

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

DANICA BOBAN

**UČINAK KONZUMACIJE VINA I ETANOLA NA PREŽIVLJENJE I
PROLIFERATIVNU FAZU CIJELJENJA NAKON KIRURŠKI
INDUCIRANOG INFARKTA MIOKARDA NA MODELU ŠTAKORA**

DOKTORSKI RAD

Split, ožujak 2025.

Ovaj doktorski rad izrađena je pod mentorstvom prof.dr.sc. Ivica Grkovića pri Katedri za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

PRISTUPNICA: Danica Boban, dr. med.

VODITELJ RADA: prof. dr. sc. Ivica Grković, dr. med.

ZAHVALA

Želim se zahvaliti svom izvanrednom mentoru, profesoru Ivici Grkoviću, ne samo na njegovoj nesebičnoj podršci u procesu izrade ovog doktorskog rada, već i na njegovom strpljenju, razumijevanju, ljudskosti, stručnosti i mudrosti koje su obogatile moj znanstveni, nastavnički i privatni život.

Zahvaljujem se svim suradnicima na projektu, na čelu s prof. dr. sc. Mladenom Bobanom, i kolegama sa Zavoda čiji su savjeti i pomoć bili korisni za uspješan završetak ovog istraživanja.

Iskreno se zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi nepresušni izvor podrške i ljubavi, kao i bratu i sestri što su bez otpora slušali moje jadikovke i dobacivali koju šalu kad je trebalo.

Zahvaljujem i ostatku svoje uže i šire obitelji, prijateljima na podršci koju su mi pružali.

Posebno se želim zahvaliti svom suprugu Zvonimiru što mi je bio svjetionik tijekom cijelog ovog procesa, pomažući mi da se ne nasučem na tvrdu obalu odustajanja. Hvala na nesebičnoj pomoći s brojevima koje jedna medicinarica, ipak, nešto teže razumije.

Hvala i mojoj djeci, Jakovu, Manueli i Luki, bez kojih bi ovaj doktorski rad bio završen prije pet godina. Na stranu šala, ne žalim ni trenutka, oni su moj najveći uspjeh i dar od Boga.

I na kraju, hvala dragom Bogu što je sve blagoslovio i vodio.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiološki podatci o kardiovaskularnim bolestima	2
1.2. Infarkt miokarda	3
1.2.1. Patološki i patofiziološki mehanizmi nastanka infarkta miokarda.....	3
1.2.2. Stanične promjene tijekom ishemije	4
1.3. Faze i mehanizmi cijeljenja infarkta miokarda	5
1.3.1. Akutna upalna (inflamatorna) faza.....	6
1.3.2. Proliferativna faza cijeljenja.....	13
1.3.3. Faza sazrijevanja ožiljka (maturacije).....	20
1.4. Utjecaj konzumacije alkoholnih pića na kardiovaskularni sustav	20
1.4.1. Razlike u učincima s obzirom na vrstu alkoholnih pića.....	22
1.4.2. Utjecaj obrasca pijenja na učinke konzumacije alkohola.....	23
1.4.3. Ograničenja istraživanja o učincima alkohola.....	23
1.5. Biljezi za histološko praćenje proliferativne faze cijeljenja infarkta miokarda	24
2. CILJ RADA I HIPOTEZE	26
2.1. Ciljevi istraživanja.....	27
2.2. Hipoteza istraživanja	27
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. Etička načela	29
3.2. Ustroj istraživanja	29
3.3. Pokusne životinje	30
3.4. Pokusna alkoholna pića	35
3.4.1. Standardno bijelo vino – pokusno vino.....	35
3.4.2. Vodena otopina etanola.....	37
3.5. Postupci u sklopu induciranja infarkta miokarda	38

3.5.1. Anestezija i priprema za operacijski zahvat	38
3.5.2. Kirurško podvezivanje LAD-a	38
3.6. Protokol pripreme tkiva.....	40
3.6.1. Trikromno bojanje po Malloryu i bojanje hematoksilinom i eozinom (H&E)	40
3.7. Imunofluorescencijska tehnika.....	41
3.7.1. Prikupljanje fotografija/podataka	42
3.7.2. Kvantitativna analiza podataka	42
3.8. Statistička analiza podataka	43
4. REZULTATI.....	45
4.1. Stope preživljenja.....	46
4.2. Dinamika cijeljenja u proliferativnoj fazi	49
4.2.1. Analiza razlika među skupinama s obzirom na brojnost i vrstu makrofaga	50
4.2.2. Usporedba izražaja α -SMA biljega miofibroblasta	57
5. RASPRAVA.....	59
5.1. Stope preživljenja.....	60
5.2. Imunofluorescencijska analiza rezova tkiva.....	61
5.2.1. Analiza infiltracije makrofaga.....	61
5.2.2. Analiza aktivnosti miofibroblasta	63
5.3. Utjecaj nealkoholnih komponenti vina	64
5.4. Mehanizmi djelovanja sastojaka bijelog vina	65
5.4.1. Preživljenje.....	65
5.4.2. Polarizacija makrofaga	65
5.4.2. Fibroziranje	66
6. ZAKLJUČCI.....	67
7. OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA	69
8. LITERATURA.....	72

9. SAŽETAK.....	87
10. SUMMARY	90
11. ŽIVOTOPIS	93

POPIS OZNAKA I KRATICA:

α-SMA	<i>engl. alpha smooth muscle actin</i>
AP-1	<i>engl. Activator protein 1</i>
ATP	<i>engl. Adenosine triphosphate</i>
AV	<i>engl. Atrioventricular</i>
CD	<i>engl. Cluster of differentiation</i>
CRP	<i>engl. C-reactive protein</i>
CTGF	<i>engl. Connetive tissue growth factor</i>
DAMP	<i>engl. Damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	<i>engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DNA	<i>engl. Deoxyribonucleic acid</i>
ECGC	<i>engl. Epigallocatechin-3-gallate</i>
EKG	Elektrokardiogram
GAE	<i>engl. Gallic acid equivalents</i>
GDF15	<i>engl. Growth differentiation factor 15</i>
GM-CSF	<i>engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
H&E	<i>engl. Hematoxylin and eosin</i>
HDL	<i>engl. High-density lipoprotein</i>
HMGB1	<i>engl. High – mobility group box-1</i>
HNP-1	<i>engl. Human neutrophil peptide-1</i>
ICAM-1	<i>engl. Intercellular adhesion molecule-1</i>
IL	<i>engl. Interleukin</i>
IM	infarkt miokarda
IRF	<i>engl. Interferon regulatory factor</i>
IκB	<i>engl. Inhibitor of nuclear factor kappa B</i>

KVB	kardiovaskularne bolesti
LAD	<i>engl. Left anterior descending artery</i>
LDL	<i>engl. Low-density lipoprotein</i>
MAPK	<i>engl. Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>engl. Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	<i>engl. Macrophage colony-stimulating factor</i>
MMP	<i>engl. Matrix metalloproteinase</i>
MPO	<i>engl. Myeloperoxidase</i>
NF-κB	<i>engl. Nuclear factor kappa B cells</i>
NGAL	<i>engl. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NLR	<i>engl. Nucleotide – binding oligomerization domain – like receptors</i>
NLRP3	<i>engl. nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3</i>
Nrf2	<i>engl. nuclear factor erythroid 2 – related factor 2</i>
PBS	<i>engl. Phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>engl. Pattern recognition receptor</i>
RAGE	<i>engl. Receptor for advanced glycation endproducts</i>
RNA	<i>engl. Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>engl. Reactive oxygen species</i>
SIRT1	<i>engl. Sirtuin 1</i>
STAT	<i>engl. Signal transducer and activator of transcription</i>
TGF-β	<i>engl. Transforming growth factor-beta</i>
TLR	<i>engl. Toll like receptor</i>
TNF-α	<i>engl. Tumor necrosis factor alpha</i>
TRP	<i>engl. Transient receptor potential channel</i>
VEGF	<i>engl. Vascular endothelial growth factor</i>

1. UVOD

1.1. Epidemiološki podatci o kardiovaskularnim bolestima

Kardiovaskularne bolesti (KVB) glavni su uzrok smrtnosti širom svijeta. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), 30-35% svih smrtnih slučajeva povezano je s KVB, koje su također vodeći uzrok morbiditeta [1]. Stoga, liječenje KVB-ova predstavlja globalni javnozdravstveni izazov, posebno u razvijenim i zemljama u razvoju, ali i financijsko opterećenje za pacijente i zajednicu [2,3].

KVB obuhvaćaju širok spektar oboljenja srca i krvnih žila, među kojima su akutni infarkt miokarda (IM), moždani udar, periferna arterijska bolest, zatajenje srca, bolesti srčanih zalistaka, reumatska bolest srca, prirođene srčane mane, duboka venska tromboza i plućna embolija. IM odgovoran je za 85% smrtnih slučajeva povezanih s KVB, što u apsolutnim brojkama iznosi oko 15,2 milijuna smrtnih slučajeva godišnje širom svijeta [1]. Iako je u pojedinim istraživanjima primijećen blagi pad stope smrtnosti zahvaljujući kvalitetnijoj zdravstvenoj skrbi, istovremeno dolazi do povećanja broja pacijenata koji razvijaju zatajenje srca kao jednu od ozbiljnih komplikacija IM-a [4]. Zatajenje srca nastaje uslijed promjena u arhitekturi srca, a samim time i njegovoj funkciji što je u literaturi poznato kao „remodeliranje klijetke“ [5,6]. Promjene se događaju na staničnoj i molekularnoj razini, kako u zdravom tako i u nekrotičnom tkivu. Kao posljedica remodeliranja, dolazi do hipertrofije miokarda, proširenja klijetke te postupnog slabljenja sistoličke funkcije. Ono što bitno utječe na opsežnost postinfarktnog remodeliranja je veličina infarciranog tkiva te primjereno trajanje pojedinih faza cijeljenja nakon preboljelog IM [7]. Pored visoke stope smrtnosti i srčanog zatajenja, IM može uzrokovati druga potencijalno životno ugrožavajuća stanja poput aritmija, kardiogenog šoka, postinfarktnog sindroma, ruptur srčane stijenke i druge [8]. Dugotrajne komplikacije, kao što su hipertrofija miokarda, aritmije, mitralna regurgitacija, ventrikularne aneurizme, te razvoj psihijatrijskih bolesti poput depresije i anksioznosti, dodatno mogu otežati funkcioniranje pacijenata sa srčanim bolestima [9–11].

Do sada su istraženi mnogi rizični čimbenici koji doprinose razvoju KVB. Čimbenici se mogu podijeliti na nepromjenjive, kao što su starija životna dob (>45 godina za muškarce, >55 godina za žene), muški spol, pozitivna obiteljska anamneza, pripadanje određenim etničkim skupinama, te na promjenjive, među kojima je najistaknutija hipertenzija. Ostali promjenjivi rizični čimbenici uključuju aspekte povezane sa sjedilačkim načinom života, poput smanjene tjelesne aktivnosti, nezdrave prehrane, pretilosti, povišenog kolesterola, šećerne bolesti, pušenja, stresa, zagađenja okoliša i prekomjerne konzumacije alkohola [10–14].

1.2. Infarkt miokarda

1.2.1. Patološki i patofiziološki mehanizmi nastanka infarkta miokarda

IM ozbiljno je kliničko stanje koje nastaje zbog naglog smanjenja ili potpunog prekida protoka krvi kroz koronarne arterije prema srčanom mišiću. Ovaj poremećaj u opskrbi krvlju najčešće je uzrokovan aterosklerotskim plakom unutar koronarne arterije [11,15]. Plak se može postupno povećavati tijekom vremena i ograničiti protok krvi ili može puknuti fibrozna kapa na plaku nakon čega sadržaj unutar plaka pokrene mehanizme koji dovode do stvaranja tromba te time začepljenja koronarne arterije što rezultira razvojem akutnog IM-a [16]. Promjene poput prekida aerobnog metabolizma, iscrpljivanje kreatin fosfata, početak anaerobne glikolize i nakupljanje produkata anaerobnog metabolizma nastaju već 8 do 10 sekunda poslije okluzije koronarne arterije [16]. Dugotrajna ishemijska ozljeda srčanog mišića u trajanju duljem od 20 minuta dovodi do nepovratnog oštećenja stanica, što nakon otprilike 40 do 60 minuta od okluzije rezultira nastankom koagulacijske nekroze [16–18]. Tijekom ovog procesa, kardiomiociti gube svoje jezgre, ali obrisi stanica ostaju očuvani nekoliko dana nakon ozljede. Citoplazma stanica postaje izrazito acidofilna zbog denaturacije proteina, što je karakteristično za ovaj tip nekroze. Ovaj proces označava početak strukturnih promjena u srčanom tkivu, odnosno razvoja sterilne upale [19] uz postupnu razgradnju mrtvih stanica te kasnije proces cijeljenja i zamjene tkiva fibrozim ožiljkom [17]. Osim nekroze, gubitak kardiomiocita dodatno potiče i popratna apoptoza tih stanica [17]. Upalne stanice urođenog i stečenog imuniteta, koje sudjeluju u procesu cijeljenja, ne samo što se uobičajeno „bore“ protiv patogenih mikroorganizama, nego imaju sposobnost prepoznavanja „signala opasnosti“ koji se oslobađaju iz odumrlih stanica ili oštećenih izvanstaničnih fragmenata [17]. Ove stanice aktiviraju upalne kaskade i putove, što se upravo događa tijekom trajanja IM-a. Budući da ljudsko srce ima vrlo ograničen endogeni kapacitet za regeneraciju u usporedbi s drugim stanicama u tijelu, a taj kapacitet opada s godinama, evidentno je da će značajan gubitak srčanog tkiva rezultirati stvaranjem ožiljkastog tkiva [20]. Utvrđeno je da prekomjerna rana upalna reakcija, koja pretjerano razgrađuje izvanstaničnu tvar i uzrokuje smrt zdravih kardiomiocita, može dovesti do ruptуре stijenke zahvaćene klijetke, a preveliko stvaranje proupalnih citokina može uzrokovati dodatnu apoptozu kardiomiocita. S druge strane, produžena upala narušava pravilno odlaganje kolagena, što rezultira stvaranjem slabijeg ožiljka i razvojem dijastoličke kardiomiopatije, što dodatno pogoršava srčanu funkciju [21]. Upravo iz tih razloga bitno je da se proces reparativne fibroze odvija dovoljno brzo kako bi se očuvala strukturna cjelovitost srca. Uzimajući u obzir navedeno, od izuzetne je važnosti uskladiti prostorni i vremenski razvoj upalne i reparativne faze kako bi se osiguralo optimalno cijeljenje srca i minimizirale potencijalne komplikacije nepovoljnog remodeliranja klijetki [22,23]. Taj složeni

