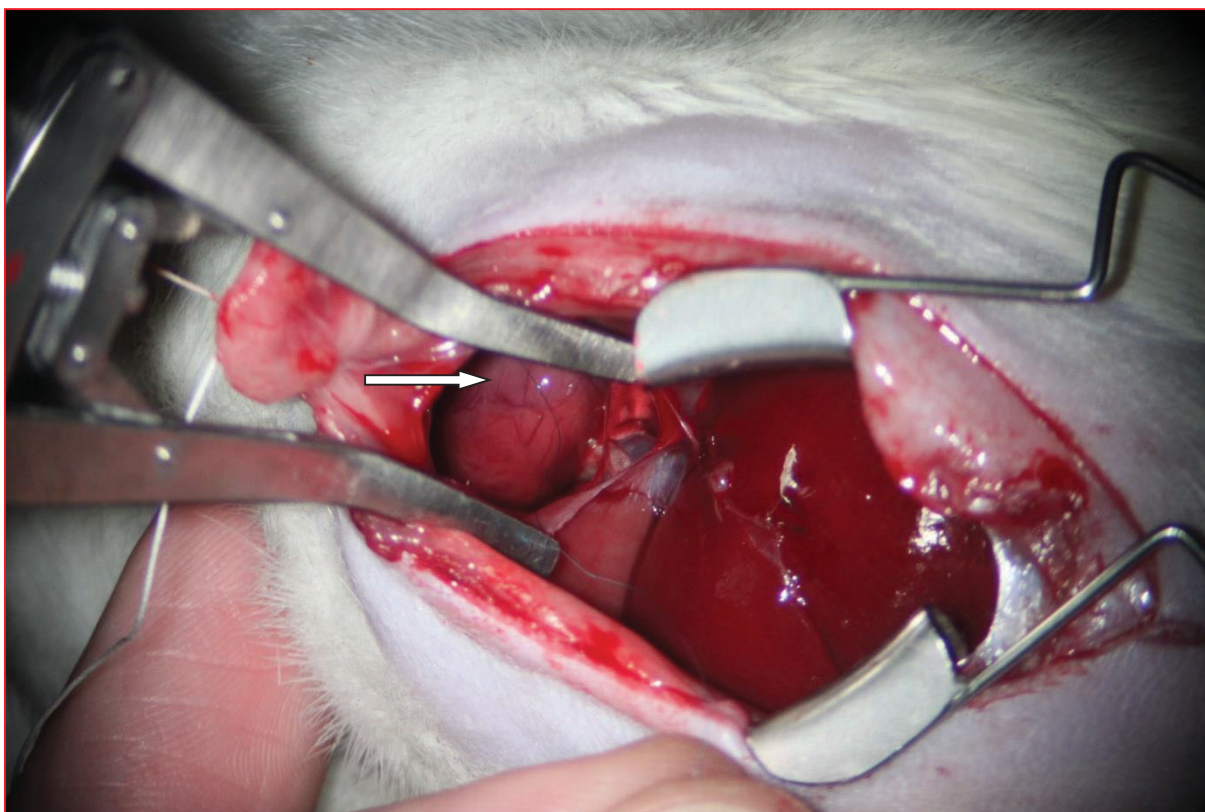
Endotrahealna intubacija je provedena koristeći arterijske katetere 16 G i 17 G. Nakon intubacije životinje su se spajale na elektrode te se snimao kontrolni EKG (Cardioline Delta 1), a potom se pristupilo izvođenju operativnog zahvata.

#### *Opis operativnog zahvata*

Korišten je transabdominalni pristup prednjoj interventrikularnoj grani lijeve koronarne arterije (LAD- engl. left anterior descending) (141) Uz pomoć kirurškog mikroskopa (Leica, M520 MC1, Švicarska) medijano-sagitalnim rezom kože i potkožja prikažu se mišići meke trbušne stijenke nakon čega se rezanjem *lineae albae* otvara peritonealna šupljina. Tupom sekcijom oslobađa se ksifoidni nastavak prsne kosti čijim se podizanjem prikaže donja površina ošita. Postavljanjem retraktora postiže se bolji prikaz područja trbušne šupljine i donje površine ošita. Potom se radi incizija na ošitu u medijalnoj liniji u obliku slova „I“ koji se proteže 1/3 kroz središnji tetivni dio a 2/3 kroz mišićni dio. Odmah po rasijecanju ošita životinja se spaja na respirator, koji se postavlja na 58 udisaja u minuti i udisajni tlak do 14 cm / H<sub>2</sub>O. Zbog boljeg prikaza prsne šupljine, ošit se u području reza raširi posebnim retraktorom. Nakon što se perikard pažljivo oljušti, površina srca se jasno prikaže. Podizanjem lijeve aurikule nalazi se polazište LAD-a koje je smješteno na polovici linije između lijeve aurikule i početka pulmonalnog debla. Sama arterija nije vidljiva na površini srca, dok se vena iznad nje jasno prikazuje. Mjesto podvezivanja je uvijek isto i nalazi se u razini donjeg ruba lijeve aurikule (2-3 mm od početka krvne žile). Za podvezivanje je korišten atraumatski, neresorptivni konac, najčešće Prolene 8-0.

Nakon formiranja trostrukog čvora, makroskopski se promatra srce. Površinsko bljedilo srca znak je uspješnog podvezivanja (Slika 2). Nakon što se površinsko bljedilo fotografira, uklanja se retraktor kojim je prethodno raširen ošit, a nakon toga se ošit sašije neresorptivnim kirurškim koncem, najčešće Prolene veličine 7-0 ili 8-0, i to od mišićnog prema tetivnom dijelu. Trenutak prije učvršćivanja posljednjeg šava, izvodi se re-ekspanzija pluća na način da se posebnom sukcijskom špicom evakuira preostali zrak iz prsne šupljine. Nakon odvajanja od respiratora, životinje kroz desetak sekundi započinju samostalno disati. Šiva se trbušni zid jednostavnim produženim šavom koristeći neresorptivni konac, a nakon toga na isti način šiva se i koža. Nakon provjere da rana ne krvari i provjere kvalitete šava, životinja se prebacuje u svježe pripremljen kavez. Potom slijedi praćenje postoperativnog oporavka štakora tijekom idućih 3-5 sati. U zadnjem aktu se snima još jedan EKG koji potvrđuje definitivnu dijagnozu akutnog infarkta.



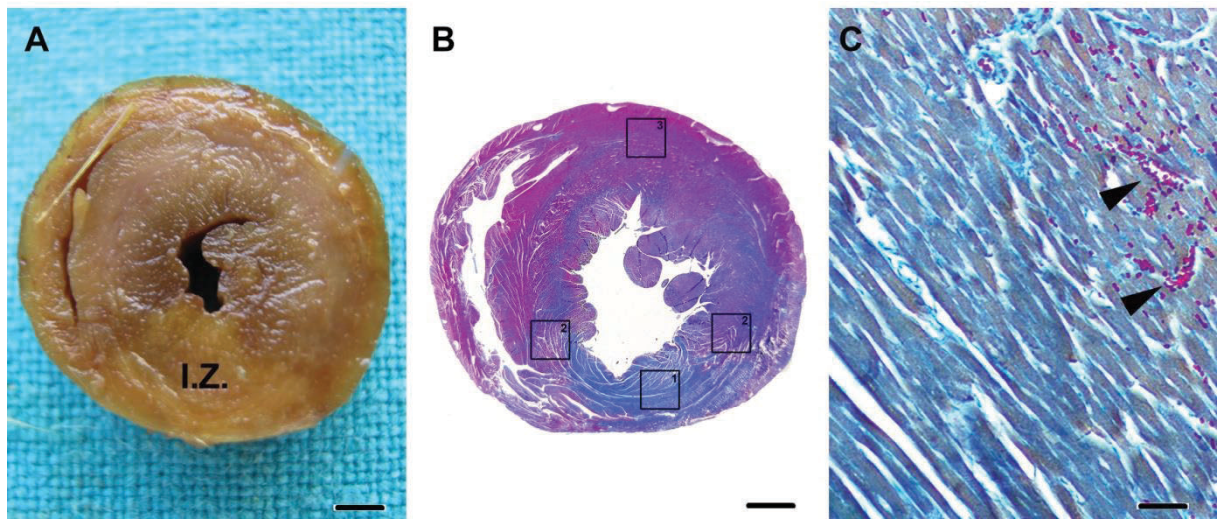


**Slika 2. Intraoperativna fotografija infarkta, životinja WW1. Zamjećuje se ishemijsko bljedilo prednje stjenke lijeve klijetke, od srčanog vrška prema bazi srca uz srčanu pregradu (strelica).**

### 3.7. Protokol pripreme rezova

24 sata nakon što je izveden kirurški postupak i izazvan infarkt, životinje su žrtvovane a srca eksplantirana i fiksirana standardnim postupkom u 4% paraformaldehidu otopljenom u 0.01M fosfatnom puferu (AbCam fixation protocol for IHC). Nakon tri dana fiksiranja, srca su isprana u PBS-u, a potom makroskopski fotografirana (Canon PowerShot A480, Canon, Japan) i izrezana u horizontalnoj ravnini na tri dijela. Prvi rez se izvodio 2 mm ispod donjeg ruba lijeve aurikule, a drugi rez 4 mm ispod prvog reza. Tim postupkom je srce podijeljeno na tri dijela, a za uklapanje u parafinske blokove i analizu svih uzoraka je korišten „srednji“ dio srca (Slika 3A). Uklapanje srca je započinjalo dehidriranjem uzoraka u uzlaznom gradijentu alkohola, da bi se poslije uzorci isprali u ksilolu i zatim uklopili u parafinske blokove. Uklopljeni preparati su potom rezani mikrotomom Leica RM 2155 (Leica Microsystems AG, Njemačka) i to 20-25 rezova po parafinskom bloku, nakon čega su rezovi debljine 4-6 mikrometara postavljeni na silazirana stakla, a za daljnje postupanje su odabrani oni reprezentativni rezovi na kojima se vidjelo cijelo područje infarkta.

Reprezentativni rezovi su potom obojani rutinskim histološkim metodama (H&E i bojanje po Mallory-ju) po uhodanoj recepturi i dugogodišnjem iskustvu Laboratorija za eksperimentalnu neurokardiologiju, kako bi se pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX40 Olympus, Japan), opremljenim fotografskim aparatom (Canon PowerShot A480, Canon, Japan), mogli detaljno pregledati uzorci i odrediti područje infarkta. Uz ostale morfološke osobitosti infarkta (promjene jezgara, gubitak poprječnog pruganja, upalna infiltracija, nekroza, hipereozinofilija citoplazme), uočeno je da peri-infarktno područje obiluje eritrocitnim infiltratom, a infarktno područje je u pravilu jako oskudno infiltrirano ili bez infiltracije (Slika 3C), što je poslužilo kao demarkacijski standard u daljnjoj obradi uzoraka.



**Slika 3.** A) Presjek reprezentativnog uzorka srca koji pokazuje transmuralnu ishemijsku zonu (IZ) prednjeg zida lijeve klijetke. B) način određivanja reprezentativnih zona u svrhu kvantifikacije izražaja imunoflorescencije. Tri zone su analizirane za svaki upalni marker: ishemijska (infarkt) zona (kvadrat označen brojem 1), kontrolni (neinfarcirani) miokard (kvadrat označen brojem 3), peri-infarktna (prijelazna) zona (kvadrati označeni brojem 2). C) Bojanje tkiva po Malloryju: potpuni izostanak infiltracije eritrocitima je definitivni znak potpune ishemije (crne strelice pokazuju eritrocite, ishemijska zona se nalazi lijevo na fotografiji). Peri-infarktna zona je infiltrirana crvenim krvnim stanicama i okružuje zonu ishemije. Povećanje. A i B= 1mm, C= 50 $\mu$ m.

### 3.8. Imunoflorescencijska tehnika

Za potrebe imunoflorescencijskog bojanja, uzorci su deparafinirani u ksilolu po standardnoj laboratorijskoj proceduri, zatim dehidrirani u silaznom gradijentu alkohola, da bi potom bili kratko isprani u destiliranoj vodi i skuhanu u puferu natrijevog citrata (Ph=6.0) 12 minuta na 95°C, da bi se otkrili odgovarajući epitopi i prikazali antigeni. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, rezovi su blago isprani, te potom inkubirani primarnim protutijelima preko noći.

Korištena su sljedeća primarna protutijela:

1. zečje poliklonalno protutijelo na NF-κB (Abcam, UK) 1:1000,
2. zečje poliklonalno protutijelo na MMP-2 (Abcam, UK) 1:500,
3. zečje poliklonalno protutijelo na MMP-9 (Abcam, UK) 1: 1000,
4. zečje poliklonalno protutijelo na TGFβ1 (Abcam, UK) 1:100,
5. zečje poliklonalno protutijelo na MPO (Abcam, UK) 1:100,
6. mišje poliklonalno protutijelo na CD-68 (Abcam, UK) 1:250.

Poslije višestrukog ispiranja protutijela U PBS-u, rezovi su inkubirani 2 sata sa sljedećim sekundarnim protutijelom:

1. Rhodamine magareće anti zečje protutijelo (Jackson laboratories, inc., USA) 1:300.
2. Alexa Fluor 594 kozje anti zečje protutijelo (Abcam, UK) 1:200.
3. Alexa Fluor 488 kozje anti mišje protutijelo (Abcam,UK) 1:200.

Nakon inkubacije od dva sata, rezovi su višestruko ispirani u PBS- u te prije uklapanja je na rezove nanešen DAPI indikator (engl. 4', 6-diamino-2-phenylindole) koji boji jezgre (u trajanju od 1 minute). Rezovi su ostavljeni da se osuše na zraku te su potom prekrveni pokrovnim stakalcem koristeći Immuno- mount (Shandon, Pittsburgh, PA, USA).

#### Kontrole

Pozitivna kontrola je bio fluorescentni signal (bojanje fluorescentnim sekundarnim protutijelima) pojedinih citoplazmi ili jezgara u okolnim strukturama za koje se iz literature

moglo pouzdano utvrditi da reagiraju sa 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 prikazane na način da se proveo cijeli postupak bojanja, ali bez inkubacije primarnim protutijelom, već su rezovi za to vrijeme bili u PBS-u. Negativne kontrole imale su DAPI-jem plavo obojane jezgre, bez fluorescentnog signala u citoplazmi ili jezgrama stanica.

### **3.9. Kvantificiranje podataka i statistička analiza**

#### **3.9.1. Izračun veličine uzorka**

Prilikom obrade podataka napravljena je procjena veličine uzorka i izračun statističke snage koristeći G\*Power software (Department of Experimental Psychology Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany). U ranijim pokusima na ishemijsko-reperfuzijskom modelu bilo je potrebno 4 do 10 životinja po svakoj skupini, pa se sa velikom sigurnošću smatralo da bi ti brojevi bili dovoljni i za ovaj pokus, što se pokazalo točnim (minimalni broj životinja je izračunat uvrstivši srednje vrijednosti dobivenih podataka uz razinu značajnosti hipoteze od 0.05 ( $\alpha=0.05$ ) i snagu testa od 0.80 ( $1-\beta=0.80$ ). Uz te parametre, bila je potrebna veličina uzorka 4 životinje u svakoj od skupina. Na početku istraživanja uključen je veći broj štakora da bi nakon primjene kriterija uključivanja i isključenja životinja u istraživanju u svakoj eksperimentalnoj skupini ostalo najmanje 4 životinje. Kod planiranja pokusa uzeto je u obzir višegodišnje iskustvo istraživača i rezultati ranijih publikacija u kojim su primjenjivani slični protokoli.

#### **3.9.2. Analiza upalnih markera i statistička raščlamba**

Imunofluorescencija je pregledavana i fotografirana Olympus BX51 mikroskopom (Olympus, Japan) opremljenim Olympus DP 71 kamerom. Prethodno je svaki od fotografiranih uzoraka podijeljen na 3 reprezentativne zone koje su određene unaprijed na usporednim histološkim preparatima (Slika 3B).



Prilikom fotografiranja svaka od zona je podijeljena na 4 kvadranta (Slika 3B), te su prikupljene 4 fotografije pri povećanju 40 puta. Ovaj je postupak ponovljen za sve uzorke, vodeći računa da za svaku fotografiju budu uključene iste postavke rezolucije (1360 x 1024) i ekspozicije (1000 ms). Spot size je postavljen na 0.1 %. Prikupljene fotografije su dalje obrađene koristeći ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, SAD) računalni program.

Prilikom kvantifikacije, fotografije su prvo pretvorene u 8-bitne. Nakon toga je preko opcije Adjust-Threshold mjerenje standardizirano tako da je za sve fotografije postavljen isti raspon nijansi sive (40-255). Na taj način se postigla maksimalna konzervativnost u mjerenju izražaja pozitivnog signala i svelo slučajno uključanje lažno pozitivnog signala na zanemarivu vjerojatnost. Program je po postavljenim naredbama automatski računao pozitivni signal i izrazio ga kao broj piksela. Ponovljen je isti postupak za sve fotografije, a nakon završetka su uzete u obzir pukotine u tkivu te je za svaku fotografiju izračunat broj piksela koji se odnosi na pukotine kako bi se isključio od ukupnog broja piksela.

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

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

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

Priroda distribucije rezultata mjerenja utvrđena je Kolmogorov-Smirin-ovim testom a skupine su međusobno uspoređene T-testom za utvrđivanje razlike između dvije nezavisne skupine kod kojih je utvrđena normalna distribucija podataka, a Mann-Whitney testom su analizirani podaci za koje je utvrđeno da je „odbačena“ normalna raspodjela. Rezultati su opisani kroz prikaz srednje vrijednosti ± standardna devijacija uz prikaz razne statističke značajnosti (p).

### **3.9.3. Analiza upalnih stanica i statistička raščlamba**

Za potrebe ove analize uspostavili smo ukupno pet reprezentativnih zona u odnosu na područje infarkta i to: tri peri-infarktne zone (u tekstu oznaka PIZ), jedna zona u sredini infarciranog područja (u tekstu oznaka IZ), te jedna zona na stražnjem segmentu interventrikularnog septum koja predstavlja neinfarciranog područje (dalje u tekstu oznaka CZ). Na oba ruba infarkta analizirane su peri-infarktne zone (oznaka u tekstu PIZ 1 & PIZ 2), kao i granično

subepikardijalno područje (PIZ-EPI). Obzirom da “sham” životinje nisu imale infarkt, nije bilo svrsishodno analizirati peri-infarktne zone, već smo kod tih životinja analizirali neinfarciranu kontrolnu zonu i subepikardijalno područje.

Četiri nepreklapajuća polja u svakoj zoni smo fotografirali na florescentnom mikroskopu pri povećanju 40x i to kroz tri filtera: crveni (Alexa Fluor 594), zeleni (Alexa Fluor 488) i plavi (DAPI). To nam je omogućilo kololokalizaciju MPO, CD68 i DAPI na svakom slikanom polju. Tako pribavljene fotografije su potom analizirane i kvantificirane koristeći ImageJ računalni program (NIH, Bethesda, Nizozemska). Ukupan broj MPO i CD68 pozitivnih stanica po reprezentativnom polju su neovisno izbrojala dva istraživača, i to koristeći računalnu opciju “Multi-point tool”.

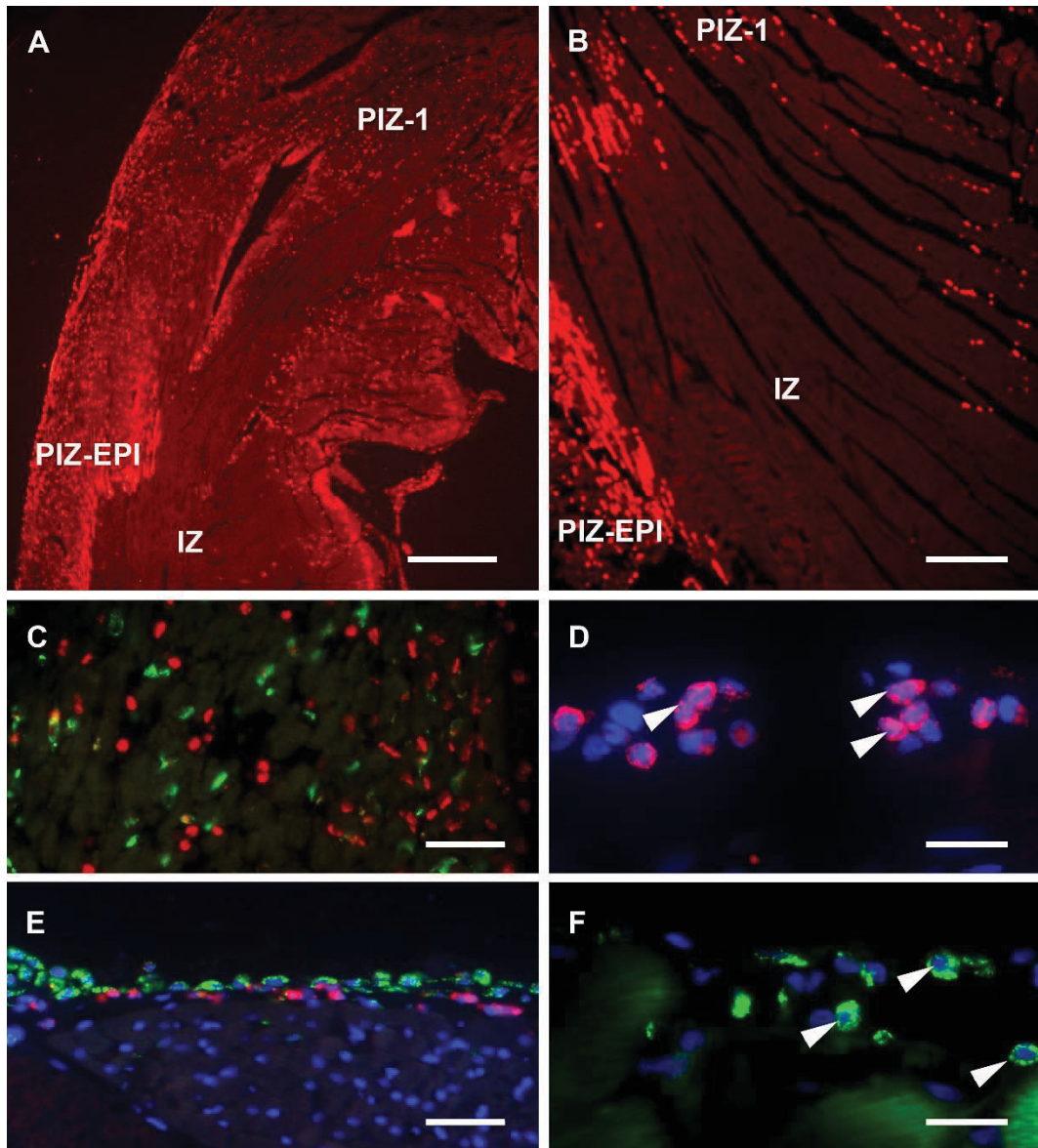
Median, interval pouzdanosti i interkvartilni raspon MPO i CD68 pozitivnih stanica su izračunati i uspoređeni za svih 6 eksperimentalnih skupina. Statistička analiza je napravljena uz pomoć MedCalc softvera (Ostend, Belgija). Distribucija podataka je utvrđena Kolmogorov-Smirinovima testom. Za uspoređivanje podataka između skupina korišten je Mann-Whitney test. Statistička značajnost je postavljena na  $<0.05$ . Postotni i omjerni izrazi su korišteni da bismo prikazali deskriptivne podatke i usporedili ih sa literaturom.

#### 4. REZULTATI

Reprezentativni uzorci iz svake od istraživanih skupina su tretirani bojanjem po Malloryju i H&E bojanjem. IM je histološki detektiran i ograničen kao područje karakterizirano potpunim odsutstvom crvenih krvnih stanica (Slika 3C) u anatomskom području irigacije LAD (prednji dio lijevog ventrikula). Peri-infaktna zona je pak prikazana kao područje koje obiluje upalnim infiltratom i hiperemijom (Slika 3C). Uzorci životinja koje nisu imale infarkt nisu sadržavali karakteristične morfološke promjene.

Infarcirano područje imalo je transmuralni karakter i nalazilo se najvećim dijelom u području prednjeg segmenta lijeve klijetke. Kolokalizacija MPO i CD68 sa DAPI bojanjem dovela je do zaključka da se MPO nalazio uglavnom u citoplazmatskim granulama staničnih profila veličine 8-25  $\mu\text{m}$  sa segmentiranim jezgrama (Slika 4D). CD68 je pak bio prisutan i na površini stanica, kao i u citoplazmi staničnih profila sa nesegmentiranim jezgrama (Slika 4F). Nije pronađena značajna kolokalizacija MPO/CD68 (Slika 4E).





**Slika 4.** **A i B** prikazan je MPO izražaj na presjecima srca u transmuralnom infarciranom području (IZ) prednjeg zida lijeve klijetke, te u peri-infarktnom području (PIZ-EPI i PIZ-1). **C** MPO (crvena florescencija) and CD68-izražaj (zelena florescencija) u peri-infarktnoj zoni gdje se vidi da nema kolokalizacije signala. **D** MPO-pozitivne stanice u citoplazmi polimorfonuklearnih profila stanica (označeno bijelim strelicama). **E** prsten stanica imunoreaktivnih na MPO i CD 68 uočen u subepikardijalnom području. **F** CD68- pozitivne stanice u citoplazmi mononuklearnih profila stanica (označeno bijelim strelicama). Mjerilo: **A** = 0.5 mm, **B** = 200  $\mu$ m, **C** = 75  $\mu$ m, **D&F** = 20  $\mu$ m, **E** = 50  $\mu$ m

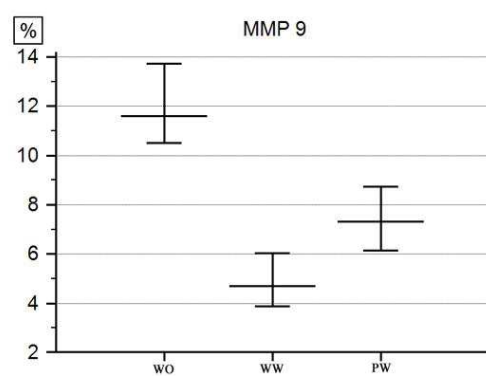
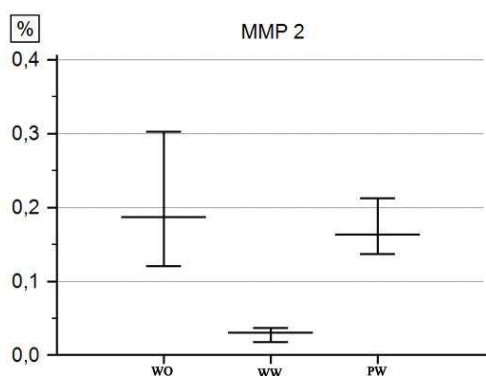
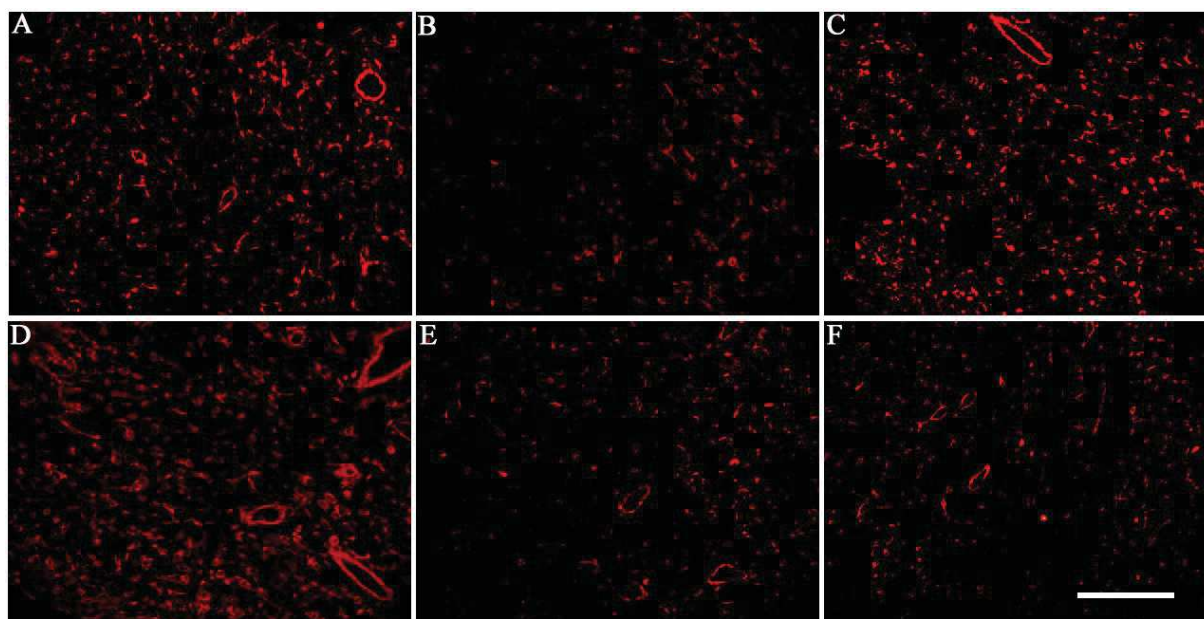
#### 4.1. MMP-2 i MMP-9

Ukupni izražaj MMP-2 i MMP-9 u tkivu je uspoređen između ispitivanih skupina pomoću analize tri reprezentativne zone u svakom uzorku (infarkt/ ishemijska zona, peri-infarktne zone i kontrolna/ neishemijska zona). Kada je analizirana gustoća MMP-2 izražaja, uočen je slab signal i da nema razlike između eksperimentalnih skupina ni u zoni infarkta ni u kontrolnoj (neishemijskoj) zoni. Nadalje, nije pronađena statistička razlika u izražaju markera ni između reprezentativnih zona unutar svakog uzorka, odnosno nije bilo razlike između ekspresije MMP-2 u infarktnoj i kontrolnoj zoni (Tablica 1) unutar pojedine skupine. Kada su pak uspoređene peri-infarktne zone (Slika 5), pronađena je statistički značajna razlika između eksperimentalnih skupina. Prisutna je jaka atenuacija signala kod životinja koje su pile standardnu graševinu ( $p < 0.001$ ) (Slika 5B i E). S vinom povezana atenuacija (**WRA** eng. **Wine Related Attenuation**) je akronim posebno osmišljen kako bi se jače istaknulo najvažnije otkriće: smanjenje upale povezano sa umjerenom konzumacijom bijelog vina. WRA je izražen u postocima kako bi se moglo usporediti smanjenje izražaja markera (postotni pad) između tri reprezentativne zone, te izražaj različitih markera i model permanetne okluzije sa modelom ishemije-reperfuzije u literaturi. Primjećen je WRA/postotni pad izražaja signala od 89% kod životinja koje su pile standardnu Graševinu u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 1) za marker MMP-2. Taj fenomen nije primjećen kod skupine životinja koje su pile maceriranu Graševinu (Tablica 1, Slika 5).

Izražaj MMP-9 imunoreaktivnosti je u oba eksperimentalna modela bio najniži u zoni infarkta (u usporedbi sa drugim reprezentativnim zonama) ali značajno slabiji u WW grupi ( $p < 0.01$ ), (Tablica 1). Isti je uzorak signala primijećen u kontrolnoj zoni. Uspoređujući zone unutar skupina, primijećen je značajan porast izražaja gustoće signala u peri-infarktnoj zoni u usporedbi sa neishemijskom zonom, s tim da je atenuacija signala bila značajno intenzivnija u WW grupi ( $p < 0.001$ ). Kod ovog markera, uočena je i atenuacija signala kod životinja koje su pile maceriranu Graševinu u odnosu na životinje koje su konzumirale vodu ( $p < 0.005$ ), no još uvijek statistički značajno manja nego kod životinja koje su konzumirale standardnu Graševinu ( $0 < 0.04$ ). WRA, odnosno postotni pad u ekspresiji MMP-9 uočen je u sve tri ispitivane zone. U zoni infarkta je iznosio 80% u vinskih skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u neishemijskoj zoni i peri-infarktnoj zoni iznosio 72% i 63% za WW grupu. Ovaj fenomen nije uočen u neishemijskoj zoni životinja iz PW skupine, dok je za peri-infarktne zone iznosio 31% (Tablica 1).