proces uzrokovan IM-om odlikuje se morfološkim promjenama strukture i oblika klijetki koje dovode do nepovoljnih promjena u srčanoj funkciji [5]. Pojam „remodeliranje nakon IM“ po prvi put su upotrijebili Hochman i Bulkley 1982. godine kako bi opisali ožiljne promjene srčanog tkiva nakon preboljelog IM-a [24]. Kako te promjene utječu na preživljenje pacijenata i na srčanu funkciju, dodatno su 1990. godine opisali Pfeffer i Braunwald [25]. Najizrazitije promjene koje nastaju su gubitak ishemijom zahvaćenih kardiomiocita te hipertrofija preostalih kardiomiocita uz te hiperplaziju srčanih fibroblasta i promjene u građi i funkciji koronarne vaskulature [26]. Tijekom godina razvijena je definicija remodeliranja srca koja se odnosi na morfološke i geometrijske promjene lijeve klijetke nakon IM-a. Ova definicija obuhvaća skup molekularnih, staničnih i intersticijskih promjena koje dovode do prilagodbi u veličini, obliku i funkciji srca uslijed srčane ozljede. Navedene promjene u konačnici mogu rezultirati nepovoljnom intersticijskom fibrozom u neinfarciranom tkivu i time dodatno pogoršati zatajenje srca. Remodeliranje može biti koncentrično gdje dolazi do sistoličke disfunkcije i ekscentrično koja uzrokuje dijastoličku disfunkciju, a remodeliranjem nakon IM-a dolazi do sistoličke i dijastoličke disfunkcije zbog promjena u novonastalom fibroznom tkivu [27] čime raste rizik za razvoj aritmija [28].

1.2.2. Stanične promjene tijekom ishemije

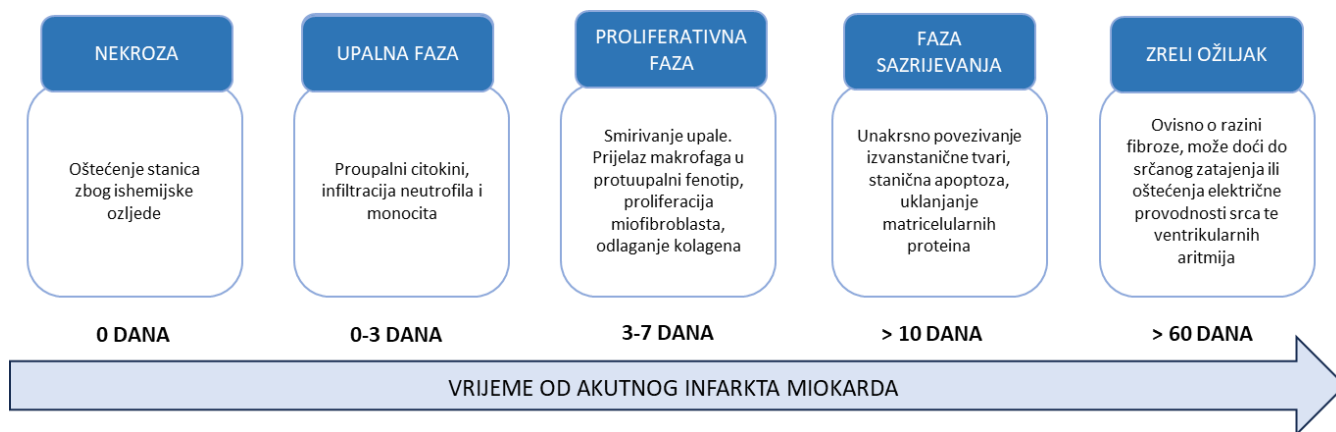
Nakon trajnog začepljenja (okluzije) koronarne krvne žile koja u većini slučajeva (40-50%) pogađa prednju interventrikularnu granu lijeve koronarne arterije (LAD – engl. left anterior descending artery), nastaje ishemija srčanog tkiva [11,16,29]. U normalnim uvjetima proizvodnja energije u srcu nastaje metaboliziranjem slobodnih masnih kiselina i ugljikohidrata kroz β -oksidaciju i glikolizu, nakon čega metaboliti ulaze u Krebsov ciklus u mitohondrijima gdje se energija stvara oksidativnom fosforilacijom, najčešće u obliku ATP (engl. adenosine triphosphate) [16,30]. Stoga u slučaju ishemije srca tijekom IM, stanice prelaze na anaerobnu glikolizu, kako bi generirale energiju, što rezultira nakupljanjem laktata. Iako se laktat u početku iskorištava za manje učinkovitu proizvodnju ATP-a uz manju učinkovitost, veće nakupljanje laktata unutar stanice smanjuje unutarstanični pH što dovodi do inhibicije glikolitičkih enzima i do daljnjeg smanjenja stvaranja energije. Smanjenje razine ATP-a također utječe na funkciju Na^+ - K^+ ATP-aze i Ca^{2+} ionskih pumpi u sarkoplazmatskom retikulumu, čime se nagomilava unutarstanični natrij i kalcij, a posljedično i voda koja uzrokuje bubrenje stanice i staničnih organela [16]. Povišene razine kalcija u citoplazmi aktiviraju enzime poput kalpaina, proteaza i lipaza, koji oštećuju stanične strukture, uključujući kontraktilni aparat i mitohondrije [31,32]. To može potaknuti otpuštanje proapoptotičkih čimbenika iz mitohondrija i voditi prema apoptozi, nekrozi te autofagiji [16,30,33–35].

Zbog navedenog poremećaja rada mitohondrija u infarciranom tkivu dolazi do nakupljanja reaktivnih kisikovih radikala, koje endogeni antioksidansi nisu u mogućnosti neutralizirati. ROS (engl. reactive oxygen species) su molekule na koje se veže kisik i posjeduju jedan ili više nesparena elektrona što ih čini visoko reaktivnima, a nastaju kao nusprodukti tijekom aerobnog metabolizma (naročito u mitohondrijima tijekom oksidativne fosforilacije) [36]. Iako su u manjoj količini bitni za određene fiziološke procese poput stanične signalizacije i regulacije upalnog odgovora, a bivaju neutralizirani razgradnjom pomoću enzima (katalaza, glutation peroksidaza i superoksid dismutaza) kao i unutarstaničnih antioksidansa [37]. Ukoliko su prisutni u većoj mjeri, kao u slučaju ishemije, ili nedovoljno neutralizirani dovode do oksidativnog stresa koji može imati pogubne posljedice za staničnu funkciju. ROS može oštetiti sarkoplazmatski retikulum, uzrokovati povećanje unutarstaničnog kalcija, hiperkontraktilnost i smrt kardiomiocita, te poticati infiltraciju neutrofila i pospješiti razvoj upale i time može uzrokovati oštećenje većeg broja kardiomiocita, najvjerojatnije preko NF- κ B (engl. Nuclear factor kappa B cells) signalnog puta [36]. Odumiranjem i raspadom kardiomiocita oslobađaju se unutarstanične komponente, koje uz fragmente oštećene izvanstanične tvari potiču aktivaciju raznih signalnih putova imunskog sustava [17]. Hipoksija, osim što utječe na kardiomiocite, narušava i barijernu funkciju endotelnih stanica krvnih žila i time dolazi do hiperpermeabilnosti membrane, što omogućava infiltraciju ozlijeđenog srčanog tkiva leukocitima [38–40].

1.3. Faze i mehanizmi cijeljenja infarkta miokarda

Iako nisu strogo odvojive jedna od druge, cijeljenje nakon IM zbog jasnoće prikaza može se podijeliti u tri preklapajuće faze [17,41,42] (Slika 1):

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



Slika 1: Faze cijeljenja IM-a.

1.3.1. Akutna upalna (inflamatorna) faza

Prva, upalna (inflamatorna) faza cijeljenja započinje odmah nakon IM-a nekrozom srčanog tkiva. Nekrotične stanice srca, kao i oštećena izvanstanična tvar oslobađaju posrednike (medijatore) koji djeluju kao signali opasnosti čime se aktivira upalni odgovor. Za vrijeme ove faze dolazi do jakog prožimanja (infiltracije) tkiva neutrofilima i proupalnim monocitima koji fagocitozom „čiste“ mrtve stanice i stanične fragmente. Kod svih sisavaca ova faza započinje sat vremena nakon nastanka IM-a, ali traje različito dugo, time da kod velikih sisavaca traje 96 sati, a kod manjih, poput štakora, traje 48 sati [43]. To je uvjetovano razlikama u metabolizmu, životnom vijeku životinja, kao i razlikama u dinamici aktivacije imunološkog sustava [41].

Stanično signaliziranje od nekroze do aktivacije leukocita

Uslijed dugotrajne ishemije nakon IM-a dolazi do oslobađanja unutarstaničnog sadržaja iz odumrlih i raspadnutih kardiomiocita i iz ostalih oštećenih stanica srčanog tkiva. Akumuliranje tog sadržaja i fragmenata izvanstanične tvari uzrokuje oslobađanje tzv. „signala opasnosti“, poznatih kao DAMP medijatori (engl. Danger – associated molecular patterns). Ovi medijatori ključni su za aktivaciju upalne kaskade koja slijedi nakon IM-a u okviru upalne faze cijeljenja, a njima pripadaju HMGB1 (engl. High – mobility group box – 1), S100 protein, IL-1 α (interleukina 1 α), heat shock proteina, fragmenata hijaluronske kiseline, jednolančane i dvolančane RNA, mitohondrijske DNA i drugi [40,44,45]. Navedeni endogeni ligandi vežu se na PRR (engl. Pattern recognition receptor) kao što je TLR (engl. Toll like receptor), transmembranski receptor prisutan na stanicama imunološkog sustava, te na NLR (engl. Nucleotide – binding oligomerization domain – like receptors) ili RAGE (engl. Receptor for advanced glycation end – products) [44].

TLR predstavlja obitelj transmembranskih receptora koji se dijele u dvije grupe, ovisno o ligandima koji se na njih vežu i o njihovoj lokaciji. Istraživanja na miševima pokazala su da knockout miševi za TLR2 ili TLR4, receptore koji su prisutni u ishemijskoj ozljedi miokarda, imaju smanjenu upalnu reakciju nakon IM-a, što rezultira manjom infiltracijom upalnih monocita te manjom veličinom infarkta i u konačnici poboljšanom funkcijom srca nakon oporavka [46].

Kod ljudi postoje 22 vrste NLR unutarstaničnih receptora. Svima im je zajednička središnja domena, a njihovim udruživanjem nastaju kompleksi visoke molekulske mase, poznati kao inflamasom. Inflamasom je citosolni multiproteinski kompleks koji ima zadaću potaknuti upalni odgovor stanica urođenog imunološkog sustava nakon ishemijske ozljede miokarda [47]. Aktivira se i u leukocitima i u fibroblastima te potiče sintezu pojedinih citokina i posljedično infiltraciju upalnih stanica čime pospješuje razvoj upale [48]. Sastoji se od receptora kao što su NLRP1, NLRP3 (engl. nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3) i drugi, a aktivira se putem komplementa C3a [49], prisutnošću niskog pH, ROS ili povećanjem izvanstaničnog Ca^{2+} [50] te prepoznaju potencijalno štetne stimuluse i sklapaju se u kompleks koji aktivira kaspazu 1 [17]. Aktiviranjem kaspaze 1, enzima koji dovodi do razgradnje pro-IL-1 β i pro-IL-18, pojavljuju se aktivni oblici interleukina koji potiču upalni odgovor. Uzevši u obzir ulogu kaspaze-1 u akumuliranju aktivnih oblika citokina, njezinom inhibicijom dolazi do smanjenja ozljede nakon IM-a [51]. Ono što je tipično za inflammasom je da može uzrokovati upalni oblik stanične smrti, piroptozu, u mijeloidnim stanicama, najčešće nakon infekcija [52,53]. Osobine ovog oblika stanične smrti su pucanje membrane, ulazak vode u stanicu, bubrenje stanica i liza stanice te posljedično oslobađanje proupalnog sadržaja [52]. Iako dolazi do razgradnje DNA i kondenzacije jezgre, integritet stanice ostaje očuvan. Utvrđeno je da aktivacija i drugih PRR iz NLR obitelji receptora potiče apoptozu kardiomiocita i posljedično dovodi do pogoršanja srčane funkcije te povećanja opsežnosti srčane fibroze [54]. Studije s knockout miševima na NLRP3 receptor utvrdile su poboljšanje srčane funkcije i smanjene veličine infarkta [55], a slični su rezultati zabilježeni uklaňanjem gena za kaspazu 1 [47].

RAGE je transmembranski receptor koji, poput drugih receptora, može prepoznati različite signale opasnosti koji se javljaju nakon oštećenja tkiva. Slično drugim receptorima, miševi bez RAGE receptora (knockout miševi) pokazuju poboljšano cijeljenje nakon IM-a [56], uz smanjenu vjerojatnost razvoja srčanog zatajenja.

Aktivacija PRR pokreće složene signalne putove koji aktiviraju MAPKs (engl. Mitogen – activated protein kinases), IRF (engl. Interferon regulatory factors) te NF- κ B što dovodi do promjena u izražaju

gena odgovornih za proupalne citokine, kemokine, stanične adhezijske molekule i druge molekule uključene u upalni odgovor [44].

NF- κ B se ističe svojom važnom ulogom u regulaciji upalnih procesa, preživljenju stanica djelujući kao antiapoptotski čimbenik [57]. Aktivacija NF- κ B nastaje vezivanjem DAMP medijatora za PRR receptore stanica, što pokreće proces fosforilacije i razgradnje inhibitora poznatih kao I κ B proteini. Ovi inhibitori drže NF- κ B u inaktivnom obliku unutar citoplazme gotovo svih tipova stanica [57,58]. Kada se I κ B proteini razgrade uz pomoć I κ B kinaze, NF- κ B se oslobađa iz citosola i migrira u jezgru stanice, gdje utječe na aktivaciju specifičnih gena. Obitelj proteina NF- κ B sastoji se od nekoliko podjedinica, najčešće p65, p50, p52, RelB i c-Rel koje formiraju dimere [58]. Ove podjedinice se vežu na specifične DNA elemente u promotorima ciljanih gena kako bi aktivirale njihovu transkripciju, uključujući i gene za citokine poput interleukina (IL-1 i IL-6) i TNF- α (engl. Tumor necrosis factor alpha) [58]. Ukoliko je povećana aktivacija ovog čimbenika, može doći do pogoršanja upale zbog jačeg oštećenja izvanstanične tvari pomoću MMP-ova (engl. Matrix metalloproteinase), osobito MMP2 i MMP9 [59], enzima koji razgrađuju bilo koji protein koji izgrađuje izvanstaničnu tvar [58]. Pored toga, NF- κ B igra značajnu ulogu u regulaciji izražaja adhezijskih molekula na stanicama. Njegovom aktivacijom promiče se transkripcija gena koji kodiraju integrine neophodne za migraciju leukocita te selektine koji su ključni u procesu prijanjanja leukocita na endotelne stanice i njihovu ekstravazaciju. Ovi procesi su bitni za međustaničnu komunikaciju i interakciju s izvanstaničnom tvari. Aktivacija IL-1 potiče sintezu kemokina i infiltraciju leukocita u srčano tkivo, a pored njega bitnu ulogu u regulaciji odgovora na ishemijsku ozljedu imaju i proupalni medijatori IL-6 te TNF- α .

Oslobađanje DAMP i ROS medijatora aktivira i endotelne stanice koje također doprinose proizvodnji proupalnih citokina i kemokina, privlačeći leukocite u oštećeno područje. CC i CXC kemokini, koji privlače mononuklearne stanice i neutrofile, vežu se na glikozaminoglikane na endotelu i izvanstaničnoj tvari, osiguravajući njihovu visoku koncentraciju točno u infarciranom tkivu [60]. Profil kemokina određuje redoslijed dolaska imunskih stanica, stoga neutrofile stižu prvi, a slijede ih monociti i limfociti [17].

Proupalni citokini, kemokini i komplement

Nakon aktivacije upalnih stanica i endotelnih stanica dolazi do pojačane proizvodnje citokina, kemokina i adhezijskih molekula koje omogućavaju infiltraciju tkiva upalnim stanicama. Citokini su mali proteini koji igraju ključnu ulogu u komunikaciji između stanica imunološkog sustava, a njihova raznovrsnost i pleiotropnost omogućuju im modulaciju širokog spektra bioloških mehanizama. Ova

osobina znači da jedan citokin može djelovati na različite vrste stanica, dok više citokina može imati preklapajuće učinke na iste stanice, ponekad sa sličnim, a ponekad i suprotnim ishodima [61]. Osim toga, citokini imaju sposobnost samoprodukcije, najčešće putem pozitivne povratne sprege, djelujući na NF- κ B [62]. Citokini se mogu podijeliti prema funkciji u tri glavne skupine: proupalni citokini, protuupalni citokini i citokini stečenog imuniteta. Nakon IM-a, dolazi do izlučivanja proupalnih citokina kao što su IL-1, TNF- α , IL-6 i IL-18 [42]. Njihova aktivacija nastaje putem signalizacije MAPK i NF- κ B, uz parakrinu signalizaciju koja prenosi upalni proces na okolne stanice i potiče infiltraciju leukocita koji proizvode te citokine. Unatoč brojnim istraživanjima koja su pokazala da inhibicija izražaja pojedinih citokina može dovesti do povoljnijih ishoda nakon IM-a, postoje i studije koje sugeriraju suprotno. Takvi rezultati ukazuju da inhibicija određenih citokinskih putova može imati i pozitivne [63] i negativne posljedice [64], što otvara prostor za daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjela njihova uloga u procesu cijeljenja nakon IM-a.

Kemokini, mali proteini iz obitelji citokina, imaju ključnu ulogu u patogenezi IM-a kroz regulaciju migracije i aktivacije leukocita. Oslobađaju ih nekrotični kardiomiociti i aktivirane endotelne stanice te djeluju kao kemoatraktanti za imunološke stanice.

Na temelju strukture i funkcije dijele se u dvije skupine:

1. Homeostatski kemokini koji održavaju normalne fiziološke procese, poput migracije limfocita u limfne čvorove i lokalizacije antigen-prezentirajućih stanica u limfnim organima. Primjeri tih kemokina su CCL19 i CCL21.
2. Upalni kemokini koji se stvaraju tijekom upale ili infekcije kao odgovor na podražaje poput IL-1 ili TNF- α . Uloga im je privlačenje leukocita na mjesto ozljede i pojačavanje upalnog odgovora. Primjeri tih kemokina su CXCL8 /IL-8, koji potiče migraciju neutrofila, CCL2 /MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), koji privlači monocite i matične stanice važne za regeneraciju tkiva [65], te CCL5 i CXCL10 koji pogoduju infiltraciji T i B limfocita.

Kemokini dodatno aktiviraju imunološke stanice, potičući ih na oslobađanje proteolitičkih enzima ili ROS-a što pojačava upalni odgovor. Također potiču proizvodnju proupalnih citokina i kemokina te reguliraju proliferaciju i diferencijaciju imunoloških stanica, primjerice diferencijaciju T stanica u efektorske stanice ili stimulaciju B stanica na proizvodnju antitijela. Kemokini povećavaju propusnost krvnih žila čineći ih hiperpermeabilnima, a njihovo djelovanje često je sinergističko s citokinima [66]. Gore navedeni čimbenici kemokine čine značajnim regulatorima upale i reparativnih procesa nakon IM-a. Izražaj proupalnih citokina i kemokina utišava se pomoću djelovanja

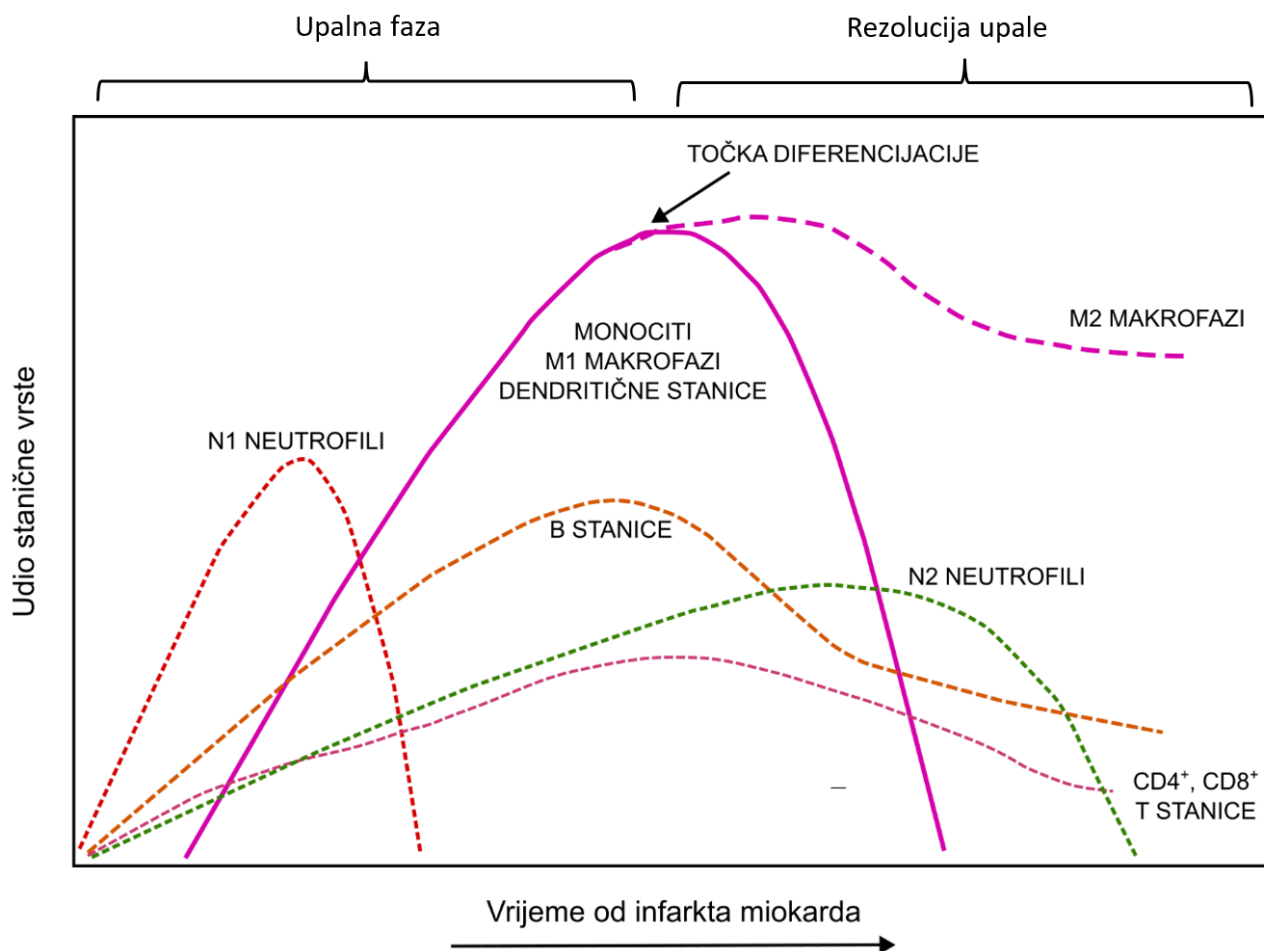
matricelularnih proteina iz rubnih dijelova infarciranog tkiva preko TGF- β (transforming growth factor-beta) signaliziranja [67].

Usporedno s ovim događajima dolazi i do aktivacije komplementa i njegove kaskade [68]. Signali opasnosti aktiviraju komplement putem klasičnog, alternativnog i lektinskog puta, čime se oslobađaju komponente komplementa poput C1, C3 i C4. Glavne uloge aktivacije ovog puta su omogućavanje migracije imunoloških stanica i proizvodnja proupalnih citokina [69]. Jasno je da će prekomjerna aktivacija tijekom cijeljenja dovesti do dodatnih oštećenja tkiva i pogoršati prognozu kod oboljelog.