Nije pronađena značajna razlika u izražaju markera između sham životina i životinja sa infarktom, bez obzira jesu li pile vino i vodu ili samo vodu za MMP-2 ( $p=0.24$ ) i MMP-9 ( $p=0.61$ ).

Konačno, kada je uspoređen izražaj MMP-2 i MMP-9 u uzorcima istih životinja, primijećen je značajno slabiji intenzitet signala MMP-2 u svim ispitivanim skupinama, no razlika je bila tri puta jača kod životinja koje su pile bijelo vino, bez obzira na sadržaj fenola (Tablica 1).



### Slika 5. Prikaz izražaja signala za markere MMP-2 i MMP-9

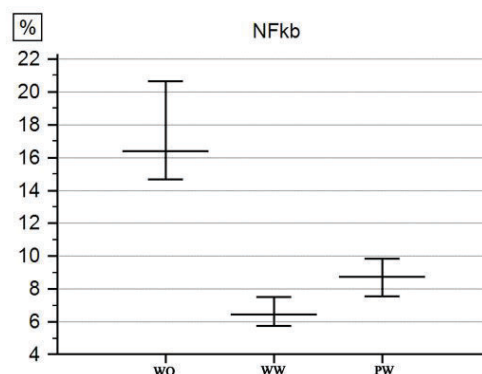
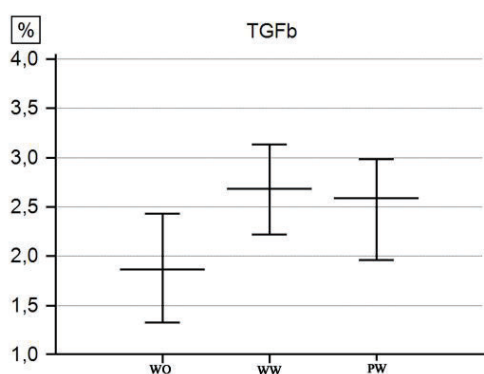
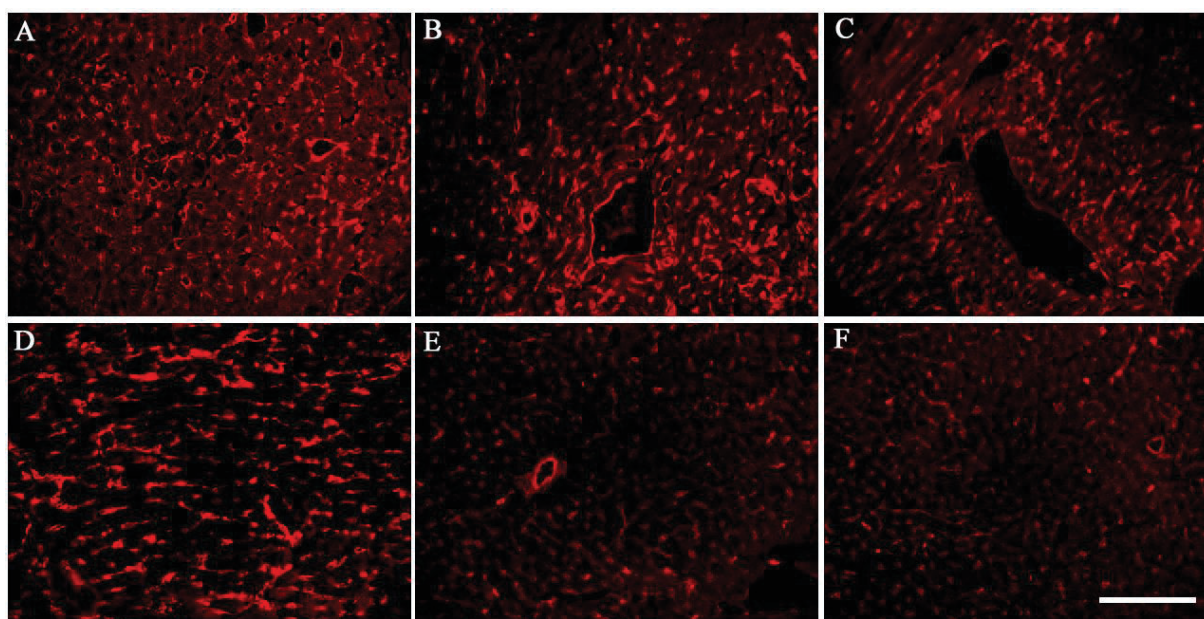
A izražaj MMP-2 signala u peri-infarktnoj zoni WO skupine životinja. B izražaj MMP-2 signala u peri-infarktnoj zoni WW skupine životinja. C izražaj MMP-2 signala u peri-infarktnoj zoni PW skupine životinja. D izražaj MMP-9 signala u peri-infarktnoj zoni WO skupine životinja. E izražaj MMP-9 signala u peri-infarktnoj zoni WW skupine životinja. F izražaj MMP-9 signala u peri-infarktnoj zoni PW skupine životinja. Vidi se atenuacija signala u peri-infarktnoj zoni životinja koje su pile standardno bijelo vino (WW) za oba markera, dok je kod životinja koje su pile macerirano vino (PW) signal MMP-9 markera atenuiran, dok za MMP-2 nema razlike u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Na dnu slike su dijagrami koji ilustriraju atenuacijski utjecaj vina na gustoću signala MMP-2 i MMP-9 markera. Sve slike su fotografirane u istom povećanju, mjerilo = 100  $\mu\text{m}$

## 4.2. NF- $\kappa$ B i TGF- $\beta$ 1

Primijećen je značajan porast gustoće signala u peri-infarktnoj kod svih ispitivanih skupina, no ipak sa značajno manjim intenzitetom u grupi životinja koje su pile vino. WRA/postotni pad nije primijećen kod NF- $\kappa$ B izražaja u zoni infarkta, no u kontrolnom neinfarciranom miokardu i peri-infarktnoj zoni životinja koje su pile standardnu Graševinu bio značajno promjenjen ( $p < 0.001$ ) i iznosio 46% u kontrolnoj zoni, odnosno 64% u peri-infarktnoj zoni (Tablica 1, Slika 6E i F). Kod usporedbe PW i WO skupine nije nađena statistički značajna razlika u neishemijskoj zoni, iako je bio prisutan trend (Tablica 1). Postotni pad izražaja signala iznosio je 55% ( $p < 0.001$ ) u peri-infarktnoj zoni PW skupine (Tablica 1), u usporedbi sa WO skupinom životinja. WRA/postotni pad izračunat u peri-infarktним zonama WW skupine za markere MMP-9 i NF- $\kappa$ B je bio gotovo identičan i iznosi 63% odnosno 64% ukupne gustoće signala izmjerene u peri-infarktnoj skupini životinja koje su pile vodu. Zanimljivo, izražaj NF- $\kappa$ B je bio značajno slabiji u sham uzorcima ( $P = 0.01$ ) uspoređujući sa kontrolnim uzorcima, ali nije bilo razlike kada smo ih usporedili sa životinjama koje su pile vino ( $p = 0.47$ ).

Konačno, gustoća izražaja signala TGF- $\beta$ 1 antiupalnog markera je uspoređena između pokusnih skupina kroz analizu tri reprezentativne zone i nije nađena statistički značajna razlika niti jednog od ispitivanih parametara (Tablica 1). TGF- $\beta$ 1 imunoreaktivnost u peri-infarktnoj zoni je bila statistički značajno jača nego u ostale dvije ispitivane zone bez obzira o kojoj se eksperimentalnoj grupi radi, no WRA/postotni pad iako uočljiv, nije bio statistički značajan ni za standardnu Graševinu ( $p = 0.79$ ), ni za maceriranu Graševinu ( $p = 0.53$ ), (Tablica 1, Slika 6). Nije pronađena značajna razlika u izražaju markera između sham životinja i životinja sa infarktom za marker TGF- $\beta$ 1 ( $p = 0.4$ ).





### Slika 6. Prikaz izražaja signala za markere TGF- $\beta$ 1 i NF-Kb

A izražaj TGF-  $\beta$ 1 signala u peri-infarktnoj zoni WO skupine životinja. B izražaj TGF-  $\beta$ 1 signala u peri-infarktnoj zoni WW skupine životinja. C izražaj TGF-  $\beta$ 1 signala u peri-infarktnoj zoni PW skupine životinja. D izražaj NF- $\kappa$ B signala u peri-infarktnoj zoni WO skupine životinja. E izražaj NF- $\kappa$ B signala u peri-infarktnoj zoni WW skupine životinja. F izražaj NF- $\kappa$ B signala u per-iinfarktnoj zoni PW skupine životinja. Nema razlike u izražaju TGF- $\beta$ 1 u peri-infarktnoj zoni životinja koje su pile vino (WW i PW) u odnosu na WO grupu. Vidi se atenuacija NF- $\kappa$ B signala u peri-infarktnoj zoni životinja koje su pile vino, bez obzira na ukupni sadržaj fenola. Na dnu slike su dijagrami koji ilustriraju atenuacijski utjecaj vina na gustoću signala NF- $\kappa$ B signala, dok za TGF- $\beta$ 1 marker nema razlike među eksperimentalnim skupinama. Sve slike su fotografirane u istom mjerilu: 100  $\mu$ m.

<i>SKUPINA/ MARKER</i>	<i>Zona infarkta</i>			<i>Kontrolna zona (interventrikularni septum)</i>			<i>Peri-infarktina zona</i>		
	WO	WW	PW	WO	WW	PW	WO	WW	PW
<i>MMP-2</i>	0.01 (0.008)	0.01 (0.017)	0.01 (0.010)	0.01 (0.011)	0.009 (0.011)	0.01 (0.016)	0.29 (0.252)	0.03 (0.040)	0.30 (0.322)
<i>MMP-9</i>	0.05 (0.054)	0.01 (0.007)	0.01 (0.001)	0.43 (0.385)	0.12 (0.068)	0.63 (0.383)	13.08 (4.163)	4.88 (1.825)	8.97 (6.413)
<i>NF-κb</i>	0.02 (0.030)	0.05 (0.059)	0.049 (0.031)	1.66 (1.262)	0.89 (0.535)	1,50 (0.837)	19.15 (7.419)	6.81 (2.458)	8.59 (3.057)
<i>TGF-β1</i>	1.41 (1.194)	1.14 (0.674)	1.06 (0.643)	1.43 (0.709)	1.14 (0.663)	1.11 (0.675)	2.59 (2.192)	2.48 (1.104)	2.66 (1.408)

**Tablica 1.** Srednja gustoća izražaja signal u postocima (+- St.dev) izračunata je za markere MMP-2, MMP-9, NF-κB i TGF-β1 u 3 reprezentativne zone srčanog tkiva životinja koje su pile vodu (WO), standardno bijelo vino ( WW) i macerirano bijelo vino (PW). Crvenom bojom je označen postotni pad u izražaju signala u pojedinim reprezentativnim zonama kod životinja koje su pile vino u odnosu na životinje koje su pile vodu.

### 4.3. MPO i CD68

Kada je analizirana prisutnost MPO i CD68 pozitivnih stanica u kontrolnoj zoni (CZ), primijećeno je da je gustoća pozitivnih stanica jako niska (Tablica 2), te da nije bilo razlike u broju stanica pozitivnih na CD68 između skupina koje su imale infarkt od onih koje ga nisu imale ( $p=0.56$ ). Razlika je uočena u većem broju stanica pozitivnih na MPO u skupinama koje su imale infarkt ( $p<0.001$ ). U subepikardijalnoj zoni izražaj oba ispitivana markera je bio statistički značajno veći u skupinama koje su male infarkt. Uočeno je blizu 6 puta više pozitivnih stanica na MPO i 3 puta na CD68. Usporedbom istih markera u subepikardijalnoj zoni sham životinja primijećen je značajno manji broj pozitivnih stanica na MPO u sham grupi koja je pila bijelo vino ( $p<0.001$ ). Nije bilo značajne razlike u broju pozitivnih stanica na CD68 ( $p=0.9560$ ).

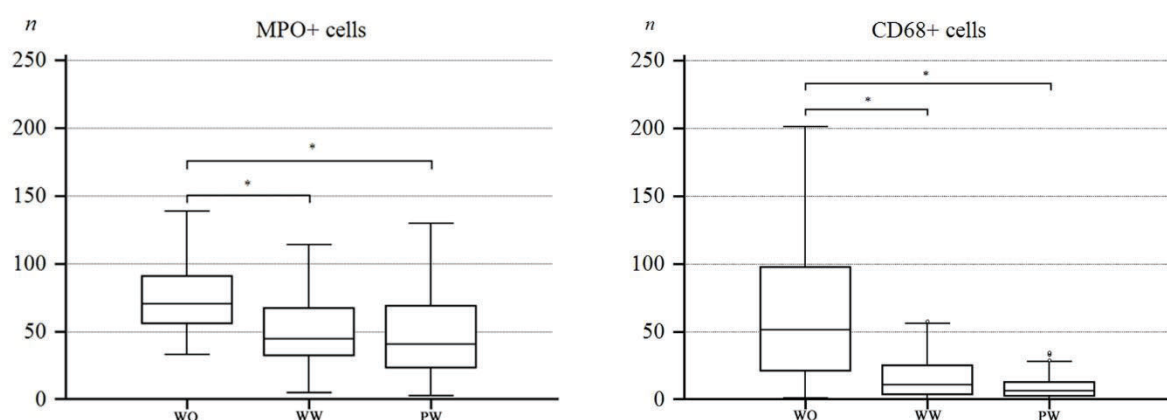
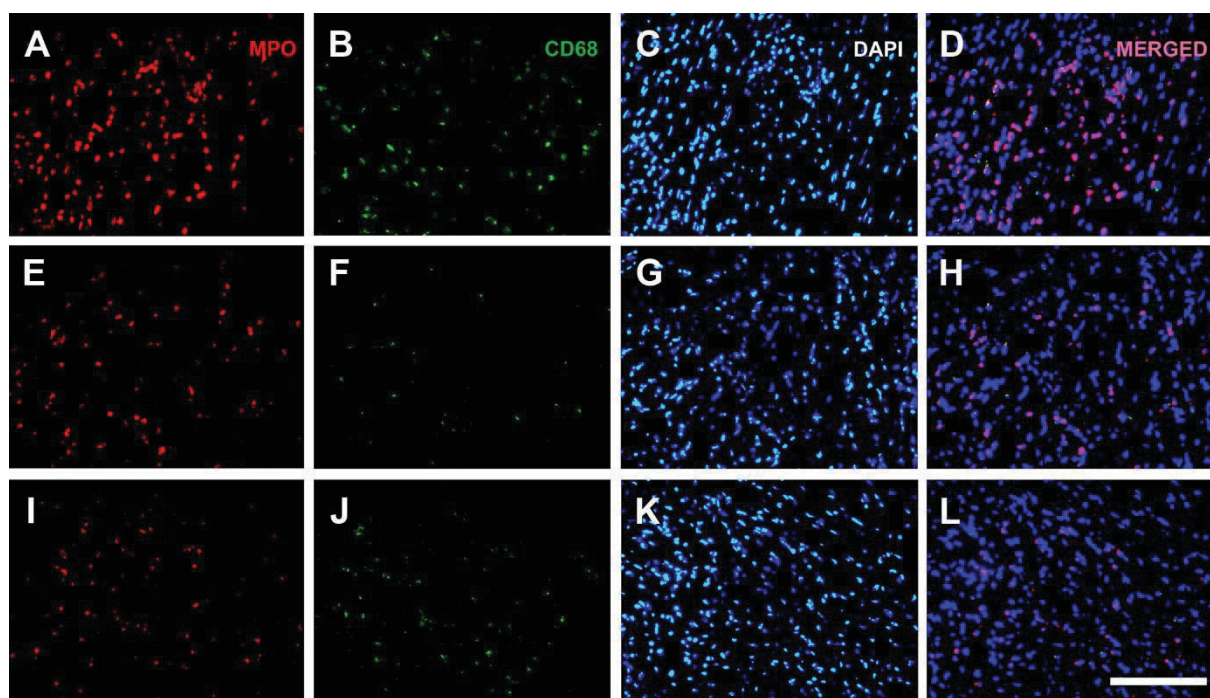
Izračunati su i uspoređeni medijani i interkvartilni rasponi broja pozitivnih stanica na MPO CD68 među istraživanim skupinama (Tablica 2, Slika 7). Nije pronađena značajna razlika ni u zoni infarkta ni u kontrolnoj zoni. No, usporedbom izražaja MPO i CD68 u peri-infarktne zone (Slika 7), utvrđeno je da je MPO izražaj jači i prisutniji u svim analiziranim slučajevima, pogotovo u subepikardijalnom području. Izražaj MPO je varirao u različitim peri-infarktne zone unutar svake od eksperimentalnih skupina. Najveća gustoća infiltrata je pronađena u subepikardijalnoj zoni (Tablica 2). Kada se izražaj MPO usporedio za svaku ispitivanu zonu među eksperimentalnim skupinama, pronašli smo sljedeće: nije bilo razlike u izražaju MPO markera između životinja koje su pile Graševinu (WW) i životinja koje su pile maceriranu Graševinu (PW) ( $p=0.3808$  za PIZ 1 & 2,  $p=0.6761$  za PIZ-EPI), no pronađeno je statistički značajno manje MPO pozitivnih stanica u obje skupine koje su pile vino (WW i PW) u odnosu na životinje koje su pile vodu WO ( $p<0.001$ ). Primijećen je statistički značajan postotni pad (WRA) broja MPO pozitivnih stanica u PIZ 1&2 zonama za WW grupu (37%), odnosno 42 % za PW grupu uspoređujući ih sa WO skupinom životinja (Tablica 2). U PIZ-EPI zonama postotni pad je iznosio 49% za WW, odnosno 46% za PW.