Infiltracija neutrofila u infarcirano tkivo

S obzirom na izrazito dobru prokrvljenost srčanog tkiva, endotelne stanice predstavljaju najbrojnije nekardiomiocitne stanice u miokardu i mjesta su stvaranja najvećeg broja proupalnih medijatora. Izražaj adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica bitan je za regrutaciju upalnih leukocita u infarcirano područje, a u smjeru upalnog fenotipa aktiviraju ih DAMP medijatori [70]. Endotelne stanice počinju izražavati P-selektin i E-selektin (u ishemičnom području) na površini stanice koji se zatim veže na L-selektin na neutrofilima što omogućava početno „hvatanje“ neutrofila iz krvotoka i uzrokuje njihovo „kotrljanje“ po površini endotelnih stanica [39]. Čimbenik koji aktivira trombocite potiče izražaj integrina na površini neutrofila koji se kasnije vežu na ICAM-1 (engl. Intercellular adhesion molecule-1) na endotelnim stanicama. Ovom interakcijom neutrofilu se čvrsto vežu za endotelne stanice i u potpunosti zaustavljaju kotrljanje [17]. Nakon čvrste adhezije slijedi ekstravazacija neutrofila u infarcirano područje koja je posredovana aktivacijom kinaza koje fosforiliranjem prekidaju komunikaciju između endotelnih stanica, čime dolazi do povećanja permeabilnosti [71]. Ovim procesom aktiviraju se brojni proteolitički enzimi i oslobađaju proupalni medijatori, kao što je IL-17 kojeg proizvode neutrofil čime pridonose vlastitoj infiltraciji u srčano tkivo te time pojačavaju upalni odgovor [72]. S obzirom da je infiltracija najizrazitija u rubnoj zoni infarkta [42], neutrofilu mogu imati citotoksični učinak na viabilne kardiomiocite [73] jer oslobađaju proupalne citokine, a također aktiviraju MMP-ove. Neutrofilu su prve mijeloidne stanice koje migriraju u infarcirano područje [39] kao odgovor na kemotaktične signal s ciljem „čišćenja“ mrtvih stanica i izvanstaničnog otpada (debrisa) unutar prva 24 sata nakon nastanka IM-a (Slika 2). Dijele se na dva pod-tipa: proupalne N1 neutrofile koji prvi migriraju u infarcirano tkivo aktivacijom TLR4 receptora, i protuupalne N2 neutrofile koji sudjeluju u reparaciji tkiva [74]. Neutrofilni HNP1 (engl. Human neutrophil protein 1) uz trombocitni CCL5 sinergistički potiču migraciju monocita u infarcirano područje [75]. Unatoč tome što pretjerana infiltracija neutrofilima dovodi do nepovoljnog cijeljenja i povećava rizik od razvoj aritmija, najčešće zbog izlučivanja MPO (engl. Myeloperoxidase)

[76] i poticanjem djelovanja MPP-ova, neutrofili mogu poticati polarizacije prema M2 fenotipu makrofaga [77].



Slika 2: Relativna učestalost pojave različitih vrsta upalnih stanica u infarciranom tkivu s obzirom na vrijeme proteklo od trenutka infarkta.

Infiltracija proupalnih monocita

Tijekom akutne upalne faze cijeljenja infarcirano tkivo iz cirkulacije infiltriraju i proupalni monociti 24 do 48 sati nakon IM-a, za kojima slijede limfociti. Na isti način se regrutiraju iz cirkulacije kao neutrofili i ekstravazacijom migriraju u srčano tkivo [19,78]. Njihov životni vijek je relativno kratak, 1 do 3 dana, no kad se diferenciraju unutar tkiva u makrofage mogu živjeti tjednima ili mjesecima, ovisno o potrebi za reparacijom tkiva i o mikrookolišu. Uloga makrofaga je čišćenje nekrotičkog tkiva, oslobađanja proupalnih medijatora, ali i poticanje reparativnih procesa kroz stvaranje proangiogenih spojeva [78,79]. Nekoliko ključnih molekula potiču infiltraciju monocita u

srčano tkivo. Prvo, kemokin MCP-1 putem receptora CCR-2 privlači monocite na mjesto ozljede. Zatim, citokini poput M-CSF (engl. Macrophage colony-stimulating factor) i GM-CSF (engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) potiču diferencijaciju monocita u makrofage. Oni imaju suprotan učinak na polarizaciju makrofaga, time da M-CSF polarizira prema M2 fenotipu, dok GM-CSF potiče polarizaciju prema M1 fenotipu makrofaga [80].

Citokini TNF- α i IL-1 povećavaju adheziju monocita na endotelne stanice i olakšavaju njihovu migraciju u oštećeno srčano tkivo [81], a aktivacija komplementa pomaže u regrutaciji svih vrsta leukocita, uključujući i monocite [49]. DAMP-ovi i ROS također doprinose ovom procesu, zajedno s drugim spojevima koji moduliraju upalni odgovor [82,83]. S obzirom da diferencirani makrofazi mogu izlučivati različite medijatore, predstavljaju vrlo heterogenu skupinu i stoga čine funkcionalno najplastičniju skupinu mijeloidnih stanica budući da sudjeluju kao središnje figure u uređenom imunitetu u prvoj liniji obrane migrirajući u ozlijeđeno tkivo te aktivno sudjeluju u cijeljenju tkiva. U ranoj upalnoj fazi monociti se diferenciraju prema M1 upalnom fenotipu makrofaga i samim time utječu na pojačanje upalne reakcije. Njihov fenotip je podložan promjeni u ovisnosti o citokinskom mikrookolišu u kojem se nalaze te u prisutnosti određenih čimbenika rasta. Igraju ključnu ulogu u čišćenju nekrotičnog tkiva i poticanju reparativnih procesa. U miljeu gdje su pretežito izraženi protuupalni medijatori (IL-10 i TGF- β) dolazi do procesa „polarizacije makrofaga“ pri čemu mijenjaju svoj upalni fenotip (M1) prema reparativnom fenotipu (M2) te tada djeluju kao negativni regulatori upale (inhibitori) [22,23,42,84,85].

Kod štakora su dokumentirane tri subpopulacije monocita:

- Klasični monociti s niskim izražajem CD43, najzastupljeniji i najučinkovitiji u fagocitozi te uključeni u upalni odgovor.
- Neklasični monociti s visokim izražajem CD43, manje su zastupljeni, a imaju protuupalne funkcije i uključeni su u reparaciju tkiva i regulaciju upalnog odgovora.
- Intermedijarni monociti koji imaju karakteristike i klasičnih i neklasičnih monocita [86].

Monociti koji infiltriraju srčano tkivo dolaze iz koštane srži, ali također i iz slezene koja može poslužiti kao veliki rezervoar mononuklearnih stanica za vrijeme upale [87].

Infiltracija i aktivacija ostalih stanica u upalnoj fazi cijeljenja

Tijekom akutne upalne faze cijeljenja nakon IM-a, različite vrste stanica infiltriraju srčano tkivo, svaka s važnom ulogom u procesu oporavka. Najprisutnije stanice su neutrofili, a zatim

proupalni makrofazi. Trombociti se također brzo nakupljaju u području ozljede, a doprinose formiranju fibrinskog matriksa te oslobađaju razne citokine, kemokine i čimbenike rasta te aktiviraju komplement. Njihova uloga nije još uvijek dovoljno istražena [88]. U ozljeđeno tkivo migriraju i T limfociti, dodatno pojačavajući upalu sa svojim citotoksičnim učincima na zdrave kardiomiocite [89], ali istovremeno se stvaraju i regulatorni CD4/CD25 T-lifmociti čija je funkcija suprotna tome, tj. djeluju kao inhibitori upale [90] putem izlučivanja protuupalnih medijatora kao što su IL-10 i TGF- β [91]. Osim ovih stanica, aktiviraju se i fibroblasti, koji su u većem broju prisutni tek u proliferativnoj fazi, te endotelne stanice koje također moduliraju cijeljenje putem upalnih ili protuupalnih medijatora [70]. U patološkim stanjima poput IM-a, mastociti, koji se nalaze u perivaskularnom prostoru, degranulacijom oslobađaju upalne medijatore koji se inače nalaze u inaktivnom obliku [92,93]. Interakcije između različitih tipova stanica pomažu u čišćenju oštećenog tkiva, regulaciji upale i poticanju procesa cijeljenja i prelaska u proliferativnu fazu cijeljenja.

1.3.2. Proliferativna faza cijeljenja

Proliferativna faza cijeljenja IM-a započinje nakon akutne upalne faze. Obično počinje kod velikih sisavaca, poput ljudi, između 4. i 7. dana nakon IM-a, a traje najčešće do 14 dana. S druge strane, kod manjih sisavaca, poput štakora, ova faza započinje nešto ranije, već 48 sati nakon IM-a i traje najčešće do 5 dana [41]. Ključni događaji unutar ove faze su stvaranje granulacijskog tkiva koje se sastoji od makrofaga, miofibroblasta, novostvorenih krvnih žila i novonastale izvanstanične tvari, zatim infiltracija fibroblastima koji dalje sintetiziraju proteine izvanstanične tvari te angiogeneza. Ovi procesi se zbivaju paralelno i sinergistički stišavaju proupalne signale koji omogućavaju preusmjerenje makrofaga prema M2 reparativnom tipu (Slika 2), čime se smanjuje upala i omogućuje cijeljenje. Svoju ulogu u ovom procesu imaju i T limfociti, osobitno pomagački T-limfociti i regulatorni T limfociti koji također potiču cijeljenje i rezoluciju upale [41,43,94].

Inhibicija i rezolucija upalnog odgovora događa se uz pomoć raznih stanica, neutrofila, makrofaga, T limfocita, vaskularnih stanica, kardiomiocita i fibroblasta.

Neutrofili

Neutrofili su kratkoživeće stanice budući da nakon infiltriranja oštećenog područja ubrzo podliježu apoptozi ili nekrozi [39], a njihovo uklanjanje preuzimaju makrofazi, čime se potiče suzbijanje upale reakcije. Apoptoza neutrofila može se odgoditi u prisutnosti upalnog mikrookoliša bogatog TNF- α ili IL-1 β , koji produžuju njihov životni vijek. Neutrofilna infiltracija obično se razrješava 3 do 7 dana nakon IM-a, kada većina neutrofila odumire i privlači makrofage putem

"pronađi me" molekula (lipidni medijatori i nukleotidi) te izražava "pojedi me" molekule (poput lizofosfatidilkolina), potičući tako vlastito uklanjanje [17,95].

Apoptotski neutrofili smanjuju upalu na dva načina: prvo, oslobađaju medijatore koji sprječavaju njihovo novačenje u ozlijeđeno područje (npr. annexin A1, laktoferin te lipidnih medijatora), a istovremeno potiču kemotaktičke signale za fagocite. Drugo, fagocitozom neutrofila od strane makrofaga aktiviraju se protuupalne signalne kaskade, koje rezultiraju povećanom proizvodnjom IL-10 i TGF- β . Čak i neutrofili proizvodnjom NGAL-a (engl. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) mogu poticati polarizaciju makrofaga prema M2 reparativnom fenotipu [39,77]. Iako su ovi mehanizmi staničnog signaliziranja već ranije poznati, nisu još dovoljno istraženi u okviru ishemijske ozljede srca.

Monociti i makrofazi

Nakon početne infiltracije neutrofilima, monociti i makrofagi postaju dominantne stanice u infarciranom tkivu [17,19,22,23], a njihova uloga ključna je za cijeljenje i formiranje ožiljka nakon IM-a. Uravnotežen upalni odgovor od presudne je važnosti za kvalitetu oporavka [22,23]. Makrofazi, kao središnji regulatori ovog procesa, pokazuju izrazitu fenotipsku i funkcionalnu heterogenost, omogućujući im koordinaciju i upalne i reparativne faze cijeljenja.

Infiltracija monocitima/makrofazima odvija se u dvije faze:

- U prvoj fazi (1-3 dana nakon IM-a) dominiraju proupalni monociti i M1 makrofazi, koji imaju snažan mikrobicidni kapacitet. Oni fagocitiraju mrtve stanice, djeluju proteolitički i luče proupalne medijatore poput TNF- α . Ovi klasično aktivirani makrofazi dijele se dalje na M1a i M1b podskupine koje imaju djelomično različita svojstva i stimulirani su drugačijim medijatorima [19,78]. Nakupljanje ove skupine makrofaga omogućeno je CCR2 signaliziranjem [96,97].
- U drugoj fazi (od 4., a s vrhuncem 7. dana kod većih sisavaca, a kod štakora i ranije) u većoj mjeri počinju biti prisutni protuupalni monociti i M2 makrofazi. Ove stanice izlučuju protuupalne, profibrotske i angiogene čimbenike poput TGF- β , IL-10 i VEGF (engl. Vascular endothelial growth factor) [98–100] te završavaju upalnu fazu promičući oporavak tkiva. Reparativni M2 makrofazi dalje se dijele na M2a, M2b, M2c i M2d podskupine [92]. Nakupljanje ove skupine monocita/makrofaga ostvaruje se CX3CR1 signaliziranjem [96].

Novija istraživanja o fazama infiltracije cirkulirajućih monocita pokazuju da obje faze potječu od upalnih monocita, ali se unutar proliferativne faze fenotip diferenciranih makrofaga unutar tkiva mijenja u reparativni tip [101]. Svakako, kratki životni vijek postiinfarktnih monocita (otprilike 20 sati) ukazuje na to da se fenotipska konverzija zbiva izrazito brzo [96].

S obzirom na postojanje mnogih podskupina makrofaga, Mosser i Edwards predlažu funkcionalnu podjelu makrofaga na proupalne i reparativne, pri čemu mikrookoliš ima ključnu ulogu u određivanju njihovog fenotipa. U mnogim istraživanjima pokazano je da je ranija polarizacija makrofaga prema M2 fenotipu povezana sa znatno kvalitetnijim cijeljenjem IM [22,23,102,103].

Pored navedenih subpopulacija makrofaga, u srcu se nalaze i rezidentni makrofazi, čiji je broj vrlo mali, a njihova uloga nije potpuno razjašnjena. Iako posjeduju karakteristike M2 fenotipa makrofaga, koji nastoje održati homeostazu i potiču oporavak tkiva, nedavna istraživanja sugeriraju da bi ove stanice mogle doprinositi srčanoj provodljivosti kod zdravih jedinki. Veći broj ovih stanica nalazi se u AV (engl. atrioventricular) čvoru s funkcijom ubrzavanja repolarizacije klijetki. Rezidentni makrofazi su povezani s kardiomiocitima pomoću propusnih veza koje sadrže koneksin-43 [104], što dodatno ukazuje na njihovu važnost u funkciji srca.

Prijelaz prema proliferativnoj fazi cijeljenja potaknut je i eferocitozom, procesom kojim makrofazi uklanjaju apoptotske stanice, što rezultira smanjenjem proizvodnje proupalnih medijatora. Aktivacija negativnih regulatora urođene imunosti dodatno smanjuje upalu i proteaznu aktivnost čime se stvara povoljan mikrookoliš za reparaciju tkiva. Polarizacija makrofaga prema M2 reparativnom fenotipu regulirana je složenim signalnim putevima. Inhibicija TLR receptora i AP-1 (engl. Activator protein 1), aktivacija STAT6 (engl. Signal transducer and activator of transcription) signalnog puta [104], CSF-1 signalnog puta, izražaj protuupalnih citokina (IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β) dovodi do poticanja gena povezanih s reparativnim funkcijama [96]. Iako aktivacija pojedinih podjedinica NF- κ B (kao p65) pridonosi polarizaciji prema upalnom fenotipu makrofaga, aktivacija p50 NF- κ B homodimera potiče polarizaciju prema M2 fenotipu makrofaga [105]. Također, čimbenici potaknuti hipoksijom mogu modulirati funkciju makrofaga preusmjeravajući ih prema reparativnim ulogama [106]. Nrf2 (engl. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), kao regulator antioksidativnih odgovora, dodatno utječe na polarizaciju makrofaga smanjujući upalne procese i potičući mehanizme reparacije. Polarizacija makrofaga predstavlja složen fenomen koji se temelji na širokom spektru svojstava ovih stanica, ovisno o njihovim skupinama i podskupinama te stimulansima u mikrookolišu [22,23,42,77,84,85,107,108].

M2 makrofazi ključni su za poticanje reparativnih procesa u fibroblastima, potičući njihovu transformaciju u miofibroblaste te stvaranje ožiljka. Oni izlučuju VEGF koji stimulira angiogenezu potrebnu za regeneraciju tkiva [99,109]. Zajedno s T regulatornim stanicama, proizvode TGF- β [110], koji smanjuje sintezu proupalnih medijatora i označava prijelaz prema reparativnoj fazi [41,43,91,94].

Uzimajući u obzir sve navedeno, može se zaključiti da je polarizacija makrofaga izuzetno složen fenomen. Ova složenost proizlazi iz činjenice da makrofazi pokazuju širok spektar svojstava, ovisno o skupini i podskupini kojoj pripadaju, a njihova promjena fenotipa odgovara stimulansima u mikrokolišu u kojem se nalaze. Naredna istraživanja bi mogla pružiti korisna znanja za razvijanje novih terapijskih opcija usmjerenih na poboljšanje cijeljenja tkiva i smanjenje upale nakon IM-a.

Ostale stanice proliferativne faze cijeljenja i izvanstanična tvar

Uz reparativne makrofage, dendritičke stanice infiltriraju infarcirano tkivo najviše u proliferativnoj fazi. Studije na životinjama pokazale su kako inhibicijom tih stanica dolazi do povećanja intenziteta upale, dodatnog oštećenja kardiomiocita i izvanstanične tvari, kočenja angiogeneze te polarizacije makrofaga prema M1 upalnom fenotipu čime se pogoršava cijeljenje srčanog tkiva [107].

Homeostatka cirkulacija limfocita ograničena je na sekundarne limfoidne organe, dok u upalnim stanjima dolazi do njihovog nakupljanja u drugim organima. Nakon IM-a razni tipovi T stanica infiltriraju srčano tkivo. CD4+ pomagački T-limfociti se aktiviraju kao odgovor na oslobođene srčane autoantigene, a potiču cijeljenje pomažući infiltraciju reparativnim imunološkim stanicama (izlučivanjem IL-10 i TGF- β) te time i rezoluciju upale. Djeluju također i na pravilno odlaganje kolagena, a inhibiraju aktivnost proteaza čime doprinose stvaranju ožiljka na mjestu ozljede [90]. Prirodnobilačke T stanice proizvodnjom IL-10, bez obzira na svoje dvostrano djelovanje (potiču proizvodnju i upalnih i protuupalnih citokina), nakon permanentne okluzije smanjuju infiltraciju tkiva leukocitima i remodeliranje [111].

I endotelne stanice doprinose suzbijanju upalne reakcije. Na početku upale, one sintetiziraju adhezivne molekule koje privlače upalne stanice, omogućujući njihovu infiltraciju. Intenzivna angiogeneza osigurava opskrbu kisikom i hranjivim tvarima hipercelularnom tkivu miokarda u procesu cijeljenja. VEGF potiče stvaranje propusnih krvnih žila bez omotača od pericita [99]. Nakon formiranja zrelog ožiljka, dio ovih novonastalih krvnih žila dobiva omotač od pericita [112], čime se smanjuje njihova propusnost, dok one bez omotača prolaze kroz apoptozu.

Proteini izvanstanične tvari, osim mehaničke potpore, bitni su za regulaciju upale u infarciranom tkivu. Fragmenti matriksa, poput hijaluronana, potiču sintezu proupalnih citokina, dok privremeni matriks omogućuje infiltraciju upalnih stanica. Uklanjanje tih fragmenata putem CD44 doprinosi rezoluciji upale i aktivira inhibitorne signalne putove [41,113]. Lokalizirana prisutnost fibronektina i trombospondina, aktivatora TGF- β , u periinfarktnoj zoni ograničava upalu i smanjuje širenje na zdravo tkivo [67].

Molekularni signali proliferativne faze cijeljenja

Suzbijanje postinfarktne upalne odgovora ovisi o oslobađaju protuupalnih medijatora poput IL-10 i TGF- β i lipidnih derivata te o aktivaciji unutarstaničnih STOP signala koje koče urođeni imunološki odgovor [17,92,98].

Citokin IL-10 sudjeluje u protuupalnim funkcijama poput smanjenja sinteze proupalnih citokina i kemokina (TNF- α i IL-6) u makrofazima [114] te time potiče polarizaciju prema M2 reparativnom tipu. Također, potiče izražavanje tkivnog inhibitora metaloproteinaza u mononuklearnim stanicama, što utječe na održavanje integriteta izvanstanične tvari i smanjenje nepovoljnog remodeliranja. Primarno se proizvodi od strane regulatornih T-stanica i makrofaga čiji razvoj i reparativnu funkciju dodatno potiču. IL-10 smanjuje količinu proupalnih citokina i suzbijanjem mastocitne degranulacije [98,114].

TGF- β je multifunkcionalni citokin koji je bitan regulator unutar svih faza cijeljenja IM-a. Sudjeluje u brojnim fiziološkim i patološkim procesima. Regulira imunološki odgovor inhibiranjem aktivacije proupalnih stanica i smanjenjem proizvodnje citokina. Zatim sudjeluje u procesima diferencijacije stanica, na način da potiče diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste što je ključno za formiranje ožiljka te polarizaciju makrofaga prema M2 fenotipu. Poticanjem izražaja VEGF-a utječe na rast i proliferaciju stanica u procesu neoangiogeneze, te je uključen u procese formiranja izvanstanične tvari i mnogim drugima [115]. Razina svih triju izoformi ovog citokina su povišene nakon IM-a [100]. Teško je razlučiti točnu ulogu pojedinih članova obitelji ovog pleiotropnog citokina zbog njegovog djelovanja na razne stanice uključene u cijeljenje nakon IM-a. Smatra se da je aktivacija TGF- β i njegovo djelovanje na imunološke i reparativne stanice ključno za prelazak iz upalne faze u reparativnu fazu [116]. Glavni izvor ovog medijatora su makrofazi, ali i druge stanice poput epitelnih, trombocita, podtipovi T stanica, fibroblasti i mastociti [115,117]. Studije su pokazale kako rana inhibicija ovog citokina dovodi do pogoršanja upalnog odgovora i veće smrtnosti, a tek kasna inhibicija može dovesti do boljih ishoda u cijeljenju [118] jer u slučaju prekomjerne aktivnosti može doći do hipertrofije srca i srčane fibroze koje narušavaju funkciju srca.

Ostali spojevi uključeni u suzbijanje upalnog odgovora su GDF15 (growth differentiation factor 15) citokin koji pripada TGF- β obitelji [42]. Lipidni derivati poput lipoksina i resolvina također sudjeluju u tom procesu. U istraživanjima na mišjem modelu IM-a primjećeno je da kemokinski receptor CCR5 ima bitnu ulogu u suzbijanju upale utječući na infiltraciju srčanog tkiva T regulatornim stanicama [119]. Također, izražaj pojedinih kinaza povezanih s receptorima proupalnih citokina povećava se unutar makrofaga i fibroblasta, što rezultira smanjenjem izražaja proupalnih citokina, a poticanjem transformacije fibroblasta u miofibroblaste [120].

Fibroblastna aktivacija i formiranje ožiljka

U proliferativnoj fazi cijeljenja IM-a, povećana prisutnost reparativnih makrofaga dovodi do promjena u razinama protuupalnih medijatora kao što su IL-10, TGF- β i VEGF, koji potiču procese reparacije i omogućuju formiranje ožiljka na mjestu ozljede. Tijekom ove faze nastaje granulacijsko tkivo, pri čemu uz makrofage, miofibroblasti imaju bitnu ulogu [17,92,98,99].

Srce sadrži značajan broj rezidentnih stanica nalik fibroblastima koje u slučaju srčane ozljede potiču stvaranje proupalnih citokina [70]. Nakon IM-a dolazi do aktivacije fibroblasta i njihove transformacije u miofibroblaste, što predstavlja jedan od ključnih događaja u proliferativnoj fazi [70,121]. Diferencijacija prema miofibroblastima je potaknuta angiotenzinom II i TGF- β , te IL-10 [17,98,99,122]. Osim ovih signalnih medijatora, transdiferencijaciju potiču promjene u izvanstaničnoj tvari (matricelularni proteini) [123] te pojedini članovi TRP (engl. Transient receptor potential channel) obitelji ionskih kanala, naročito TRPC6 čija odsutnost može dovesti do poremećaja u funkciji fibroblasta i povećanog mortaliteta [124]. Ove stanice sintetiziraju proteine izvanstanične tvari te osiguravaju kontrakciju ožiljka, čime doprinose strukturnoj stabilnosti srca [42,66,121]. Miofibroblasti su fenotipski promijenjeni fibroblasti koji sadrže stresna vlakna i izražavaju kontraktilne proteine poput α -SMA (engl. Alpha smooth muscle actin) i embrionalne izoforme miozina glatkog mišića [125,126]. Izvor miofibroblasta može biti koštana srž ili rezidenti fibroblasti iz srčanog tkiva, ali i druge stanice mogu pridonijeti njihovom razvoju kao dodatni izvor [127]. Proliferacija fibroblasta također dovodi do intenzivne angiogeneze, koja osigurava opskrbu kisikom i hranjivim tvarima potrebnim za regeneraciju metabolički aktivnog tkiva. Tijekom ove faze dolazi do povećanja izražaja VEGF-a [109] i trombocitnog čimbenika rasta [112], koji su važni za sazrijevanje krvnih žila i integraciju pericita. Uz to, pomagački T limfociti i regulatorni T limfociti imaju značajnu ulogu u poticanju cijeljenja te optimalnom odlaganju kolagena dodatnom proizvodnjom protuupalnih, proangiogenih i profibrotskih medijatora [91].

Fibroblasti mogu za vrijeme rane upalne faze izlučivati upalne medijatore i proteaze i modulirati preživljenje kardiomiocita u ishemičnom srcu [128]. Studije pokazuju kako miofibroblasti mogu pokazivati i fagocitotska svojstva (poput makrofaga) te suzbijati upalu prožduranjem mrtvih stanica [129].

Studije su pokazale da ožiljak u infarciranom srčanom tkivu nije samo acelularna struktura sastavljena od unakrsno povezanog vlaknastog kolagena, već predstavlja metabolički aktivno tkivo koje kontinuirano proizvodi i odlaže kolagen, čime je dodatno potvrđena važnost fibroblasta, kao i miofibroblasta [130,131].

Miofibroblasti se pojavljuju na rubovima ožiljka u periinfarktnoj zoni otprilike trećeg dana nakon IM-a, a zatim invadiraju infarcirano područje, gdje ostaju prisutni tijekom dužeg vremenskog razdoblja [132]. Ovi transformirani fibroblasti igraju vitalnu ulogu u procesu cijeljenja, jer ne samo da doprinose sintezi kolagena, već također pomažu u remodeliranju izvanstanične tvari, što je ključno za obnovu srčanog tkiva nakon ishemije.

Osim toga, miofibroblasti su odgovorni za stvaranje mehaničke potpore i stabilnosti ožiljnog tkiva, što je posebno važno za održavanje funkcionalnosti srca. Njihova prisutnost i aktivnost ukazuju na to da se proces cijeljenja ne završava jednostavno formiranjem ožiljka; umjesto toga, ožiljak se razvija kao dinamična struktura koja se prilagođava potrebama srca tijekom oporavka.

Ova nova saznanja naglašavaju važnost daljnjih istraživanja kako bi se bolje razumjeli mehanizmi koji stoje iza aktivacije miofibroblasta i njihovih interakcija s drugim stanicama i komponentama izvanstanične tvari. Razumijevanje ovih procesa može otvoriti nove mogućnosti za terapijske intervencije usmjerene na poboljšanje oporavka srca nakon IM-a.