Kada je uspoređen broj CD68 pozitivnih stanica među zonama u ispitivanim skupinama, pronađeni su slične trendove kao za MPO marker. Najgušći infiltrat je bio u PIZ 1&2 zonama. No, uspoređujući ukupni izražaj CD68 i MPO, uočeno je da je ukupni prosječni broj CD68 pozitivnih stanica bio četiri puta manji od MPO pozitivnih. Također, uspoređujući peri-infarktne zone između skupina životinja koje su konzumirale vino (Slika 7), nađen je manji broj CD68 pozitivnih stanica u peri-infarktne zone životinja koje su pile maceriranu Graševinu (PW) ali bez statistički značajne razlike (za PIZ 1&2  $p=0.0624$ . za PIZ-EPI  $p=0.1201$ ). Bilo je



i značajno manje CD68 pozitivnih stanica u peri-infarktним zonama vinskih skupina kada su uspoređene sa skupinom životinja koje su pile vodu ( $p < 0.001$ ). WRA/ postotni pad u peri-infarktним zonama je bio prisutan i iznosi 79% (WW), odnosno 86% (PW) u PIZ 1 & 2 zoni, te 29% (WW), odnosno 51% (PW) u PIZ-EPI zoni (Tablica 2).

“Prsten” građen od nekoliko slojeva stanica, imunoreaktivnih na MPO i CD68 je primijećen u subepikardijalnom području svih eksperimentalnih skupina, osim u kontrolnoj neinfarciranoj grupi (Slika 4E).



**Slika 7.** **A** MPO-imunoreaktivnost, **B** CD-68 imunoreaktivnost, **C** DAPI bojanje jezgara, **D** preklopljene fotografije istih presjeka za WO skupinu životinja. **E** MPO-imunoreaktivnost, **F** CD-68 imunoreaktivnost, **G** DAPI bojanje jezgara, i **H** preklopljene fotografije istih presjeka za WW skupinu životinja. **I** MPO-imunoreaktivnost **J** CD-68 imunoreaktivnost, **K** DAPI bojanje jezgara i **L** preklopljene fotografije istih presjeka za PW skupinu životinja. Grafovi koji prikazuju razlike među eksperimentalnim skupinama za broj MPO i CD68 pozitivnih stanica u peri-infarktним zonama. Mjerilo = 20  $\mu$ m.

<i>MARKER</i>	<i>MPO</i>			<i>CD68</i>		
	<i>WO</i> (n=9)	<i>WW</i> (n=8)	<i>PW</i> (n=9)	<i>WO</i> (n=9)	<i>WW</i> (n=8)	<i>PW</i> (n=9)
<i>EKSPERIMENTALNA SKUPINA</i>						
<i>Peri-infarktna zona (PIZ 1 &amp; 2)</i>	71 (62-82.8)	45 (32.5-67.5) <b>37%</b>	41 (23.5-69) <b>42%</b>	51.5 (21.5-98)	11 (4-25) <b>79%</b>	7 (3-13) <b>87%</b>
<i>Peri-infarktna zona (PIZ-EPI)</i>	105.5 (56.5-141-5)	54 (42.5-65.5) <b>49%</b>	57 (33.5-89) <b>46%</b>	45.5 (34.97-56.34)	32.5 (21-44) <b>29%</b>	22.5 (11.5-39.5) <b>51%</b>
<i>Zona infarkta (IZ)</i>	2.5 (1-6)	2.5 (0.5-6.5)	1 (0-4)	1 (0-3)	0 (0-2)	1 (0-2)
<i>Kontrola neinfarcirana zona (CZ)</i>	0 (0-1.5)	1 (0-2.5)	2 (0-8.5)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-2)

**Tablica 2. Izražaj broja MPO i CD68 pozitivnih stanica prema eksperimentalnim skupinama u reprezentativnim zonama**

Medijan i interkvartilni raspon MPO i CD68 pozitivnih stanica je izračunat za životinje koje su pile vodu (WO), standardno vino (WW) i macerirano vino (PW) i imale akutni infarkt miokarda. Postoci označeni crvenom bojom predstavljaju WRA/postotni pad u broju pozitivnih stanica u vinskim skupinama (WW i PW) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (WO).

## 5. RASPRAVA

Da bismo što optimalnije procijenili utjecaj umjerene konzumacije bijelog vina na cijeljenje infarkta srca, usredotočili smo se na imunohistokemijsku analizu 4 upalna biljega u posebno odabranim reprezentativnim zonama životinja koje su konzumirale bijelo vino i macerirano bijelo vino u odnosu na životinje koje su pile vodu. Također smo, koristeći isti model, istražili utjecaj umjerene konzumacije vina na osobitosti upalnog infiltrata 24 sata nakon infarkta srca u štakora kvantificirajući izražaj dvije ključne subpopulacije leukocita (neutrofile i monocite/makrofage). Model trajne okluzije prednje silazne grane lijeve koronarne arterije (lat. LAD) je izabran za provedbu studije jer ishemijsko-reperfuzijski model ima nekoliko nedostataka. Permanetna okluzija bolje imitira većinu kliničkih situacija gdje u većini slučajeva ipak ne dolazi do rekanalizacije okludirane krvne žile. Također, modelom permanentne okluzije ostvarujemo uvjete za razvoj boljeg pato-anatomskog supstrata, sa razvojem područja peri-infarktne zone i masivnom ekstravazacijom i hiperemijom uključujući i migraciju velikog broja upalnih medijatora u to područje. Modelom permanentne ligacije postiže se i veći infarkt što ima za posljedicu vizualizacije šireg prozora u detekciji i kvantifikaciji eventualnih značajnih poboljšanja (142). U literaturi je dokumentirano kako modelom permanentne ligacije izazivamo neposrednu i jasno detektabilnu invaziju neutrofila (142), te potom i makrofaga (143), sa naglaskom na vremensku dimenziju influksa, što nije slučaj kod ishemijsko-reperfuzijskog modela. Kod ishemijsko-reperzijskog modela imamo pak simultani influx neutrofila i makrofaga, koji nema jasnu temporalnu dimenziju (143). Nije pronađena razlika u izražaju upalnih biljega između „sham“ i eksperimentalnih životinja u područjima tkiva koja nisu zahvaćena infarktnom kod ispitivanja upalnih markera, te je tim postupkom je utvrđen „baseline“ odnosno polazna razina izražaja istih. Obzirom na limitiranosti i ozbiljne nedostatke u procjeni točne veličine infarkta u ranom stadiju cijeljenja i upitnu vrijednost te informacije obzirom na patofiziologiju cijeljenja, usredotočili smo se na mikroskopsku analizu peri-infarktne zone gdje dolazi do najdramatičnijih promjena, pretpostavljajući da će i mala odstupanja biti mjerljiva, što se u našem slučaju na kraju i ispostavilo točnim.

## 5.1. Upalni marker

### 5.1.1. MMP

U literaturi je dokumentirano da akutni izražaj i produljena aktivnost metaloproteinaza je više izražena na modelu permanentne okluzije; unutar prvih 24 sata od inicijalnog događaja izražaj MMP-9 poraste 100 puta, dok na ishemijsko-reperfuzijskom modelu taj porast iznosi oko 55% (144). Izgleda da do značajnog povišenja ekspresije obje istražene metaloproteinaze (naročito MMP-9) dolazi zbog utjecaja infiltrirajućih neutrofila (145), te je široko prihvaćeno mišljenje da permanentna okluzija rezultira vremenski orkestriranim priljevom neutrofila pa potom makrofaga. Reperfuzija se pak odlikuje simultanim priljevom neutrofila i makrofaga, što izravno utječe na vremensku odrednicu upalnog procesa. Mi smo uvjerenja da nagli porast obje metaloproteinaze, posebice MMP-9 u peri-infarktnoj zoni je najvjerojatnije povezan na priljevom neutrofila. Ipak, imajući na umu da su do sada opisani brojna potencijalna izvorišta MMP, kako unutarstanična tako i izvanstanična (75), gledajući sa fiziološko-funkcionalnog gledišta, korisnije je imati informaciju o ukupnosti izražaja pojedinog biljega nego precizno detektirati njegov izvor. U našem slučaju, polazna razina izražaja (izmjereno u neishemijskom/ kontrolnom području) je mnogo niža za MMP-2 i pokazuje WRA/ postotni pad samo u peri-infarktnoj zoni i to za standardno bijelo vino, dok kod maceriranog vina ne vidimo taj učinak. MMP-9 izražaj pak pokazuje snažan WRA efekt u svim reprezentativnim zonama, a posebice u peri-infarktnoj zoni i uočava se i kod standardne i kod macerirane Graševine. Izražaj MMP-9 signala je 30 puta veći u skupini životinja koje su pile vodu, odnosno 40 puta koje su pile vino u peri-infarktnoj zoni kada je usporedimo sa neishemijskom/ kontrolnom zonom. Usporedbom peri-infarktne zona između životinjskih modela utvrđena je smanjena ukupna izražaj MMP-9 u grupi životinja koje su pile vino i iznosi 63% signala detektiranog u uzorcima životinja koje su pile vodu za standardno, odnosno 31% za macerirano bijelo vino. To nam sugerira da razina polifenola u vinu nije ključna u atenuaciji MMP-9 signala. Također, u usporedbi sa literaturom, to smanjenje intenziteta signala je usporedivo, čak i jače kod standardne Graševine, u odnosu na ono koje donosi sami ishemijsko-reperfuzijski model (45% od polazne razine (144)), pa možemo zaključiti kako vino smanjuje izražaj MMP-9 u tkivu ispitivanih životinja jače nego što bi se postiglo reperfuzijskom strategijom.

Kelly i suradnici (146) su postavili hipotezu da MMP-9 može imati i korisne i štetne učinke i uloge nakon infarkta. Otkrili su da rano povišenje MMP-2 je povezano sa većim brojem neutrofila sugerirajući da MMP-9 oslobođene iz neutrofila imaju štetan učinak. Suprotno tome, kasnije povišenje MMP-9 je povezano sa očuvanjem funkcije lijevog ventrikula, što implicira potencijalno pozitivan učinak MMP-9 u kasnijoj fazi cijeljenja. Iz toga razloga je jako bitno poznavati vremenski profil MMP-9. U našoj studiji je primijećen slabiji izražaj MMP-2 od MMP-9 gustoće signala u svakoj od ispitivanih zona, što sugerira jako bitnu vremensku dimenziju u varijaciji izražaja ova dva biljega. MMP-9 izražaj signala je značajno jači nego MMP-2, sugerirajući da se aktivacija ovog biljega događa ranije u upalnoj kaskadi. To je u skladu sa dosadašnjim saznanjima iz literature u kojima je pokazano da se od prvog do četvrtog dana nakon infarkta dogodi veliki i brz porast MMP-9 aktivnosti u infarktnoj i peri-infarktnoj zoni, što odgovara vremenu pojavljivanja neutrofila i makrofaga u tom području (147), dok MMP-2 pokazuje tendenciju aktivacije nekoliko dana nakon inicijalnog događaja (9). Na primjer, Etoh i suradnici (148) su mjerili aktivaciju MMP na svinjskom modelu permanentne ligacije lijeve koronarne arterije *in vivo* i *in vitro* u infarciranom i neinfarciranom području. Mjerili su nakon 10 minuta, zatim 1, 2 i 3 sata nakon okluzije. Pronašli su povećanje aktivnosti MMP-9 već deset minuta nakon intervencije, a do značajnog povećanja je došlo nakon jednog sata. Romanic i suradnici (149) su došli do saznanja da permanentna okluzija prednje interventrikularne grane lijeve koronarne arterije dovodi do povećanih vrijednosti MMP-9 u tkivu. Povišenu aktivnost MMP-9 su detektirali unutar 24 sata od infarkta sa maksimalnim vrijednostima na kraju drugog dana. U tom trenutku, MMP-9 su detektirane u monocitima. Li i suradnici (75) su istražili aktivnost MMP-9 i MMP-2 svinjskom modelu ishemije/reperfuzije (90-90 min) i uočili da se MMP-9 pojavljuje već deset minuta nakon reperfuzije i ostaje stalno povišen dok je postotak latentnog MMP-2 u ishemijskoj zoni i u kontrolnoj zoni u odnosu na aktivirani oblik iznosio 95%, što implicira da u ovom pokusu više od 95% MMP-2 je ostalo u latentnom obliku i nije se aktiviralo. Herzog i suradnici (150) su na štakorskom modelu infarkta srca istražili vremensku ekspresiju matriks metaloproteinaza nakon 30 minuta, 1 sat, 2 sata, 4 sata i 24 sata. 30 minuta nakon ligacije nije bilo statistički značajnog povećanja aktivnosti u odnosu na sham životinje, dok je 1 sat nakon detektirana prisutnost MMP-2, a nakon 2 sata i MMP-9, i to prvo u peri-infarktnoj zoni. Nakon 4 sata došlo je do laganog pada u vrijednosti obje metaloproteinaze, da bi nakon 24 sata bila najveća razina, i to u peri-infarktnoj zoni kao i u neinfarciranom tkivu. Koncentracija MMP-9 bila je značajno viša od koncentracije MMP-2 nakon 24 sata (150) Tao i suradnici su napravili sličan pokus na mišjem modelu, ali su ispitali različit vremenski okvir (1, 2, 4, 7, 14



dana). Rezultati su pokazali povišenje MMP-9 nakon jednog dana i maksimum drugog dana nakon čega joj je koncentracija postupno opadala, dok se MMP-2 povisila tek 4. dana, dosegla maksimum sedmog dana i ostala povišena do 14 dana (147).