Izvanstanična tvar tijekom proliferativne faze cijeljenja

Izvanstanična tvar ima vrlo važnu ulogu tijekom proliferativne faze cijeljenja nakon IM-a. U njoj se odvijaju brojne promjene u sastavu te u regulaciji aktivnosti različitih stanica. Nakon fagocitiranja fragmenata izvanstanične tvari netom poslije IM-a, formira se privremena izvanstanična tvar koja se pretežno sastoji od fibrina, fibronektina i laminina, tzv. matricelularnih proteina [41,66,133]. Oni ne pružaju strukturnu, tj. mehaničku potporu, već reguliraju važne stanične procese i interakcije s izvanstaničnom tvari (kolagenom i elastinom) kao što su proliferacija, migracija i diferencijacija stanica tijekom reparacije tkiva [42].

Glavni strukturni protein koji osigurava čvrstoću i stabilnost ožiljnog tkiva je kolagen. Tijekom proliferativne faze dolazi do povećane sinteze kolagena od strane miofibroblasta [130,131], što

značajno doprinosi formiranju ožiljka. Promjene koje se događaju u izvanstaničnoj tvari u njezinom sastavu i konačno pravilno odlaganje kolagena esencijalni su za obnovu strukture srčanog mišića i osiguravanje njegove funkcionalnosti nakon IM-a.

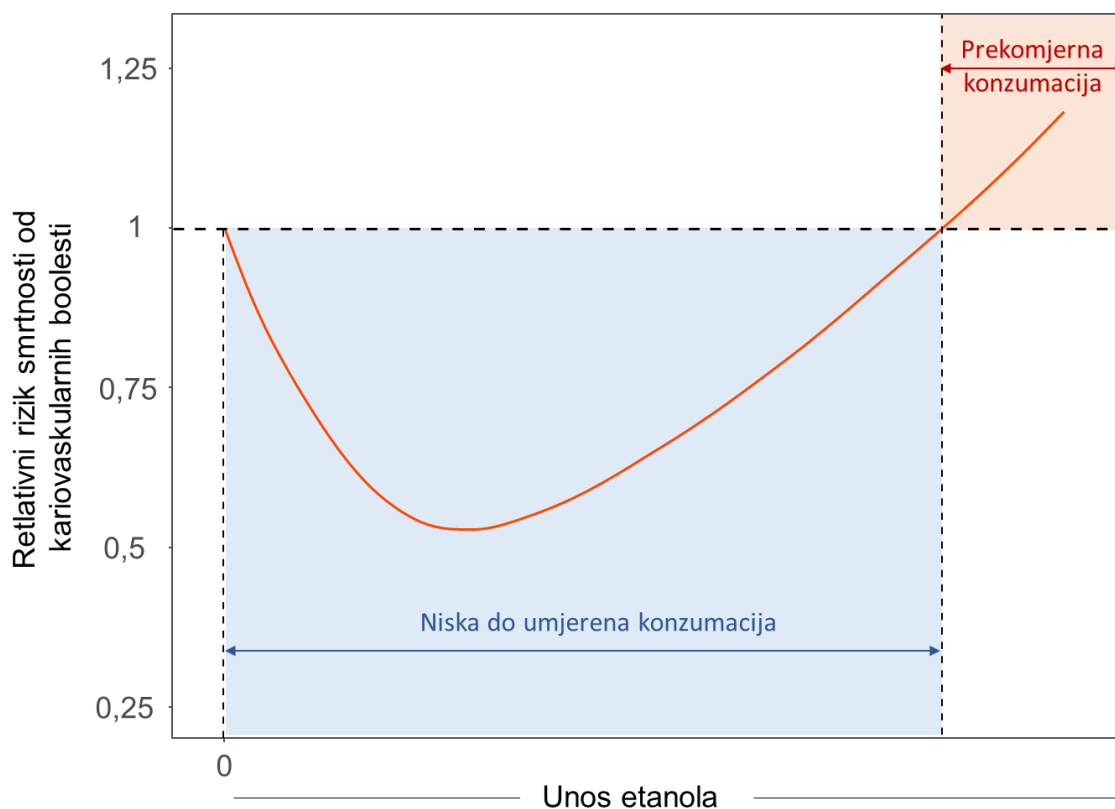
1.3.3. Faza sazrijevanja ožiljka (maturacije)

Faza maturacije predstavlja završnu fazu cijeljenja nakon IM-a, a uključuje niz procesa koji omogućuju obnovu i stabilizaciju srčanog tkiva. Tijekom ove faze dolazi do umrežavanja kolagenih vlakana unutar izvanstanične tvari, čime se osigurava čvrstoća i stabilnost ožiljka [42]. Unatoč tome što ožiljak održava strukturnu stabilnost srca koja je nužna nakon IM-a, istovremeno narušava srčanu funkciju jer kao acelularno tkivo ne sadrži nužne kontraktilne komponente. Angiogeneza, koja je prisutna tijekom proliferativne faze, završava u fazi maturacije. Stabilizacijom vaskularne mreže osigurava se odgovarajuća opskrba krvlju regeneriranog tkiva. Smatra se da smanjenje fibrogenih čimbenika rasta, aktivacija inhibitornih STOP signala koji inhibiraju TGF- β i angiotenzin II signaliziranje i uklanjanje matricelularnih proteina, te sinteza antifibrotskih medijatora može suzbiti proliferaciju i smanjiti sintetsku aktivnost fibroblasta [42]. Istovremeno, fibroblasti i leukociti postupno se uklanjaju iz ozlijeđenog područja, što dovodi do hipocelularnosti tkiva i prijelaza u acelularni zreli ožiljak. Remodeliranjem izvanstanične tvari dolazi do stvaranja fibroznog tkiva koje u potpunosti zamjenjuje nekrotično tkivo. Iako je upalni odgovor značajno smanjen u ovoj fazi, niska razina upale može perzistirati. Ova rezidualna upala može uzrokovati daljnje oštećenje viabilnih kardiomiocita, što dodatno pogoršava nepovoljno remodeliranje srca, povećavajući rizik od razvoja srčanog zatajenja [4,8,134]. Razumijevanje složenih procesa koji se istovremeno odvijaju tijekom ove faze, uključujući interakcije između imunoloških stanica, fibroblasta i izvanstanične tvari, od velike je važnosti za razvoj novih terapijskih strategija koje mogu doprinijeti smanjenju morbiditeta nakon preboljelog IM-a.

1.4. Utjecaj konzumacije alkoholnih pića na kardiovaskularni sustav

Prva opsežnija istraživanja na temu utjecaja alkohola na ljudsko zdravlje proveo je američki biolog dr. Raymond Pearl. Njegove studije pokazale su da umjerena konzumacija alkohola može imati određene zdravstvene koristi, dok prekomjerna konzumacija dovodi do značajnih zdravstvenih problema. Rad dr. Pearla postavio je temelje za kasnija istraživanja u ovom području, otkrivajući složene interakcije između alkohola i ljudske fiziologije. Zaključke svojih istraživanja objavio je 1929. u knjizi „Alcohol and longevity“ [135].

Svoja zapažanja grafički je predočio J-krivuljom kako bi opisao odnos između konzumacije alkohola i smrtnosti (Slika 3). Prema njegovim podacima, umjerena konzumacija alkohola bila je povezana s nižim stopama smrtnosti u odnosu na apstinente i osobe koje prekomjerno piju. Bitno je naglasiti da se radilo o vremenu prohibicije u SAD-u, što njegove zaključke čini još intrigantnijima s obzirom da su bila protivna tadašnjem javnom mnijenju da je svaka konzumacija alkoholnih pića štetna za zdravlje.



Slika 3: Shema J-krivulje koja prikazuje odnos rizika smrtnosti i obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti s razinom konzumacije alkoholnih pića.

Većina epidemioloških studija, a u novije vrijeme i randomiziranih kliničkih studija, potvrđuju da je umjerena konzumacija alkoholnih pića povezana sa smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti [136–144]. Također je pokazano da se protektivni učinci prethodnog umjerenog pijenja alkohola mogu protezati i na vrijeme oporavka nakon kardiovaskularnog incidenta [137,138,145,146]. Nadalje, umjereno pijenje alkoholnih pića može imati korisne učinke čak i u bolesnika koji su započeli s pijenjem nakon oporavka od IM-a [137,138].

Potaknuti rezultatima epidemioloških studija, brojne istraživačke skupine pokrenule su istraživanja o mehanizmima kardioprotektivnih učinaka povezanih s umjerenom konzumacijom alkohola.

Ustanovljeno je da umjerena konzumacija alkohola može dovesti do porasta razina HDL-a (engl. High-density lipoprotein) i A-I i A-II apolipoproteina te smanjenja razine oksidiranih LDL-a (engl. Low-density lipoprotein). Također, ustanovljena je povezanost s padom razine CRP-a (engl. C-reactive protein) i smanjenjem reaktivnosti i agregabilnosti trombocita te smanjenjem prevalencije dijabetesa tipa 2 [141,145–147]. S druge strane, prekomjerna konzumacija alkohola može uzrokovati brojne poremećaje u kardiovaskularnom sustavu, uključujući povećanje rizika od hipertenzije, povećanje oksidativnog stresa, endotelnu disfunkciju, alkoholnu kardiomiopatiju, aritmije te nepovoljni profil lipida u krvi [147].

1.4.1. Razlike u učincima s obzirom na vrstu alkoholnih pića

Prethodni odjeljak sadrži osvrt o utjecaju konzumacije alkohola na kardiovaskularni sustav s obzirom na količinu unesenog alkohola, bez točnog bilježenja vrste alkoholnog pića kojom se alkohol unosio. Drugim riječima, u mnogim epidemiološkim studijama učinak konzumacije alkoholnih pića promatran je kroz puko preračunavanje količine unesenog etanola [141,148].

Provedeno je nekoliko istraživanja koja su se bavila proučavanjem potencijalnih razlika u učincima na zdravlje različitih vrsta alkoholnih pića uz jednake preračunate količine unesenog etanola. Zaključci takvih studija upućuju na postojanje znatnih razlika među vrstama alkoholnih pića [139,149]. U studiji koja je uspoređivala utjecaje vina, piva i žestokih pića na rizik smrtnosti, grupa koja je pila vino bila je povezana s najmanjim rizicima u usporedbi s apstinentima. Pivo je imalo blago pozitivan učinak, dok je unos usporedive količine etanola kroz pijenje žestokih pića značajno povećavao rizik smrtnosti [139].

Smatra se da uzroci ovih razlika leže u međudjelovanju etanola i nealkoholnih komponenti vina. Naime, vino sadrži etanol, fenolne spojeve te druge bioaktivne tvari. Glavnina bioloških učinaka vina pripisuje se etanolu [150] i fenolnim spojevima [151] koji u kardiovaskularnom sustavu ostvaruju komplementarne učinke. Pored samih fenolnih spojeva sadržanih u vinu, njihovi metaboliti nastali u probavnoj cijevi i jetrima kao i njihovi katabolički produkti nastali pod djelovanjem mikrobne flore u debelom crijevu, također mogu imati važnu ulogu u različitim biološkim učincima vina [152,153].

Unutar same vrste vina može se napraviti dodatna podjela. Naime, postoje značajne razlike u količini i sastavu nealkoholnih komponenti bijelih, rose i crnih vina [154]. Razlog za to leži u različitim tehnološkim postupcima pripreme bijelih i crnih vina. Kod proizvodnje crnog vina, maceracija i alkoholno vrenje groždanog soka odvija se u kontaktu s pokožicama i sjemenkama, koji su glavni rezervoari fenolnih spojeva u grožđu. Maceracija može trajati od nekoliko dana do nekoliko tjedana,

omogućavajući ekstrakciju biološki aktivnih tvari iz sjemenki i pokožica. Nasuprot tome, u proizvodnji klasičnih bijelih vina čvrsti dijelovi grožđa se redovito odmah nakon gnječenja odvajaju i alkoholno vrenje soka odvija se bez kontakta sa sjemenkama i pokožicama. Posljedično, fenolni spojevi u bijelom vinu uglavnom potječu iz pulpe grožđa, a ne iz pokožice i sjemenki, što doprinosi nižem ukupnom sadržaju i drugačijem fenolnom profilu. Koraci pri proizvodnji vina, kao što su prešanje i upotreba hrastovih bačava, mogu utjecati na razinu fenola, ali ne povećavaju je znatno do razine prisutne u crnom vinu [155,156]. Većina studija o kardioprotektivnim učincima vina rađena je sa crnim vinima zbog većeg sadržaja polifenola u odnosu na bijela vina. Posljedično, istraživanja s bijelim vinima puno su rjeđa, unatoč tome što je proizvodnja bijelih vina i njihova popularnost među potrošačima sve veća u odnosu na crna vina [157].

1.4.2. Utjecaj obrasca pijenja na učinke konzumacije alkohola

Iako se način unosa etanola s obzirom na vrstu konzumiranog alkoholnog pića pokazao vrlo bitnim za razumijevanje učinaka alkoholnih pića na ljudsko zdravlje, utvrđeno je da i pri takvoj podjeli treba voditi računa o još jednom parametru – obrascu pijenja. Naime, pokazano je da čak i kada ispitanici konzumiraju iste ukupne količine istovjetnog alkoholnog pića u određenom periodu, dinamika unosa znatno modificira konačan učinak na ljudsko zdravlje [148,158,159]. I u slučaju vina, korisni učinci na zdravlje potencirani su ukoliko se konzumira po tzv. mediteranskom obrascu pijenja, kojega između ostaloga karakterizira umjereno pijenje, ravnomjerno raspoređeno tijekom tjedna, pijenje uz jelo te izbjegavanje pijančevanja kada se velike količine konzumiraju odjednom [160]. Doista, umjereno pijenje vina je tipična i važna komponenta Mediteranske prehrane [161], koja se smatra jednom od najzdravijih prehrambenih obrazaca na svijetu [162].

O važnosti obrasca pijenja govori i podatak da opijanje samo jednom tjedno poništava blagotvorne učinke redovitog umjerenog pijenja [148].

1.4.3. Ograničenja istraživanja o učincima alkohola

Iako su alkoholna pića neizostavan dio ljudske svakodnevice već stoljećima, i detaljnija istraživanja na temu utjecaja alkoholnih pića na ljudsko zdravlje provode se gotovo stotinu godina, još uvijek postoje nedoumice i nesuglasice oko konačnih zaključaka. Posljedično, u javnom mnijenju nekih zemalja prelazilo se iz stava apsolutne štetnosti alkohola u doba prohibicije, do konsenzusa da je umjereno pijenje alkoholnih pića blagotvorno s obzirom na smanjenje ukupnog i rizika smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti, da bi se u zadnjih desetak godina ponovno počelo dovoditi u pitanje korist umjerenog pijenja.

Razlozi ovih polemika u javnosti mnogobrojni su, a dijelom proizlaze iz činjenice da epidemiološke studije ukazuju na povezanost, ali ne i kauzalnost između pijenja i učinaka na ljudsko zdravlje. Nadalje, mnoge epidemiološke studije koje se bave alkoholom i zdravljem ne uzimaju u obzir informacije o obrascima pijenja kao što su: vrsta alkoholnog pića, redovito umjereno naspram prigodnog prekomjernog pijenja, ili pijenje uz ili izvan jela. Posljedično, rezultati takvih studija su nejasni, što ostavlja veliki prostor za pristrana tumačenja i manipulacije.

Donošenje zaključaka otežano je i zbog inherentnih problema s oslanjanjem na ankete kao izvor podataka, pogotovo ako se pitanja odnose na period znatno u prošlosti ili zahtijevaju veliku razinu detalja u odgovoru. Ovo je jedan od razloga zašto većina retrospektivnih studija ne pokušava diferencirati unos s obzirom na vrstu pića već se fokusira isključivo na procjenu ukupne količine i navika jer je to brojka koju je puno lakše procijeniti.

Dodatno, čak i da je prisjećanje ispitanika apsolutno točno, dani iskaz i dalje ne mora biti istinit, čak i ako su iskazi anonimizirani. Naime, mnoge studije pokazuju da iako anonimizacija povećava udio istinitih iskaza, on i dalje nije stopostotan. Razlika je posebno izražena kod osjetljivih pitanja poput onih o unosu alkohola gdje su ispitanici svjesni postojanja socijalno prihvatljivih normi pa često lažu kako bi se u njih uklopili. Sukladno tome, postoji vjerojatnost da je prijavljena količina unosa ustvari još i veća, što bi išlo u prilog pozitivnim učincima alkoholnih pića. Unatoč gore navedenim čimbenicima, najnovija istraživanja tog tipa koja su uzimala u obzir većinu navedenih čimbenika i dalje ukazuju na pozitivan utjecaj umjerenog pijenja alkoholnih pića [148]. S obzirom na inherentne nedostatke epidemioloških studija, i poteškoće u kreiranju kontroliranih kliničkih studija na ljudima, istraživanje koje je predmet ovog doktorskog rada dizajnirano je kao randomizirana prospektivna kontrolirana studija na modelu štakora. Na ovaj način osigurava se veća pouzdanost mjerenja i donošenih zaključaka, uz jedini potencijalni nedostatak nesigurnosti translacije dobivenih zaključaka na ljude.

1.5. Biljezi za histološko praćenje proliferativne faze cijeljenja infarkta miokarda

Za potrebe ovog doktorskog rada korištena su tri markera za detekciju stanica proliferativne faze cijeljenja: CD68, CD163 i α -SMA.

CD68 je izrazito glikozilirani tip I transmembranski glikoprotein težine 110 kDa, koji pripada obitelji skavenger receptora. Ovaj biljeg visoko je izražen na stanicama mononuklearnog fagocitnog sustava [163], uključujući makrofage, gdje je posebno obilato prisutan, ali može se uočiti i na mikroglijji, osteoklastima i mijeloidnim dendritičkim stanicama [164]. CD68 se smatra pan biljegom makrofaga,

što znači da je prisutan i na M1 i M2 fenotipovima makrofaga. Iako je nešto više izražen na M1 makrofazima u odnosu na M2, ne može se koristiti kao biljeg za razlikovanje ovih dvaju fenotipova.

CD163 je transmembranski skavenger receptor koji se selektivno izražava na monocitima (s niskom razinom izražaja) i makrofazima (s visokom razinom izražaja). Protuupalni citokini potiču izražaj ovog receptora, dok upalni citokini suzbijaju. CD163 biljeg najviše je povezan s makrofazima reparativnog fenotipa (M2), osobito M2c, koji je induciran glukokortikoidima i IL-10 te ima važnu ulogu u inhibiciji upalnog odgovora i cijeljenju [22].

α -SMA je specifična izoforma aktina, koji se nalazi unutar miofibroblasta, glatkih mišićnih stanica i drugih stanica [165–167]. Ovaj se strukturni protein sastoji od polipeptidnog lanca koji se može savijati i formirati filamentne strukture, bitan je za kontraktilne funkcije stanica i održavanje mehaničke stabilnosti stanica. α -SMA doprinosi stvaranju fibroznog tkiva i regulaciji formiranja sadržaja izvanstanične tvari tijekom procesa cijeljenja. Njegov izražaj značajno se povećava pod utjecajem TGF- β , a rutinski se koristi kao biljeg za detekciju miofibroblasta.

2. CILJ RADA I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi istraživanja

Generalni cilj ovog istraživanja je analizirati stope preživljenja i imunohistokemijske osobine infiltrata makrofaga i razinu aktivacije miofibroblasta u tkivu miokarda životinja koje su preživjele 96 sati nakon kirurški induciranog IM-a, a koje su prethodno tijekom četiri tjedna konzumirale bijelo vino, vodenu otopinu etanola ili samu vodu.

Specifični ciljevi istraživanja podijeljeni su kako slijedi:

- 1) Izmjeriti i usporediti stope preživljenja pojedinim skupinama životinja
- 2) Izmjeriti i usporediti prostornu raspodjelu CD68 i CD163 biljega makrofaga u tkivu infarciranog srca između skupina životinja
- 3) Izmjeriti i usporediti prostornu distribuciju α -SMA u sve tri skupine životinja
- 4) Analizirati odnos preživljenja u skupinama životinja prema volumenu konzumiranog pojedinog alkoholnog pića
- 5) Analizirati odnos prostorne raspodjele CD68 i CD163 biljega makrofaga prema volumenu konzumiranog pojedinog alkoholnog pića
- 6) Analizirati odnos prostorne distribucije α -SMA prema volumenu konzumiranog pojedinog alkoholnog pića
- 7) Analizirati i usporediti podatke o unosu hrane i tekućine te prirastu mase između pojedinih skupina životinja tijekom konzumacijskog perioda od četiri tjedna
- 8) Analizirati veličine infarkta nakon trikromnog Mallory bojanja i usporediti skupine

2.2. Hipoteza istraživanja

Konzumacija bijelog vina tijekom četiri tjedna prije kirurški induciranog IM-a utjecati će na povećanje stope preživljenja eksperimentalnih životinja te na kvalitetnije i prikladnije cijeljenje srčanog tkiva 96 sati nakon zahvata. U infarciranom tkivu se očekuje smanjena razina upala (veći omjer reparativnih naspram proupalnih makrofaga) te stvaranje manje ožiljkastog tkiva (niža aktivnost miofibroblasta) u usporedbi sa skupinama životinja koje su konzumirale vodenu otopinu etanola ili kontrolne životinje koje su konzumirale vodu .

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Etička načela

Provođenje eksperimentalnog istraživanja, kao glavnog dijela projekta, kojim se dobilo uzorke tkiva koji su temelj ovog doktorskog rada, odobreno je rješenjem (Klasa:UP/I-322-01/15-01/38, Ur. broj: 525-10/0255-16-7) od strane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane na temelju članka 21. Zakona o zaštiti životinja te u skladu s člankom 41. i 96. Zakona o općem upravnom postupku. Također, Etičko povjerenstvo gore navedene institucije temeljem članka 34. Zakona o zaštiti životinja i članka 12. Poslovnika o radu Etičkog povjerenstva (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 naziva „Utjecaj umjerene konzumacije vina na ishemijsku ozljedu srčanog mišića i njezino cijeljenje“ (Klasa UP/I-322-01/15-01/38, Ur.broj: 380-15-1).

Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske donijelo je i dodatno rješenje na temelju članka 18. stavka 1. i 4. Zakona o zaštiti životinja te u skladu s člankom 41. i 49. Zakona o općem upravnom postupku, kojim se omogućava daljnje provođenje eksperimenata na životinjama (Klasa: UP/I-322-01/20-01/50, Ur. Broj: 525-10/0543-21-4).

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

3.2. Ustroj istraživanja

Istraživanje je prema specifičnom ustroju randomizirani kontrolirani prospektivni pokus u kojem se prati i procjenjuje učinak prekondicioniranja standardnim bijelim vinom (Graševina) i vodene otopine etanola (usklađene s bijelim vinom po volumnom udjelu etanola - 13%) u usporedbi s kontrolnom skupinom (koja konzumira samo vodu) na preživljenje i na cijeljenje tijekom proliferativne faze (96 sati) nakon kirurški induciranog IM-a na modelu štakora.

Mentor za istraživanje je prof.dr.sc. Ivica Grković, dr.med. Navedeno istraživanje je dio znanstveno – istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (naslov projekta: „ Biološki učinci vina, utjecaj

vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina (Bio-wine) broj 8652). Voditelj projekta je prof. dr. sc. Mladen Boban, dr. med.

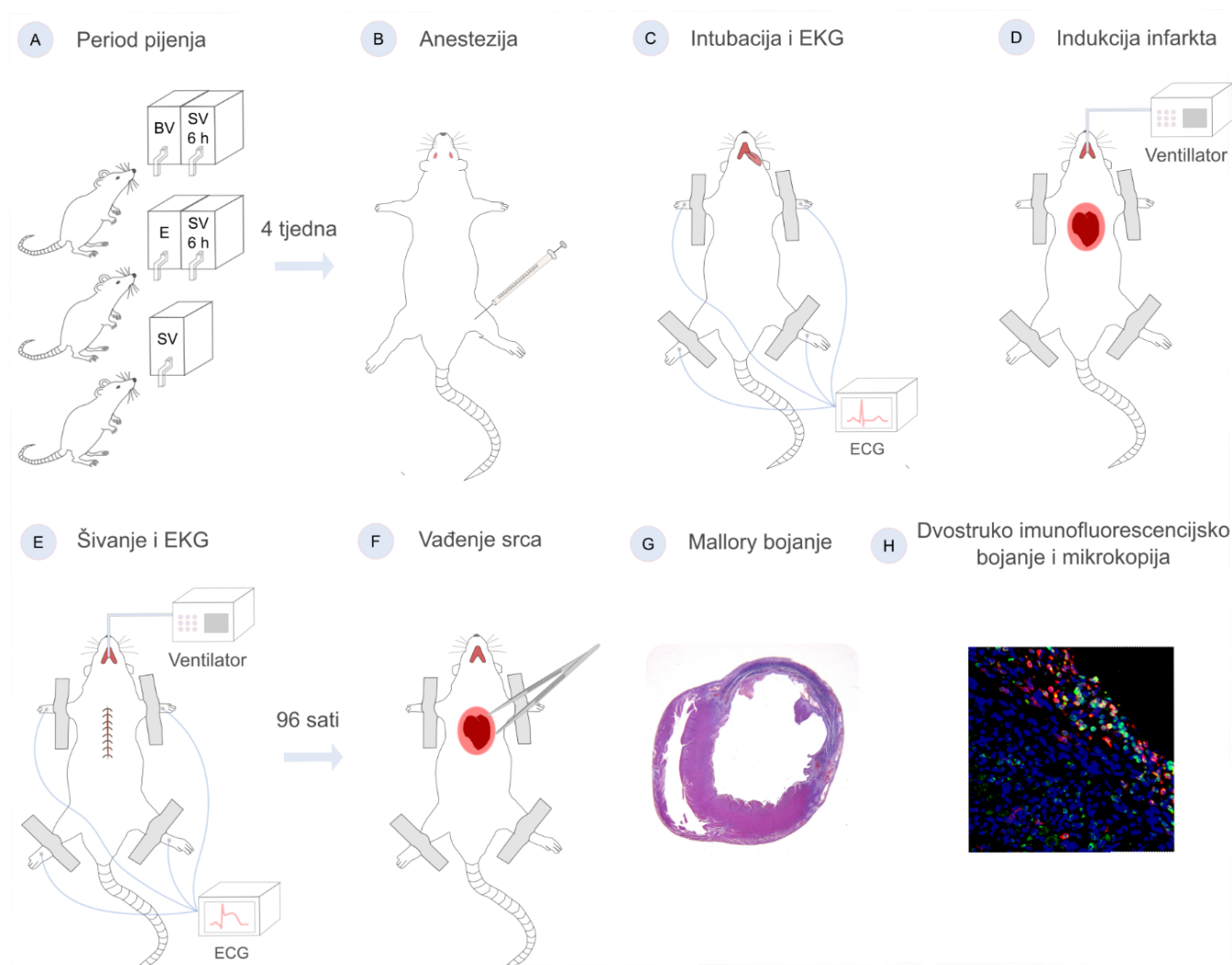
Cjelokupno istraživanje provedeno je pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Nabava i uzgoj životinja te kirurška procedura i oporavak životinja nakon operacije provedeni su u Nastambi za eksperimentalne životinje, a laboratorijski rad obrade tkiva, fiksiranja tkiva, uklapanje u parafinske blokove te imunohistokemijska bojanja vršeni su u Laboratoriju za istraživanje ranog razvoja čovjeka i u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju, a mikroskopiranje uzoraka i fotografiranje provedeno je Laboratoriju za mikroskopiju pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju.