Inhibicija MMP-aza je široko istraživana na životinjskim modelima u zadnjih dvadeset godina jer se smatra da visoke razine MMP-9 igraju jako veliku ulogu u progresiji zatajenja srca kod dekompenziranih pacijenata u ranom stadiju akutnog infarkta (151). Znamo da MMP mogu stvarati domicilne stanice (uglavnom kardiomiociti i fibroblasti) i sumnja se da je upravo to način regulacije pregradnje izvanstanične tvari u fiziološkim uvjetima. No, kada dođe do infiltracije infarkta upalnim stanicama, tada i one stvaraju MMP te dolazi do njihovog stvaranja u suvišku. To je jako važno zato što višak MMP-a koji na taj način nastane iz upalnih stanica bi mogao imati štetan utjecaj na upalni proces, te možda poremetiti cijeljenje i povećati opasnost od ruptur srca. Dvije glavne vrste endogenih inhibitora MMP-a su  $\alpha 2$ -makroglobulin (protein plazme koji ima svojstva generalne inhibicije proteaza) i tkivni inhibitori MMP-a (TIMP-ovi). Do sada su identificirana 4 TIMP-a, a svi stvaraju komplekse sa aktiviranim MMP-azama i blokiraju katalitičku domenu (152). Jako bitna strukturna osobina nekog MMP inhibitora bi bila mogućnost keliranja cinka. Nekoliko je selektivnih MMP-9 inhibitora testirano na eksperimentalnim modelima ishemijske bolesti i nekim drugim kardiovaskularnim bolestima. Na primjer, selektivni MMP-9 inhibitor SB-3CT poboljšava ishod nakon embolijskog moždanog udara (153). Zatim salvianolična kiselina, kompetitivni inhibitor MMP-9 usporava proces dilatacije lijevog ventrikula kod hipertenzivnih štakora (154). Farmakološka inhibicija MMP se pokazala korisnom u smanjenju tkivne ozljede nakon infarkta na životinjskim modelima. Nekoliko studija u literaturi (155-157) pokazuju pozitivan učinak prekondicioniranja neselektivnim MMP inhibitorima na ishemijsku ozljedu srca koristeći *in vivo* animalne modele te procjenjujući mortalitet, veličinu infarkta, dilataciju lijevog ventrikula i funkciju srca. Npr, Villareal i suradnici su otkrili da doksiciklin smanjuje nepovoljne ishode ventrikulskog remodeliranja i popravljiva funkciju lijevog ventrikula kod muških Sprague- Dawley štakora (157). Još su neke studije na životinjama pokazale da doksiciklin suprimira MMP-2 i MMP-9 nakon infarkta te da smanjuje fibrozu i poboljšava cijeljenje ishemijske ozljede i funkciju srca (158). Od 4 objavljena klinička pokusa u kojima je testirana efikasnost doksiciklina u ishemijskoj bolesti srca, samo je u jednom pokusu pronađen zadovoljavajući pozitivan učinak u prevenciji nepovoljnih kliničkih ishoda kod pacijenata koji su preživjeli srčani udar (159). Ostale studije su ili imale problema sa interpretacijom zbog metodoloških problema (160), ili nisu imale dovoljnu snagu i uporišta za kliničku primjenu (161), ili nije nađeno korisnog terapijskog učinka (162).

Mnogi lijekovi koji se rutinski koriste u kliničkoj praksi imaju direktni i indirektni učinak na aktivnost i stvaranje MMP-9. Plazmatske koncentracije MMP-9 povišuju neki trombolitici i antikoagulansi, kao i neki široko propisivani lijekovi za razne indikacije (ACE inhibitori, antagonisti aldosterona, beta blokatori i statini), (163, 164). Potencijal kliničke vrijednosti ovog istraživanja su saželi Hughes i suradnici (25) analizirajući 37 prekliničkih studija na raznim životinjskim modelima u kojima se procjenjivala korisnost MMP inhibicije u cijeljenju ishemijske ozljede srca. Zaključak ovih autora je da generalno MMP inhibitori imaju protektivan učinak na remodeliranje lijeve klijetke. Međutim, samo jedan nespecifični MMP inhibitor do sada, doxycycline (Periostat) je odobren od FDA (26), što ipak svjedoči o zasad malom translacijskom uspjehu. Zaključno, zbog kompleksnih interakcija i različitih funkcija MMP-aza, selektivna inhibicija zasad ne garantira bolje rezultate, a može djelovati i štetno ovisno o tome kada je apliciran inhibitor, koliko je dugo uključen i koliku inhibiciju postiže. MMP inhibicija kod ljudi se nije pokazala uspješnom jer je široki spektar MMP-inhibitora pokazao štetne sekundarne učinke primarno na muskuloskeletni sustav, koje su bile povezana sa neselektivnom prirodom tih inhibitora (165, 166). Ipak, inhibicija MMP-9 u ranoj akutnoj fazi ishemijske bolesti bi mogla djelovati protektivno i povoljno na ishod cijeljenja, ali kasnija inhibicija MMP-9 vjerojatno pogoršava ishod i dovodi do brže progresije srčanog zatajenja (87). Bolje razumijevanje razgradnje izvanstaničnog matriksa i MMP-9 aktivnosti mogu pružiti nove mogućnosti u regulaciji upale i smanjenju nepovoljnih ishoda cijeljenja infarkta (167). Za mnoge fenolske komponente vina (168) je dokazano da posjeduju brojne pozitivne učinke na zdravlje, uključujući djelovanje na razgradnju viška kisikovih radikala i sposobnost keliranja metala, kao što su željezo, cink i bakar. Guo i suradnici (169) su pronašli potencijalni blagotvorni učinak crnog vina na kardiovaskularni sustav kroz inhibiciju aktivacije MMP-2 i poboljšanje stupnja ateroskleroze, no bez značajnog pada koncentracije lipida plazme. Autori iz istog laboratorija su pronašli i inhibitorni učinak vina na MMP-2 i MMP-9 u aterosklerotskim plakovima na mišjem „knockout“ modelu (170), dok su Oak i suradnici (171) su otkrili inhibitorni učinak polifenola na MMP-2 u glatkim mišićnim stanicama u kulturi humanih stanica. Scoditti i suradnici (172) su pak otkrili da vino suprimira upalu i angiogenezu u kulturi endotelnih stanica kroz inhibiciju MMP-9. Sve ove navedene studije govore pozitivno i u prilog našoj pretpostavci da vino može smanjiti ekspresiju upalnih markera.



### 5.1.2. NF-κB

Još uvijek nije postignut konačni konsenzus oko ekspresije NF-κB transkripcijskog čimbenika u upalnoj kaskadi, odnosno nisu nepobitno odvojena poželjna od nepoželjnih svojstava same transkripcije. Vjerojatni razlog leži u činjenici da NF-κB obitelj uključuje niz od pet podjedinica čiji izražaj/aktivacija može biti pojedinačno istraživana, odnosno čija funkcija može biti jako različita ovisno o prostornoj i vremenskoj dimenziji, te o citokinskom miljeu. Također, ovaj transkripcijski čimbenik i njegove podjedinice može imati različito podrijetlo (kardiomiociti ili upalne stanice), odnosno ovisiti o modelu nastanka upale (permanentna okluzija/ ishemijsko-reperfuzijski model), što dodatno otežava razumijevanje funkcije ovog čimbenika. Sadašnja saznanja su najbolje opisana u preglednom članku Prabhu i Frangogiannis (2) koji predlažu model po kojem bi p65 podjedinica NF-κB povezana sa kardiomitima imala proupalnu štetnu ulogu za tkivo, dok p50 podjedinica povezana sa leukocitima smanjuje intenzitet upale (2). Naši rezultati su pokazali da izražaj p65 podjedinice pokazuje sličan obrazac kao izražaj MMP-9 biljega; pronađen je WRA/postotni pad u ishemijskoj kontrolnoj zoni (46%). Iako je trend atenuacije u kontrolnoj zoni uočen i za macerirano vino, nije postignuta razina statističke značajnosti. U peri-infarktnoj zoni još je značajniji je pronalazak WRA kod životinja koje su pile vino, 64% za standardno i 55% za macerirano. S obzirom na ovaj rezultat, možemo zaključiti da umjerena konzumacija bijelog vina ima inhibitorni utjecaj na izražaj NF-κB p65 podjedinice, To bi pak moglo pridonijeti boljoj kontroli upalne reakcije i dovesti do boljeg oporavka srca. Naši rezultati potvrđuju već neke prije objavljene zaključke iz prijašnjih studija, iako je većina tih saznanja utvrđena na ishemijsko-reperfuzijskom modelu (173). Osim u upali, dokazana je bitna uloga NF-κB i u patofiziologiji srčane hipertrofije (174) i zatajenja srca (43), kao i pojačana izražaj NF-κB i pro-upalnih citokina u zatajenju srca i induciranoj kardiomiopatiji. Nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede, NF-κB aktivacija pokazuje bifazični obrazac, sa vrhuncem 15 minuta i 3 sata nakon reperfuzije zbog oslobađanja kisikovih radikala i produkcije pro-upalnih citokina (175). U literaturi postoji nekoliko studija koje su pokazale kardioprotektivni učinak NF-κB na akutnu ishemijsku ozljedu. Na primjer, Morishita i suradnici (176) su zaključili da inhibicija NF-κB smanjuje veličinu infarkta na štakorskom modelu, sugerirajući citotoksičnu prirodu aktivacije NF-κB. Smanjenje veličine infarkta uslijed blokade NF-κB je potvrđeno i na mišjem modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede (177). Kawano i suradnici su istraživali ulogu NF-κB u patogenezi razvijanja srčanog zatajenja 12 tjedana nakon infarkta. Dokazali su

aktivnost NF- $\kappa$ B u infarciranom i neinfarciranom tkivu, kao i da ciljana inhibicija p50 podjedinice NF- $\kappa$ B poništava aktivaciju i poboljšava hipertrofiju miocita, intersticijsku fibrozu i srčanu disfunkciju na mišjem modelu. Potvrdili su i pojačanu aktivnost pro-upalnih citokina i kemokina, sugerirajući da bi upala nakon infarkta miokarda mogla biti posredovana NF- $\kappa$ B-ovisnom staničnom signalizacijom. Ovi rezultati potvrđuju mogućnost da bi blokada NF- $\kappa$ B mogla biti terapijska strategija u prevenciji ventrikularnog remodeliranja i srčanog zatajenja nakon srčanog udara. Onai i suradnici (62) su objavili istraživanje u kojem su proučavali učinak NF- $\kappa$ B inhibitora (IMD-0354) u ishemijsko reperfuzijskoj ozljedi na štakorskom modelu infarkta srca. Dali su inhibitor 5 minuta prije reperfuzije (30 minuta okluzija, 24 h reperfuzija). Nakon 28 dana u grupi tretiranoj inhibitorom pronađeno je statistički značajno smanjenje veličine infarkta (oko 60%), ali isto tako i smanjen upalni odgovor i poboljšana ventrikularna funkcija. Autori su zaključili da inhibicija aktivacije NF- $\kappa$ B tijekom reperfuzije ishemičnog srca smanjuje ishemijsko - reperfuzijsku ozljedu jer dovodi do smanjenog stvaranja citokina, kemokina i adhezijskih molekula. Franz i suradnici (41) su testirali ulogu NF- $\kappa$ B u procesu ventrikularnog remodeliranja nakon infarkta na mišjem modelu sa ciljanom delecijom NF- $\kappa$ B podjedinice p50. Došli su do zaključka da je kod životinja sa delecijom smanjen rani mortalitet i prevenirana dilatacija ventrikula. Ova saznanja potvrđuju hipotezu da produljena aktivacija NF- $\kappa$ B p65 podjedinice rezultira produljenim upalnim odgovorom i progresijom prema srčanom zatajenju. Hamid i suradnici su izvijestili da kronična NF- $\kappa$ B aktivacija umanjuje preživljenje i pogoršava cijeljenje infarkta srca, djelujući pro-fibrotično, pro-upalno i pro-apoptotski (47) Suprotno gore navedenim istraživanjima, Misra i suradnici (46) su zaključili da blokada NF- $\kappa$ B povećava veličinu infarkta i apoptozu kardiomiocita na 24-satnom mišjem modelu permanentne koronarne okluzije, sugerirajući citoprotektivan učinak. Rezultati ove studije su u suprotnosti sa studijama u kojima je dokazano da posredna i neposredna inhibicija NF- $\kappa$ B u infarciranom srcu smanjuje veličinu infarkta i smanjuje post-infarktne komplikacije (176, 178, 179) Konačno, nekoliko je epidemioloških studija koje donose dokaze o inhibiciji NF- $\kappa$ B putem alkoholnih pića koja sadrže polifenole (180-182). Na primjer, Blanco-Colio i suradnici su dokazali da nakon konzumacije crnog vina dolazi do inhibicije NF- $\kappa$ B ingestijom crnog vina u mononuklearima zdravih pojedinaca nakon 6 i 9 sati, a Schriecks i suradnici (182) su potvrdili da konzumacija crnog ili de-alkoholiziranog crnog vina uz večeru modulira biomarkere oksidativnog stresa uključujući i inhibitorni učinak na NF- $\kappa$ B. Thirunavukkarasu (183) u svojoj studiji donosi slične zaključke. Bijelo vino ostvaruje kardioprotektivni učinak kroz smanjenje veličine ožiljka, apoptoze i poboljšanje funkcije nakon reperfuzije. Također,

analiza je pokazala povećan izražaj NF- $\kappa$ B u grupi koja je pila vino u usporedbi sa kontrolama što je isto moglo utjecati na smanjenu apoptotsku aktivnost kardiomiocita. Također, jedan od učinaka flavonoida na mononuklearne stanice kod zdravih ljudi je izražaj fosforiliranog oblika I $\kappa$ Ba inhibitora NF- $\kappa$ B, što dovodi do smanjene količine upalnih citokina (184). Je i suradnici (133) su otkrili da tirozol smanjuje aktivaciju NF- $\kappa$ B utječući na njegovu translokaciju u jezgru, dok su Migliori i suradnici (185) utvrdili da kafeična kiselina modulira izražaj nekoliko gena uključenih u angiogenezu i inhibiciju apoptoze hipoksičnih endotelnih stanica.

### 5.1.3. TGF- $\beta$ 1

Prevladavajuće mišljenje vezano za ulogu TGF- $\beta$  u upalnoj kaskadi je da se radi o ključnoj molekuli koja regulira prijelaz iz rane upalne u proliferacijsku/ granulacijsku fazu cijeljenja (19). U literaturi detaljno opisan štetan učinak opće inhibicije TGF- $\beta$  tijekom rane upalne faze cijeljenja, najvjerojatnije zbog utjecaja na endotelne i upalne stanice (2). Nadalje, čini se da učinak TGF- $\beta$  izravno ovisi o razini aktivirane forme. Višak tog proteina bi mogao imati štetan učinak na cijeljenje u smislu poticanja odlaganja kolagena, povećanja krutosti/ rigidnosti akutnog miokarda te pogoršanja diastoličke disfunkcije, dok je ravnotežna razina tog biljega ključna u očuvanju strukture tkiva jer štiti miokard od nekontrolirane degradacije izvanstanične tvari što vodi prema progresivnoj dilataciji srca (186). Naši rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike i izražaju TGF- $\beta$ 1 ni u jednoj od tri reprezentativne zone kada smo ih usporedili između skupina. Imunoreaktivnost je ipak bila najjača u peri-infarktnoj zoni, no bez otkrivanja WRA efekta. Naša saznanja za izražaj TGF- $\beta$ 1 su dvojaka. Prvo, možemo reći da je osnovna razina TGF- $\beta$ 1 visoka u tkivu, što potvrđuju i prijašnje studije (186), a isto tako možemo reći da umjerena konzumacija vina bez obzira na sastav fenola ne dovodi do inhibicije TGF- $\beta$ 1 što implicira pozitivan učinak na cijeljenje upale. Nekoliko je studija u literaturi koje sugeriraju pozitivan efekt TGF- $\beta$ 1 na cijeljenje ožiljka. Lefer i suradnici su prvi pretpostavili protektivan učinak egzogenog TGF- $\beta$ 1 na ishemično srce, demonstrirajući da intravenska aplikacija TGF- $\beta$ 1 smanjuje ishemijsku ozljedu srca, vjerojatno smanjujući učinke pro-upalnih citokina kao što je TNF- $\alpha$  (187). Nadalje, administracija TGF- $\beta$ 1 prije reperfuzije smanjuje nekrozu srca i endotelnu disfunkciju kroz smanjenje neutrofilnog afiniteta za ishemični endotel na mačjem modelu ishemije-reperfuzije (187, 188), dok inhibicija TGF- $\beta$ 1 unutar nekoliko sati od infarkta povećava mortalitet i sintezu upalnih citokina te dovodi do dilatacije lijevog ventrikula (189, 190).

Iako su ove studije dale uvid u potencijalne učinke egzogenog TGF- $\beta$  na srčanu ishemiju, pravi učinak je ipak slabo istražen, kompleksan i ovisan od dozi, modelu, vremenu i načinu aplikacije. Jer, Ikeuchi i suradnici (190) su prvi ispitali ranu (24 sata) i kasnu (28 dana) blokadu TGF- $\beta$  na mišjem modelu infarkta srca. Rezultati su pokazali da je rana inhibicija pojačala kontraktilnu disfunkciju, što bi moglo biti povezano sa produljenim upalnim odgovorom. Blokada nakon 28 dana je pak dovela (190) do smanjenja hipertrofije i intersticijske fibroze i posljedično manje stope učestalosti zastoja srca. Anti-TGF- $\beta$  terapija unutar 24 sata nakon infarkta dovodi do pojačane sinteze citokina i kemokina i pojačane infiltracije neutrofilima što rezultira pogoršanjem disfunkcije lijevog ventrikula. Rana inhibicija (unutar 24 sata nakon koronarne okluzije) TGF- $\beta$  signalnog puta rezultira povećanim mortalitetom, jačom neutrofilnom infiltracijom i pojačanom izražajnošću pro-upalnih citokina i kemokina (190). Nasuprot tomu, kasna TGF- $\beta$  inhibicija smanjuje hipertrofiju srca i intersticijsku fibrozu, što dovodi do smanjenja dilatacije i disfunkcije lijevog ventrikula. Stoga možemo zaključiti da je inhibicija TGF- $\beta$  tijekom upalne faze cijeljenja štetna i rezultira produljenim upalnim odgovorom, dok kasna inhibicija ne interferira sa mehanizmima koji utječu na upalni infiltrat te ostvaruje pozitivan učinak kroz smanjenje fiboznih i hipertrofičnih promjena (13). Produljena inhibicija TGF- $\beta$  kod pacijenata sa kroničnom kardiomiopatijom u smislu smanjenja hipertrofije i fibroze bi mogla interferirati sa imunosnom regulacijom. Stoga bi prije eventualnog uvođenja u kliničku primjenu trebalo razlučiti pro-fibrotične od imunomodulatornih signalnih putova, u smislu što selektivnijeg učinka (191). Iako su ova saznanja dala uporište teoriji koja podupire aplikaciju TGF- $\beta$  inhibitora za zaštitu od štetnih ishoda srčanog remodeliranja, translacija ove strategije u kliničke uvjete je izazov zbog širokog spektra učinaka koje ima TGF- $\beta$  i njegove uloga u homeostazi.

Zaključno, TGF- $\beta$  je ključni posrednik između upalne i proliferacijske faze cijeljenja ožiljka, te igra ključnu ulogu u hipertrofičnim i fibrotičkim promjenama te posreduje rast kardiomiocita, aktivaciju fibroblasta i odlaganje izvanstaničnog matriksa (13).

TGF- $\beta$  se u pravilu aktivira u cijeljenju infarkta, te kroz pleiotropne učinke regulira široki spektar staničnih odgovora bitnih za popravak srčane funkcije. Nažalost, kompleksna i često kontradiktorna biološka svojstva TGF- $\beta$  otežavaju razumijevanje njegove točne uloge u cijeljenju infarkta. Smatra se da bi TGF- $\beta$  mogao biti uključen u privlačenje mononukleara u mjesto infarkta, potiskivanje sinteze upalnih gena, odstranjivanje upalnog infiltrata, odlaganje vezivnog tkiva i neovaskularizaciju nakon infarkta i po tome igra bitnu ulogu u post-infarktnom upalnom odgovoru.

## 5.2. Upalne stanice

### 5.2.1. MPO i CD68

Koristeći model permanentne ligacije željeli smo kvantificirati dvije ključne leukocitne populacije u prva 24 sata nakon infarkta srca koristeći dva poznata histološka markera za detekciju neutrofila (MPO) i makrofaga/monocita (CD68). Prema literaturi, postoje dokazi o nespecifičnosti korištenih markera i prisutnosti na više leukocitnih subpopulacija. Ipak, možemo reći da se MPO uglavnom javlja na neutrofilima i eozinofilima (192, 193), a njegov izražaj na stanicama monocitne linije je slaba (194). Ista skupina autora je pokazala da CD68 uglavnom pronalazimo u lizosomima većine stanica monocitno /makrofagne linije (194). Naš pronalazak jako slabe kolokalizacije dva navedena markera (Slika 4C), kao i njihova povezanost sa polimorfonuklearnim profilima jezgara (MPO), odnosno mononuklearnim profilima (CD68) jezgara (Slika 4D i E) u skladu je s podacima iz literature, te nam je ujedno i pomogla u diferencijaciji leukocitnih subpopulacija. U jednom od novijih preglednih članaka na temu povezanosti MPO i infarkta srca autori zaključuju da je i smanjen i povećan izražaj MPO povezan sa lošijim ishodom bolesti (195). Također, za MPO se smatra da ima brojne štetne učinke u ranoj i kasnoj fazi infarkta (196). Na eksperimentalnom modelu MPO-deficijentnih miševa pokazano je da uslijed infarkta miokarda dolazi da dilatacije lijeve klijetke (192), smanjenog odlaganja kolagena i posljedično poboljšanja funkcije te do razvoja atrijske i ventrikularne fibrilacije (197). MPO je iz ovih razloga postao atraktivna terapijska meta, te je utvrđen niz potencijalnih inhibitora kao što su nitroksidi (198), paracetamol (199) i najnovije visoko selektivni inhibitor PF-1355 (196). Kada smo izražaj MPO pozitivnih stanica analizirali na našem modelu i usporedili tri eksperimentalne skupine, to nas je dovelo do zaključka da nije bilo razlike u izražaju između životinja koje su pile vino (WW i PW skupine), bez obzira koju smo zonu infarkta uspoređivali. Ipak, čini se da je vino smanjilo izražaj MPO pozitivnih stanica u vinskim skupinama (WW i PW) u odnosu na skupinu životinja koje su pile vodu (WO). Ta atenuacija povezana sa vinom (WRA/postotni pad) je varirala između 37% i 49% u peri-infarktним zonama. Ovo smanjenje signala se u literaturi može usporediti sa novijom studijom u kojoj su autori zaključili da je 44% manji izražaj neutrofila na ishemijsko-reperfuzijskom modelu kada se usporedi sa modelom permanentne okluzije 24 sata nakon infarkta srca (200). Uzimajući to u obzir, možemo zaključiti da je MPO atenuacija povezana sa konzumacijom vina usporediva i približno jednaka onoj koja nastane nakon reperfuzije. Niz je dugoročnih blagotvornih učinaka reperfuzijske strategije i posljedično neutrofilne atenuacije: smanjeno

propadanje srčane funkcije, manje odlaganje kolagena i povoljniji anti-upalni citokinski milijeu. U ovom trenutku ne možemo sa sigurnošću reći bismo li slične trendove uočili na našem modelu. Odgovor na ta pitanja možemo dobiti produljenjem inkubacije i vremena preživljena u budućim studijama. U studiji u kojoj je inhibicija MPO aktivnosti postignuta davanjem protuupalnih lijekova (paracetamol i tempo-konjugati) pronađen je 60% pad u izražaju toga enzima 24 sata nakon permanentne koronarne ligacije. Razlog ovako jakom inhibicijskom djelovanju bi mogao biti odabir *in-vitro* modela, jer su MPO pozitivnih leukociti izravno izloženi intervenciji u tkivnom homogenatu (201). Jaka MPO inhibicija u ekstraktima tkiva je uočena i nakon tretiranja novim MPO inhibitorom naziva PF-1335, i to oko 60% (196). Ipak, ovaj inhibitor je korišten na postkondicionirajućem modelu i nakon post-infarktne inkubacije od jedan tjedan, te se rezultati ove studije ne mogu izravno usporediti sa našim prekondicionirajućim modelom, iako možemo reći da je vinska WRA dosegla gotovo 50% onoga što je postignuto specifičnim inhibitorom, što treba naglasiti. Točnu razinu neutrofilne/MPO inhibicije ostaje još uvijek nepoznanica i potrebne su nove studije kako bi ju se odredilo. U nizu ključnih funkcija koje neutrofili imaju u post-infarktnom procesu, jedna od najvažnijih je polarizacija makrofaga prema reparativnom fenotipu, a njihov potpuni izostanak na mišjem modelu dovodi do povećanja fibroze i razvoja srčanog zatajenja (202). Izražaj CD68, markera mononuklearnih leukocita monocitno/makrofagne linije slijedio je sličan obrazac kao i MPO u našoj studiji, no s nekoliko razlika: ukupno manji izražaj u svim zonama/ istraživanim skupinama (Tablica 2) značajnija i jača WRA u peri-infarktne zone, te veća, no ne i statistički značajna, atenuacija u PW grupi kada je usporedimo na WW (Slika 7). Ukupni slabiji izražaj CD68 pozitivnih stanica je vjerojatno povezan sa temporalnom dimenzijom leukocitnog infiltrata 24 sata nakon infarkta, jer tada neutrofili dosežu vršnu koncentraciju, dok monociti/makrofazi postižu vršnu koncentraciju treći dan po infarktu (64, 203).

Uključivši životinje koje su pile macerirano bijelo vino u istraživanje, naš je cilj bio istražiti ima li utjecaj na atenuaciju neutrofilne i makrofagne aktivnosti promjena u ukupnom sadržaju fenola u vinu. Objavljen je niz eksperimentalnih i epidemioloških studija o blagotvornom učinku crnog vina na kardioprotekciju i post-infarktne oporavak (204). U našem istraživanju, analizirajući komponente vina, prikazali smo veliku razliku u koncentraciji polifenola (galična kiselina, katehin, epikatein, procijanidin B1 i resveratrol) između standardnog bijelog vina i maceriranog bijelog vina, te smo demonstrirali da tehnologija produljene maceracije u izradi vina rezultira jako sličnim sadržajem polifenola onima u crnom vinu. U standardnom bijelom vinu nešto je drugačiji sadržaj i koncentracija polifenola, sa većom prisutnošću kafeične kiseline i monofenolnih spojeva kao što je tirozol, za koje se u niz studija pokazalo da imaju



blagotvorni kardiovaskularni utjecaj (173, 205). U našem istraživanju, nije bilo razlike između WW i PW skupina u atenuaciji MPO, dok je kod CD68 bio smanjen izražaj u PW skupini, što vodi ka zaključku da macerirano bijelo vino ima jači učinak na makrofage nego na neutrofile u prva 24 sata. Koliko znamo, ovo je prvo istraživanje u kojem se primijetio i analizirao “prsten” upalnih stanica u subepikardijalnoj zoni kod “sham” životinja. Nije bilo razlike između izražaja MPO i CD68 pozitivnih stanica, te je kolokalizacija navedenih markera bila zanemariva. Ovaj trend nije uočen kod životinja koje nisu podvrgnute operativnom zahvatu, pa pretpostavljamo da je ovaj pronalazak povezan sa kirurškim zahvatom. Naime, da bismo pristupili na prednji ogranak lijeve koronarne arterije, integritet perikardijalne vreće treba biti narušen, što u kasnijem periodu može dovesti do upale reakcije i posljedične infiltracije upalnim stanicama. Također, istražili smo postoji li WRA kod sham životinja, te smo usporedivši sham vino i sham vodu dobili značajno smanjenje izražaja MPO (oko 65%) kod sham životinja koje su pile vino, dok za marker CD68 nije bilo razlike.

## 6. ZAKLJUČAK

Glavni zaključak naše studije je da umjerena konzumacija bijelog vina, bez obzira na sadržaj polifenola, ostvaruje protu-upalni karakter na štakorskom modelu infarkta srca. Taj smo učinak potvrdili analizirajući izražaj upalnih markera i upalnih stanica 24 sata nakon permanentne ligacije prednjeg ogranka lijeve koronarne arterije. Atenuacija upalnih biljega umjerenom konzumacijom vina u prekondicionirajućem modelu koju smo eksperimentalno potvrdili može biti uspoređena sa post-infarktnom upalnom atenuacijom koja se dogodi na reperfuzijskom modelu. Možemo pretpostaviti da se ovaj inicijalni protuupalni karakter prekondicioniranja vinom proteže i na kasnije faze cijeljenja infarkta, preko proliferativne do faze sazrijevanja ožiljka, no potrebne su daljnje studije koje bi potvrdile tu tezu.

Potencijalno protektivni učinci supresije endogenog imunskog odgovora preko inhibicije NF- $\kappa$ B ili MMP-2 i 9 bi mogli rezultirati smanjenjem ukupnog upalnog odgovora, te možda postati novi terapijski pristup prevenciji ventrikularnog remodeliranja nakon srčanog udara. Također, eksperimentalno potvrđen smanjeni influks upalnih stanica u peri-infarktno područje kod životinja koje su konzumirale vino, bez obzira na sadržaj polifenola, bi mogao imati blagotvoran učinak na cijeljenje ožiljka.

Konačno, pozitivan učinak na ljudsko zdravlje koje umjerena konzumacija vina dokazano ostvaruje u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja i koja je potvrđena nizom velikih epidemioloških studija, nakon ovog istraživanja bi se mogla povezati i sa boljim cijeljenjem ožiljka nakon što već nastupi inicijalni događaj.



## 7. OGRANIČENJA PREDLOŽENOG ISTRAŽIVANJA

- (a) Utjecaj starenja. Laboratorijske životinje su u našoj studiji mlade, zdrave jedinice, dok je u ljudskoj populaciji ishemijska bolest srca bolest starije životne dobi.
- (b) Prisutnost komorbiditeta u općoj populaciji, kao što su ateroskleroza, metabolički sindrom ili hipertenzija, koje nismo bili u mogućnosti oponašati u našem istraživanju, a, moglo je utjecati na ishode.
- (c) Vrlo često uzimanje više lijekova (politerapija) u kliničkoj praksi.
- (d) Dugoročni ishodi u smislu preživljenja ili sl. se teško mogu prikazati kroz životinjske modele, pogotovo ako istražujemo neki akutni fenomen kao u našem slučaju.
- (e) Proveli smo istraživanje na životinjama muškog spola da bi nam skupine bile što homogenije, što nije slučaj u ljudskoj populaciji.
- (f) Sami patofiziološki mehanizam okluzije krvne žile. Naime, u većini slučajeva, do razvoja ishemijske srca dolazi prilikom formiranja tromba u koronarnoj arteriji, a u čijoj podlozi leže ateroskleroza, pušenje i pretilost. Možemo reći da je to kronični proces. Na životinjskom modelu koji smo mi koristili, do okluzije koronarne krvne žile dolazi akutno, podvezivanjem krvne žile izvana, s tim da se u našem modelu istodobno podvezuje i arterija i vena.
- (g) Zbog razlike u fiziologiji srca, post-infarktne ventrikularne aritmije su jedan od češćih uzroka morbiditeta i mortaliteta kod ljudi, dok su na mišjim i štakorskim modelima to sporadični problemi, a glavni uzrok smrti je ruptura zida ventrikula zbog ishemije i nekroze.
- (h) Nije bilo moguće histoloških metodama prikazati infarkt nakon 24 sata, stoga veličina infarkta nije uzeta kao mjera ishoda u predloženom istraživanju.
- (i) U istraživanje nije uključena i planirana skupina životinja koje bi pile samo vodenu otopinu alkohola koncentracije jednake onoj u vinu, pa će biti potrebno napraviti dodatnu studiju kojom bi se odredilo ostvaruje li vino kardioprotektivno djelovanje putem polifenola ili putem njegove alkoholne komponente.

## 8. REFERENCE

1. Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2016;167(1):152-66.
2. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation research*. 2016;119(1):91-112.
3. Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell and tissue research*. 2006;324(3):475-88.
4. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *European journal of clinical investigation*. 2013;43(9):986-95.
5. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research*. 2012;110(1):159-73.
6. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Jr., Carson GR, Concino MF, et al. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*. 1990;249(4965):146-51.
7. White PD, Mallory GK, Salcedo-Salgar J. The Speed of Healing of Myocardial Infarcts. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 1936;52:97-104 1.
8. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature reviews Cardiology*. 2014;11(5):255-65.
9. DeCoux A, Lindsey ML, Villarreal F, Garcia RA, Schulz R. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;77:64-72.
10. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-72.
11. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological research*. 2008;58(2):88-111.
12. Spinale FG, Wilbur NM. Matrix metalloproteinase therapy in heart failure. *Current treatment options in cardiovascular medicine*. 2009;11(4):339-46.
13. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovascular research*. 2007;74(2):184-95.
14. Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Bohm M, Lopaschuk G, et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet*. 2014;383(9932):1933-43.
15. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*. 1990;82(3 Suppl):II2-12.
16. Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, et al. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):414-26.
17. Gross GJ, Auchampach JA. Reperfusion injury: does it exist? *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;42(1):12-8.
18. Vilahur G, Juan-Babot O, Pena E, Onate B, Casani L, Badimon L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;50(3):522-33.
19. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48(3):504-11.

20. Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;139(1):32-40.
21. Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2014;63(3):185-95.
22. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovascular research*. 2012;94(2):276-83.
23. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nature reviews Cardiology*. 2011;8(5):292-300.
24. Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends in immunology*. 2002;23(11):509-12.
25. Ionita MG, Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Endogenous inflammatory molecules engage Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Journal of innate immunity*. 2010;2(4):307-15.
26. Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, Keogh B, McGuirk P, Timmers L, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation*. 2010;121(1):80-90.
27. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. 2007;4(8):444-54.
28. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in immunology*. 2004;16(1):3-9.
29. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):500-8.
30. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003;108(16):1912-6.
31. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free radical biology & medicine*. 2000;28(10):1456-62.
32. Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*. 1975;56(3):740-50.
33. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(5):346-53.
34. Hill JH, Ward PA. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *The Journal of experimental medicine*. 1971;133(4):885-900.
35. Dreyer WJ, Michael LH, Nguyen T, Smith CW, Anderson DC, Entman ML, et al. Kinetics of C5a release in cardiac lymph of dogs experiencing coronary artery ischemia-reperfusion injury. *Circulation research*. 1992;71(6):1518-24.
36. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46(5):705-16.
37. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunological reviews*. 2006;210:171-86.
38. Lenardo MJ, Baltimore D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*. 1989;58(2):227-9.
39. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF-kappaB in the heart: to be or not to NF-kappaB. *Circulation research*. 2011;108(9):1122-32.

40. Timmers L, van Keulen JK, Hoefler IE, Meijs MF, van Middelaar B, den Ouden K, et al. Targeted deletion of nuclear factor kappaB p50 enhances cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction. *Circulation research*. 2009;104(5):699-706.
41. Frantz S, Hu K, Bayer B, Gerondakis S, Strotmann J, Adamek A, et al. Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(11):1918-20.
42. Thiemermann C. Inhibition of the activation of nuclear factor kappa B to reduce myocardial reperfusion injury and infarct size. *Cardiovascular research*. 2004;63(1):8-10.
43. Grabellus F, Levkau B, Sokoll A, Welp H, Schmid C, Deng MC, et al. Reversible activation of nuclear factor-kappaB in human end-stage heart failure after left ventricular mechanical support. *Cardiovascular research*. 2002;53(1):124-30.
44. Pomerantz JL, Baltimore D. Two pathways to NF-kappaB. *Molecular cell*. 2002;10(4):693-5.
45. Purcell NH, Tang G, Yu C, Mercurio F, DiDonato JA, Lin A. Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(12):6668-73.
46. Misra A, Haudek SB, Knuefermann P, Vallejo JG, Chen ZJ, Michael LH, et al. Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circulation*. 2003;108(25):3075-8.
47. Hamid T, Guo SZ, Kingery JR, Xiang X, Dawn B, Prabhu SD. Cardiomyocyte NF-kappaB p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Cardiovascular research*. 2011;89(1):129-38.
48. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97(5):738-47.
49. Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *The American journal of pathology*. 1995;146(2):419-28.
50. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation research*. 2004;94(12):1543-53.
51. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, et al. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *The American journal of pathology*. 2004;164(2):665-77.
52. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. 1998;98(7):699-710.
53. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86(4):1243-54.
54. Nah DY, Rhee MY. The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction. *Korean circulation journal*. 2009;39(10):393-8.
55. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
56. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in cell biology*. 2005;15(11):599-607.
57. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circulation research*. 2007;100(1):27-40.
58. Szpaderska AM, Egozi EI, Gamelli RL, DiPietro LA. The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(6):1130-7.

59. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010;140(6):871-82.
60. Lusinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1994;8(12):929-38.
61. Bournazou I, Pound JD, Duffin R, Bournazos S, Melville LA, Brown SB, et al. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(1):20-32.
62. Manchanda K, Kolarova H, Kerkenpass C, Mollenhauer M, Vitecek J, Rudolph V, et al. MPO (Myeloperoxidase) Reduces Endothelial Glycocalyx Thickness Dependent on Its Cationic Charge. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38(8):1859-67.
63. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2012;125(13):1652-63.
64. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(12):3037-47.
65. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation research*. 2005;96(8):881-9.
66. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
67. Robbins CS, Swirski FK. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010;67(16):2685-93.
68. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.
69. Yabluchanskiy A, Ma Y, DeLeon-Pennell KY, Altara R, Halade GV, Voorhees AP, et al. Myocardial Infarction Superimposed on Aging: MMP-9 Deletion Promotes M2 Macrophage Polarization. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2016;71(4):475-83.
70. van der Veeken J, Arvey A, Rudensky A. Transcriptional control of regulatory T-cell differentiation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2013;78:215-22.
71. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *The American journal of pathology*. 2010;176(5):2177-87.
72. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(4):945-53.
73. Palazzo AJ, Jones SP, Anderson DC, Granger DN, Lefer DJ. Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. *The American journal of physiology*. 1998;275(5 Pt 2):H1865-72.
74. Yabluchanskiy A, Li Y, Chilton RJ, Lindsey ML. Matrix metalloproteinases: drug targets for myocardial infarction. *Current drug targets*. 2013;14(3):276-86.
75. Rienks M, Papageorgiou AP, Frangogiannis NG, Heymans S. Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circulation research*. 2014;114(5):872-88.
76. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:928315.



77. Lindsey ML, Zamilpa R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovascular therapeutics*. 2012;30(1):31-41.
78. Hughes BG, Schulz R. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. *Basic research in cardiology*. 2014;109(4):424.
79. Sawicki G, Leon H, Sawicka J, Sariahmetoglu M, Schulze CJ, Scott PG, et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation*. 2005;112(4):544-52.
80. Sung MM, Schulz CG, Wang W, Sawicki G, Bautista-Lopez NL, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;43(4):429-36.
81. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*. 2002;106(12):1543-9.
82. Raturi A, Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(1):213-24.
83. van den Borne SW, Cleutjens JP, Hanemaaijer R, Creemers EE, Smits JF, Daemen MJ, et al. Increased matrix metalloproteinase-8 and -9 activity in patients with infarct rupture after myocardial infarction. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2009;18(1):37-43.
84. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(16):1581-98.
85. Sariahmetoglu M, Skrzypiec-Spring M, Youssef N, Jacob-Ferreira AL, Sawicka J, Holmes C, et al. Phosphorylation status of matrix metalloproteinase 2 in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Heart*. 2012;98(8):656-62.
86. Deleon-Pennell KY, Altara R, Yabluchanskiy A, Modesti A, Lindsey ML. The circular relationship between matrix metalloproteinase-9 and inflammation following myocardial infarction. *IUBMB life*. 2015;67(8):611-8.
87. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391-403.
88. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(31):29596-602.
89. Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*. 2001;50(3):556-65.
90. Xie Z, Singh M, Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(38):39513-9.
91. Zamilpa R, Ibarra J, de Castro Bras LE, Ramirez TA, Nguyen N, Halade GV, et al. Transgenic overexpression of matrix metalloproteinase-9 in macrophages attenuates the inflammatory response and improves left ventricular function post-myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;53(5):599-608.
92. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of dermatological science*. 2004;35(2):83-92.

93. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(16):5788-92.
94. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual review of immunology*. 1998;16:137-61.
95. Kitamura M. Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF-beta 1. *J Immunol*. 1997;159(3):1404-11.
96. Fava RA, Olsen NJ, Postlethwaite AE, Broadley KN, Davidson JM, Nanney LB, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(5):1121-32.
97. Rainer PP, Hao S, Vanhoutte D, Lee DI, Koitabashi N, Molkentin JD, et al. Cardiomyocyte-specific transforming growth factor beta suppression blocks neutrophil infiltration, augments multiple cytoprotective cascades, and reduces early mortality after myocardial infarction. *Circulation research*. 2014;114(8):1246-57.
98. Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, et al. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation*. 1997;95(3):684-92.
99. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Molecular genetics and metabolism*. 2000;71(1-2):418-35.
100. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 1993;122(1):103-11.
101. Chen W, Saxena A, Li N, Sun J, Gupta A, Lee DW, et al. Endogenous IRAK-M attenuates postinfarction remodeling through effects on macrophages and fibroblasts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(11):2598-608.
102. Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, et al. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation*. 2005;111(22):2935-42.
103. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom-Lundqvist C, Borger MA, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European heart journal*. 2012;33(20):2569-619.
104. Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(7):1199-204.
105. Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, Hamm C, Holmes D, Jr., O'Neill WW, et al. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *Jama*. 2007;297(1):43-51.
106. Bujak M, Kweon HJ, Chatila K, Li N, Taffet G, Frangogiannis NG. Aging-related defects are associated with adverse cardiac remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(14):1384-92.
107. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life sciences*. 2000;66(8):663-73.
108. de Lange DW. From red wine to polyphenols and back: a journey through the history of the French Paradox. *Thrombosis research*. 2007;119(4):403-6.
109. Gronbaek M, Deis A, Sorensen TI, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *BMJ*. 1995;310(6988):1165-9.



110. Poli A, Marangoni F, Avogaro A, Barba G, Bellentani S, Bucci M, et al. Moderate alcohol use and health: a consensus document. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2013;23(6):487-504.
111. Chiva-Blanch G, Arranz S, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol Alcohol*. 2013;48(3):270-7.
112. van Bussel BCT, Henry RMA, Schalkwijk CG, Dekker JM, Nijpels G, Feskens EJM, et al. Alcohol and red wine consumption, but not fruit, vegetables, fish or dairy products, are associated with less endothelial dysfunction and less low-grade inflammation: the Hoorn Study. *European journal of nutrition*. 2018;57(4):1409-19.
113. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Ros E, Valderas-Martinez P, Casas R, Arranz S, et al. Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial. *Clin Nutr*. 2013;32(2):200-6.
114. Tousoulis D, Ntarladimas I, Antoniadis C, Vasiliadou C, Tentolouris C, Papageorgiou N, et al. Acute effects of different alcoholic beverages on vascular endothelium, inflammatory markers and thrombolysis fibrinolysis system. *Clin Nutr*. 2008;27(4):594-600.
115. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Llorach R, Rotches-Ribalta M, Guillen M, Casas R, et al. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(2):326-34.
116. Sacanella E, Vazquez-Agell M, Mena MP, Antunez E, Fernandez-Sola J, Nicolas JM, et al. Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(5):1463-9.
117. Mansvelt EP, van Velden DP, Fourie E, Rossouw M, van Rensburg SJ, Smuts CM. The in vivo antithrombotic effect of wine consumption on human blood platelets and hemostatic factors. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:329-32.
118. Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martinez P, Medina-Remon A, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*. 2012;4(7):759-81.
119. Del Rio D, Costa LG, Lean ME, Crozier A. Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2010;20(1):1-6.
120. Das S, Falchi M, Bertelli A, Maulik N, Das DK. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by the anti-inflammatory action of resveratrol. *Arzneimittel-Forschung*. 2006;56(10):700-6.
121. Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;282(6):H1996-2003.
122. Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free radical biology & medicine*. 1999;27(1-2):160-9.
123. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;282(6):H1988-95.
124. Hung LM, Su MJ, Chen JK. Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(6):774-81.
125. Zhang Y, Liu Y, Wang T, Li B, Li H, Wang Z, et al. Resveratrol, a natural ingredient of grape skin: antiarrhythmic efficacy and ionic mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;340(4):1192-9.

126. Baghaturia NS. Georgian winemaking. Theory and Practice. private ed: Tbilisi Odishvili Z.G; 2010.
127. Ruzic I, Skerget M, Knez Z, Runje M. Phenolic content and antioxidant potential of macerated white wines. *Eur Food Res Technol.* 2011;233(3):465-72.
128. Lukic I, Jedrejic N, Ganic KK, Staver M, Persuric D. Phenolic and Aroma Composition of White Wines Produced by Prolonged Maceration and Maturation in Wooden Barrels. *Food technology and biotechnology.* 2015;53(4):407-18.
129. Hernandez-Jimenez A, Kennedy JA, Bautista-Ortin AB, Gomez-Plaza E. Effect of Ethanol on Grape Seed Proanthocyanidin Extraction. *Am J Enol Viticult.* 2012;63(1):57-61.
130. Bertelli AA, Migliori M, Panichi V, Longoni B, Origlia N, Ferretti A, et al. Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2002;957:295-301.
131. Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germano G, et al. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis.* 2006;188(1):77-83.
132. Bertelli A, Migliori M, Bertelli AA, Origlia N, Filippi C, Panichi V, et al. Effect of some white wine phenols in preventing inflammatory cytokine release. *Drugs under experimental and clinical research.* 2002;28(1):11-5.
133. Je IG, Kim DS, Kim SW, Lee S, Lee HS, Park EK, et al. Tyrosol Suppresses Allergic Inflammation by Inhibiting the Activation of Phosphoinositide 3-Kinase in Mast Cells. *PloS one.* 2015;10(6):e0129829.
134. Lecci RM, Logrieco A, Leone A. Pro-oxidative action of polyphenols as action mechanism for their pro-apoptotic activity. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* 2014;14(10):1363-75.
135. Sun L, Fan H, Yang L, Shi L, Liu Y. Tyrosol prevents ischemia/reperfusion-induced cardiac injury in H9c2 cells: involvement of ROS, Hsp70, JNK and ERK, and apoptosis. *Molecules.* 2015;20(3):3758-75.
136. Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2012;13(10):616-30.
137. Frangogiannis NG. Targeting the transforming growth factor (TGF)-beta cascade in the remodeling heart: benefits and perils. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2014;76:169-71.
138. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2017;97(1):4-13.
139. Robinson J, Harding J, Vouillamoz J. *Wine Grapes.* London, United Kingdom: Allen Lane; 2012 25 October 2012. 1280 p.
140. Modun D, Music I, Katalinic V, Salamunic I, Boban M. Comparison of protective effects of catechin applied in vitro and in vivo on ischemia-reperfusion injury in the isolated rat hearts. *Croatian medical journal.* 2003;44(6):690-6.
141. Aljinovic J, Vukojevic K, Kosta V, Guic MM, Saraga-Babic M, Grkovic I. Histological differences in healing following experimental transmural infarction in rats. *Histology and histopathology.* 2010;25(12):1507-17.
142. van Zuylen VL, den Haan MC, Roelofs H, Fibbe WE, Schaliij MJ, Atsma DE. Myocardial infarction models in NOD/Scid mice for cell therapy research: permanent ischemia vs ischemia-reperfusion. *SpringerPlus.* 2015;4:336.
143. Andreadou I, Cabrera-Fuentes HA, Devaux Y, Frangogiannis NG, Frantz S, Guzik T, et al. Immune cells as targets for cardioprotection: new players and novel therapeutic opportunities. *Cardiovascular research.* 2019;115(7):1117-30.

144. Carlyle WC, Jacobson AW, Judd DL, Tian B, Chu C, Hauer KM, et al. Delayed reperfusion alters matrix metalloproteinase activity and fibronectin mRNA expression in the infarct zone of the ligated rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1997;29(9):2451-63.
145. Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, et al. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2001;103(17):2181-7.
146. Kelly D, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *European heart journal*. 2007;28(6):711-8.
147. Tao ZY, Cavaşin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life sciences*. 2004;74(12):1561-72.
148. Etoh T, Joffs C, Deschamps AM, Davis J, Dowdy K, Hendrick J, et al. Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001;281(3):H987-94.
149. Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Ohlstein EH. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life sciences*. 2001;68(7):799-814.
150. Herzog E, Gu A, Kohmoto T, Burkhoff D, Hochman JS. Early Activation of Metalloproteinases after Experimental Myocardial Infarction Occurs in Infarct and Non-infarct Zones. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 1998;7(6):307-12.
151. Jong GP, Ma T, Chou P, Chang MH, Wu CH, Lis PC, et al. Serum MMP-9 activity as a diagnosing marker for the developing heart failure of post MI patients. *The Chinese journal of physiology*. 2006;49(2):104-9.
152. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *British journal of pharmacology*. 2007;152(2):189-205.
153. Cui J, Chen S, Zhang C, Meng F, Wu W, Hu R, et al. Inhibition of MMP-9 by a selective gelatinase inhibitor protects neurovasculature from embolic focal cerebral ischemia. *Molecular neurodegeneration*. 2012;7:21.
154. Jiang B, Li D, Deng Y, Teng F, Chen J, Xue S, et al. Salvianolic acid A, a novel matrix metalloproteinase-9 inhibitor, prevents cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *PloS one*. 2013;8(3):e59621.
155. Apple KA, Yarbrough WM, Mukherjee R, Deschamps AM, Escobar PG, Mingoia JT, et al. Selective targeting of matrix metalloproteinase inhibition in post-infarction myocardial remodeling. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2006;47(2):228-35.
156. Kryzhanovskii SA, Ionova EO, Stolyaruk VN, Tsorin IB, Vititnova MB. Effect of metalloproteinase inhibitor on early postinfarction remodeling in the most acute phase of myocardial infarction. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2013;156(1):19-24.
157. Villarreal FJ, Griffin M, Omens J, Dillmann W, Nguyen J, Covell J. Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation*. 2003;108(12):1487-92.
158. Fana XZ, Zhu HJ, Wu X, Yan J, Xu J, Wang DG. Effects of doxycycline on cx43 distribution and cardiac arrhythmia susceptibility of rats after myocardial infarction. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*. 2014;13(2):613-21.
159. Cerisano G, Buonamici P, Valenti R, Sciagra R, Raspanti S, Santini A, et al. Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left

- ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial. *European heart journal*. 2014;35(3):184-91.
160. Hudson MP, Armstrong PW, Ruzylo W, Brum J, Cusmano L, Krzeski P, et al. Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(1):15-20.
161. Brown DL, Desai KK, Vakili BA, Nouneh C, Lee HM, Golub LM. Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(4):733-8.
162. Schulze CJ, Castro MM, Kandasamy AD, Cena J, Bryden C, Wang SH, et al. Doxycycline reduces cardiac matrix metalloproteinase-2 activity but does not ameliorate myocardial dysfunction during reperfusion in coronary artery bypass patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Critical care medicine*. 2013;41(11):2512-20.
163. Castellazzi M, Tamborino C, Fainardi E, Manfrinato MC, Granieri E, Dallochio F, et al. Effects of anticoagulants on the activity of gelatinases. *Clinical biochemistry*. 2007;40(16-17):1272-6.
164. Tziakas DN, Chalikias GK, Hatzinikolaou EI, Stakos DA, Tentes IK, Kortsaris A, et al. Alteplase treatment affects circulating matrix metalloproteinase concentrations in patients with ST segment elevation acute myocardial infarction. *Thrombosis research*. 2006;118(2):221-7.
165. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circulation research*. 2001;89(3):201-10.
166. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circulation research*. 2002;90(5):520-30.
167. Mihardja SS, Lee RJ. Using extracellular matrix-derived peptides to alter the microenvironment for myocardial repair. *Current vascular pharmacology*. 2012;10(3):342-6.
168. Kim EY, Pai TK, Han O. Effect of bioactive dietary polyphenols on zinc transport across the intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(8):3606-12.
169. Guo H, Liu L, Shi Y, Sun A, Xu F, Chi J, et al. Chinese yellow wine and red wine inhibit matrix metalloproteinase-2 and improve atherosclerotic plaque in LDL receptor knockout mice. *Cardiovascular therapeutics*. 2010;28(3):161-8.
170. Zhai X, Chi J, Tang W, Ji Z, Zhao F, Jiang C, et al. Yellow wine polyphenolic compounds inhibit matrix metalloproteinase-2, -9 expression and improve atherosclerotic plaque in LDL-receptor-knockout mice. *Journal of pharmacological sciences*. 2014;125(2):132-41.
171. Oak MH, El Bedoui J, Anglard P, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2004;110(13):1861-7.
172. Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Martines G, et al. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;527(2):81-9.
173. Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Paul D, Maulik N. Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in



- vivo model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(20):9692-8.
174. Kawamura N, Kubota T, Kawano S, Monden Y, Feldman AM, Tsutsui H, et al. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF-alpha-induced cardiomyopathy. *Cardiovascular research*. 2005;66(3):520-9.
175. Morgan EN, Boyle EM, Jr., Yun W, Griscavage-Ennis JM, Farr AL, Canty TG, Jr., et al. An essential role for NF-kappaB in the cardioadaptive response to ischemia. *The Annals of thoracic surgery*. 1999;68(2):377-82.
176. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nature medicine*. 1997;3(8):894-9.
177. Brown M, McGuinness M, Wright T, Ren X, Wang Y, Boivin GP, et al. Cardiac-specific blockade of NF-kappaB in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli in vivo. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;289(1):H466-76.
178. Pye J, Ardeshirpour F, McCain A, Bellinger DA, Merricks E, Adams J, et al. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;284(3):H919-26.
179. Trescher K, Bernecker O, Fellner B, Gyongyosi M, Krieger S, Demartin R, et al. Adenovirus-mediated overexpression of inhibitor kappa B-alpha attenuates postinfarct remodeling in the rat heart. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2004;26(5):960-7.
180. Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, Alvarez-Sala LA, Castilla M, Bustamante A, et al. Ethanol beverages containing polyphenols decrease nuclear factor kappa-B activation in mononuclear cells and circulating MCP-1 concentrations in healthy volunteers during a fat-enriched diet. *Atherosclerosis*. 2007;192(2):335-41.
181. Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C, Ortego M, Hernandez-Presa MA, et al. Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation*. 2000;102(9):1020-6.
182. Schrieks IC, van den Berg R, Sierksma A, Beulens JW, Vaes WH, Hendriks HF. Effect of red wine consumption on biomarkers of oxidative stress. *Alcohol Alcohol*. 2013;48(2):153-9.
183. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Samuel SM, Akita Y, Zhan L, Bertelli AA, et al. White wine induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury is mediated by life extending Akt/FOXO3a/NFkappaB survival pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(15):6733-9.
184. Magrone T, Jirillo E. Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2010;69(3):279-85.
185. Migliori M, Cantaluppi V, Mannari C, Bertelli AA, Medica D, Quercia AD, et al. Caffeic acid, a phenol found in white wine, modulates endothelial nitric oxide production and protects from oxidative stress-associated endothelial cell injury. *PloS one*. 2015;10(4):e0117530.
186. Verheule S, Sato T, Everett Tt, Engle SK, Otten D, Rubart-von der Lohe M, et al. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circulation research*. 2004;94(11):1458-65.

187. Lefer AM, Tsao P, Aoki N, Palladino MA, Jr. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science*. 1990;249(4964):61-4.
188. Lefer AM, Ma XL, Weyrich AS, Scalia R. Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(3):1018-22.
189. Frantz S, Hu K, Adamek A, Wolf J, Sallam A, Maier SK, et al. Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Basic research in cardiology*. 2008;103(5):485-92.
190. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, et al. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovascular research*. 2004;64(3):526-35.
191. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;51(4):600-6.
192. Askari AT, Brennan ML, Zhou X, Drinko J, Morehead A, Thomas JD, et al. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(5):615-24.
193. Amanzada A, Malik IA, Blaschke M, Khan S, Rahman H, Ramadori G, et al. Identification of CD68(+) neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(4):561-70.
194. Rehg JE, Bush D, Ward JM. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. *Toxicologic pathology*. 2012;40(2):345-74.
195. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2018;640:47-52.
196. Ali M, Pulli B, Courties G, Tricot B, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Myeloperoxidase Inhibition Improves Ventricular Function and Remodeling After Experimental Myocardial Infarction. *JACC Basic to translational science*. 2016;1(7):633-43.
197. Mollenhauer M, Friedrichs K, Lange M, Gesenberg J, Remane L, Kerkenpass C, et al. Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circulation research*. 2017;121(1):56-70.
198. Rees MD, Bottle SE, Fairfull-Smith KE, Malle E, Whitelock JM, Davies MJ. Inhibition of myeloperoxidase-mediated hypochlorous acid production by nitroxides. *The Biochemical journal*. 2009;421(1):79-86.
199. Koelsch M, Mallak R, Graham GG, Kajer T, Milligan MK, Nguyen LQ, et al. Acetaminophen (paracetamol) inhibits myeloperoxidase-catalyzed oxidant production and biological damage at therapeutically achievable concentrations. *Biochemical pharmacology*. 2010;79(8):1156-64.
200. Hashmi S, Al-Salam S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: a comparison. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(8):8786-96.
201. Wang XS, Kim HB, Szuchman-Sapir A, McMahon A, Dennis JM, Witting PK. Neutrophils recruited to the myocardium after acute experimental myocardial infarct generate hypochlorous acid that oxidizes cardiac myoglobin. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2016;612:103-14.

202. Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Drechsler M, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *European heart journal*. 2017;38(3):187-97.
203. Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovascular research*. 2014;102(2):240-8.
204. Brien SE, Ronksley PE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *BMJ*. 2011;342:d636.
205. Cui J, Tosaki A, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Maulik N, et al. Cardioprotective abilities of white wine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;957:308-16.



## 9. SAŽETAK

Naš je zadatak bio „titrirati“ ranu (upalnu fazu) cijeljenja akutnog infarkta miokarda kvantitativnom i kvalitativnom analizom infarciranog i rubnog ishemičnog, kao i neinfarciranog dijela miokarda s obzirom na izražaj upalnih markera MMP-2, MMP-9, NF $\kappa$ B i TGF $\beta$ 1 i upalnih stanica (neutrofili i monociti/makrofazi) koji se javljaju neposredno nakon infarkta i tijekom prvih 24 sata od inicijalnog događaja na štakorskom modelu. Saznanja koja imamo o upalnoj fazi cijeljenja infarkta miokarda stavili smo u odnos s umjerenom konzumacijom bijelog vina te ispitati blagotvorni učinka prekondicioniranja standardnom i maceriranom Graševinom.

Životinje su randomizirane u skupine i 28 dana su konzumirale ili vodu ili bijelo vino (standardno i macerirano bijelo vino), nakon čega su podvrgnute operativnom zahvatu podvezivanja prednjeg silaznog ogranka lijeve koronarne arterije izazivajući infarkt miokarda. Nakon 24 sata inkubacije životinje su žrtvovane, srca eksplantirana, te su se histološki odredile 3 reprezentativne zone, (zona infarkta, kontrolna zona, peri-infarktna zona), u kojima se mjerio izražaj pozitivnog signala gore navedenih upalnih markera i broj pozitivnih upalnih stanica pomoću protutijela na MPO (neutrofili) i CD68 monociti/makrofazi).

Nađen je značajno manji izražaj MMP-9 markera u svim reprezentativnim zonama kod životinja koje su pile vino, bez obzira na sadržaj fenola ( $p < 0.001$ ). Ipak, atenuacija signala je bila značajno slabija kod skupine koja je konzumirala macerirano vino. Slični trendovi su primijećeni i za marker NF $\kappa$ B. Nije bilo razlike u imunoreaktivnosti MMP-2 među skupinama, osim u peri-infarktnoj zoni, gdje je uočena atenuacija signala kod skupine koja je konzumirala standardno vino ( $p < 0.004$ ). Nije bilo razlike u ekspresiji markera MMP-2 između skupine koja je pila vodu i skupine koja je pila macerirano vino u peri-infarktnoj zoni. Razlika nije pronađena u ispitivanim skupinama za marker TGF- $\beta$ 1 ni u jednoj od reprezentativnih zona. Pronašli smo smanjen izražaj pozitivnih stanica na MPO i CD68 u peri-infarktnoj zoni životinja koje su pile vino ( $p < 0.001$ ). U sham grupi opisan je subepikardijalni „upalni prsten/ sloj“ stanica.

Znanstvena vrijednost i doprinos ove doktorske disertacije je u prvi put eksperimentalno opisanom kardioprotektivnom učinku konzumacije bijelog vina. Pokazali smo da umjereni konzumacija bijelog vina kroz razdoblje od mjesec dana prije infarkta značajno pridonosi smanjenju izražaja ključnih upalnih markera u tkivu štakora, što bi moglo povoljno utjecati na tijek i oporavak nakon oboljenja.

## 10. SUMMARY

Two main points were addressed in this dissertation. Effects of white wine and macerated white wine consumption on the expression of inflammatory markers/mediators (MMP-2, MMP-9, NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ 1) and on inflammatory cells infiltration (neutrophils and monocytes/macrophages) in myocardial tissue after experimentally induced permanent myocardial ischemia were investigated. Male Sprague-Dawley rats were given either a combination of different white wines or water only, for 28 days. After coronary ligation, animals were left to survive for 24 hours. Three representative areas: infarct/ischemic, peri-infarct/border zone, and control/non-ischemic zones were analyzed for the expression of immunoreactivity by measuring the threshold area % of signal density for inflammatory markers. Same areas were analysed for total number of MPO (neutrophils) and CD68 (monocytes-macrophages) positive cells per area of view.

For MMP-9, significantly smaller expression was found in all 3 zones of wine drinking animals ( $P < 0.001$ ). There was no difference in MMP-2 immunoreactivity between two groups, except in peri-infarct zones, where the signal was significantly decreased ( $P < 0.001$ ). The same pattern of expression was found for the NF- $\kappa$ B p65 signal, although no differences between experimental groups were observed for TGF- $\beta$ 1. There was no difference between polyphenol- rich white wine and standard white wine consumption for any of the abovementioned markers.

Smaller expression for both MPO and CD68 was found in all three peri-infarct zones of wine drinking animals ( $p < 0.001$ ). There was no difference in expression of leukocyte markers between animals drinking standard and polyphenol-rich white wine, although for CD68, a non-significant attenuation was noticed. In sham animals, a sub-epicardial MPO/CD68 immunoreactive 'inflammatory ring' is described. Standard white wine consumption caused attenuation of expression of MPO but not of CD68 in these animals.

Main highlights of our investigation are that white wine consumption, regardless of its polyphenol content, decreases the expression of the investigated inflammatory markers/mediators in the peri-infarct zone, suggesting its significant modulatory potential. For MMP-9 and MMP-2, expression was similar to the effect of postischemic reperfusion. No effect on TGF- $\beta$ 1 was observed, highlighting its role in being the master switch, changing from the inflammatory to the proliferative stage of infarct healing. Finally, we conclude that white wine consumption positively modulates peri-infarct inflammatory infiltration.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

**Ime i prezime:** Nikola Ključević

**Adresa:** Šimićeva 31 Split

**Telefon** +385 92/244 0964

**Elektronička pošta:** [kljucevic.nikola@gmail.com](mailto:kljucevic.nikola@gmail.com)

**Državljanstvo:** Hrvat

**Datum i mjesto rođenja:** 21.10.1989. Sl. Brod, Republika Hrvatska

### IZOBRAZBA

- Osnovna škola Petar Berislavić Trogir (1996.-2004.)
- Srednja škola Ivana Lucića Trogir (Opća gimnazija) (2004.-2008.)
- Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, doktor medicine (2008.-2014.)
- Poslijediplomski studij TRIBE pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu (2014.-2018.)
- Specijalističko usavršavanje doktora medicine iz Ortopedije i traumatologije pri KBC-u Split (2018.-)

### RADNO ISKUSTVO

- Pripravnički staž ( 6 mjeseci)
- Asistent i doktorant na Katedri za anatomiju Medicinskog Fakulteta u Splitu (2014.-2018.)
- Vanjski suradnik na Katedri za anatomiju Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu (2014.-)
- Specijalizant Ortopedije i traumatologije, KBC Split (2018.-)

### OBJAVLJENI RADOVI

1. Kljucevic N, Milat AM, Grga M, Mudnic I, Boban M, Grkovic I. White Wine Consumption Influences Inflammatory Phase of Repair After Myocardial Infarction in Rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2017;70(5):293-9.
2. Kljucevic N, Boban D, Milat AM, Juric D, Mudnic I, Boban M, et al. Expression of Leukocytes Following Myocardial Infarction in Rats is Modulated by Moderate White Wine Consumption. *Nutrients*. 2019;11(8).

3. Kljucevic Z, Benzon B, Kljucevic N, Versic Bratincevic M, Sutlovic D. Liver damage indices as a tool for modifying methadone maintenance treatment: a cross-sectional study. Croatian medical journal. 2018;59(6):298-306.
4. Milat AM, Mudnic I, Grkovic I, Kljucevic N, Grga M, Jercic I, et al. Effects of White Wine Consumption on Weight in Rats: Do Polyphenols Matter? Oxidative medicine and cellular longevity. 2017;2017:8315803.
5. Rezic-Muzinic N, Mastelic A, Benzon B, Markotic A, Mudnic I, Grkovic I, et al. Expression of adhesion molecules on granulocytes and monocytes following myocardial infarction in rats drinking white wine. PloS one. 2018;13(5):e0196842.

### **MATERINSKI JEZIK**

Hrvatski

### **OSTALI JEZICI**

Engleski jezik

### **OSTALE AKTIVNOSTI**

Hrvatsko društvo morfologa

Hrvatski lovački savez