U sklopu ovog istraživanja su sudjelovali istraživači za Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, Zavoda za farmakologiju i Katedre za medicinsku fiziku i biofiziku.

3.3. Pokusne životinje

Za potrebe pokusa korišteni su štakori soja Sprague - Dawley (*rattus norwegicus*), muškog spola, koji su na početku uvođenja u pokus bili starosti šest tjedana i tjelesne mase 150 ± 5 grama. Po završetku pokusa životinje su bile 10 tjedana stare i usporedive tjelesne mase. Pokusne životinje uzgojene su iz postojećih legla u Nastambi za pokusne životinje Medicinskog fakulteta u Splitu (zgrada B) pod kontroliranim uvjetima, temperaturom ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) i primjerenom vlažnošću zraka, te uz dnevni ciklus 12-satne izmjene svjetla i tame. U pokus su se uvodile dnevno po tri životinje koje su u istom slijedu i završavale pokus koji je ukupno trajao 28 dana. Boravile u zasebnoj prostoriji u sklopu Nastambe za pokusne životinje raspoređene individualno u prozirne plastične kaveze prekrivene steljom (piljevinom) koja se tjedno redovito mijenjala. Sve životinje su hranjene standardnom hranom za laboratorijske životinje (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italy), koju su konzumirali *ad libitum* (slobodan pristup – 24h/dan). Sva pića koja su životinjama bila dostupna (voda, vodena otopina etanola ili vino - ovisno o skupini životinja), poslužena su posebnim pojilicama (Ferplast SmallPet Sippy Water Bottle, Castelgomberto, Italy) iz kojih je onemogućeno curenje i minimizirano hlapljenje tekućine. Unos tekućine nastaje kad životinja jezikom pomakne maleni cilindar na koji sprječava spontani izlazak tekućine na pojilici. Štakori u kontrolnoj skupini konzumirali su vodu *ad libitum*. Životinje iz preostale dvije skupine imale su vodu na raspolaganju 6 sati dnevno (od 9 do 15h) u količini od 50 ml, a alkoholna pića *ad libitum* u količini od 30ml. Alkoholna pića bila su pohranjena u hladnjaku u jasno označenim bocama. Ovakav protokol dosljedno je osiguravao životinjama svježe piće i omogućavao točno mjerenje volumena popijenog

pića. Konzumirana tekućina mjerena je svaki dan (u 15h) pomoću menzura. Prilikom uvođenja pojedinih životinja u pokus stavljalo im se u zasebni odjeljak u kavezu 300 g hrane. Masa pojedene hrane izračunavala se oduzimanjem mase nepojedene hrane od početne količine.



Slika 4: Dijagram toka studije koji prikazuje: **A)** Raspodjelu životinja u 3 pokusne skupine (BV - skupina bijelog vina, E - 13% skupina za piće etanol/otopina vode, SV - skupina koja pije samo vodu), **B)** Intramuskularna primjena anestetika, **C)** i **E)** predoperativno i postoperativno snimanje EKG-a, **D)** indukcija IM-a podvezivanjem LAD-a, **F)** Vađenje srca životinjama preživjelim 96 sati nakon indukcije IM-a, **G)** Histološko bojanje po Malloryju, **H)** Dvostruko imunohistokemijsko bojenje i fluorescencijska mikroskopsija.

Vaganje pojedene hrane i tjelesne mase životinja provodilo se jednom tjedno korištenjem Grundig KW 4060 digitalne vage (kapacitet 5kg) te se svakoj životinji prilikom ulaska u pokus mjerila početna masa. Svaka životinja upisana je u zasebni karton gdje su se bilježili svi mjereni podatci, kao i podatci o okotu, tjelesnoj masi na početku pokusa, datumu uvođenja u pokus, detalji o operacijskom

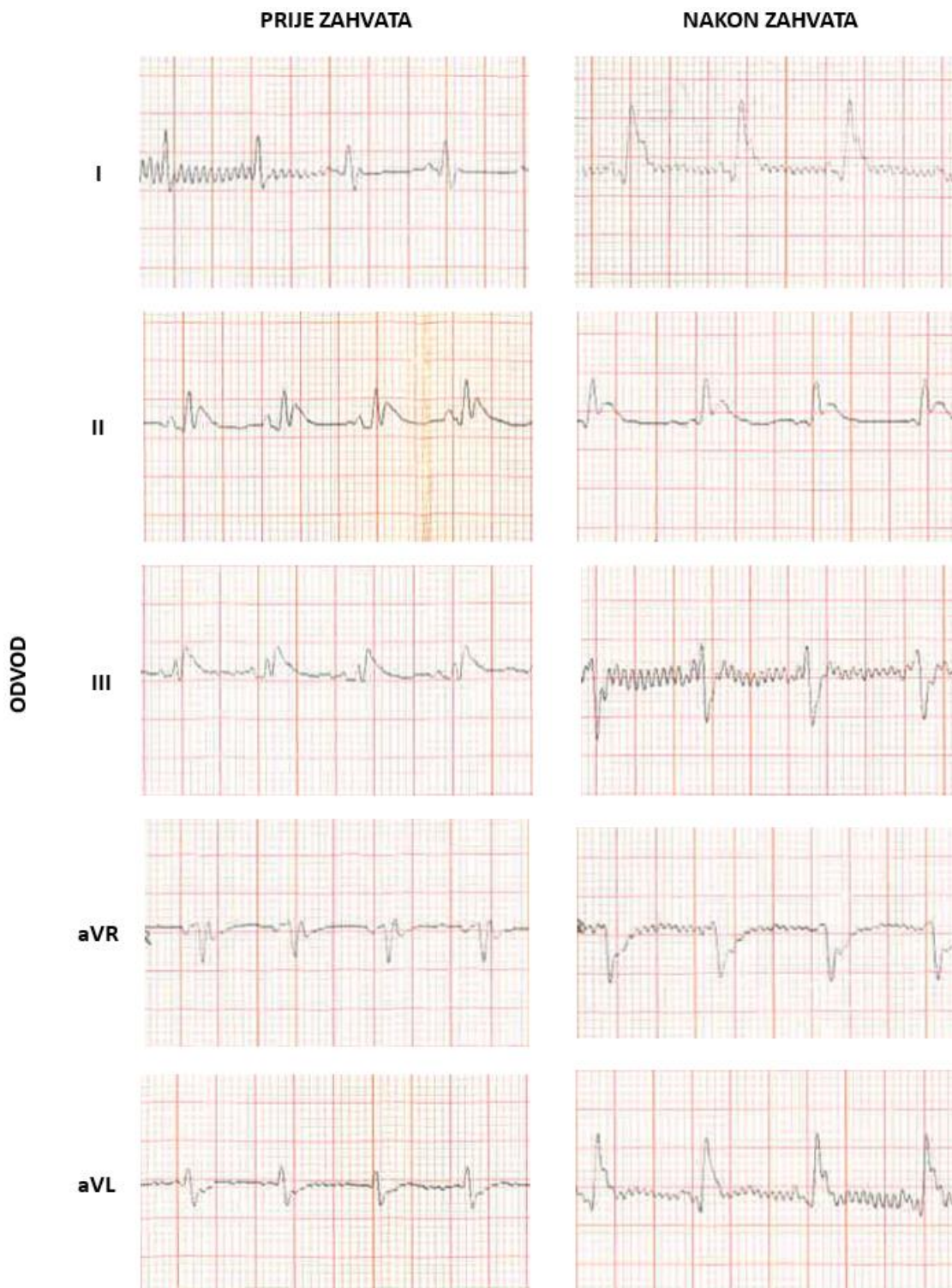
postupku. Obrasci su se nalazili u prostoriji sa pokusnim životinjama tijekom trajanja pokusa i iznosili u prostoriju za operaciju kada bi životinja pristupila kirurškom dijelu pokusa.

Ukupno 80 pokusnih životinja randomizirano je u tri skupine:

- vinska skupina: štakore koji su pili vodu (kroz 6h dnevno) i standardno bijelo vino (Graševinu) 13%-tnog volumnog udjela etanola *ad libitum* (25 životinja)
- etanolna skupina: štakore koji su pili vodu (kroz 6h dnevno) i vodenu otopinu etanola 13%-tnog volumnog udjela etanola *ad libitum* (25 životinja)
- kontrolna skupina: štakore koji su pili samo vodu *ad libitum* (30 životinja)

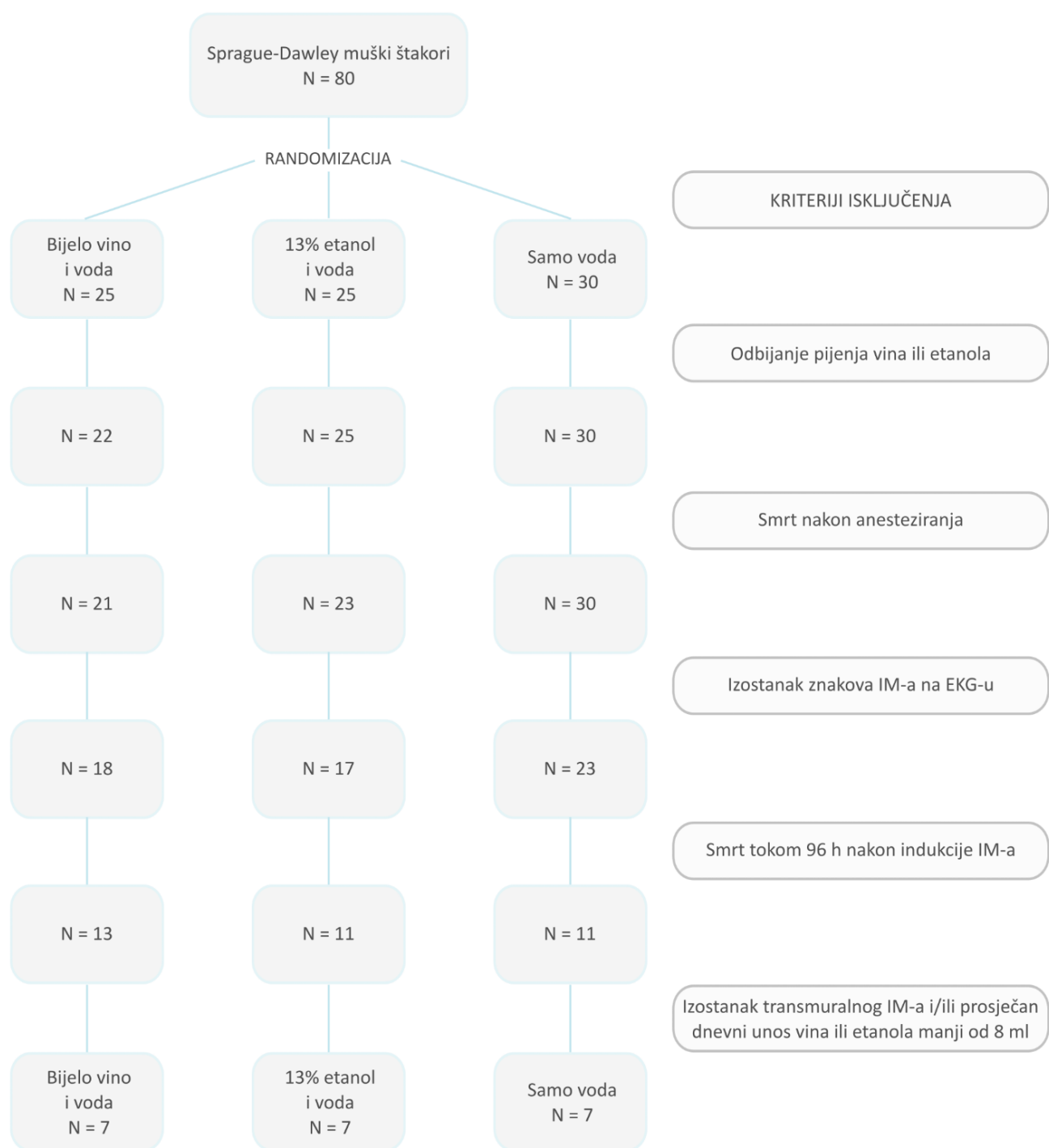
Štakorima je nakon perioda pijenja kirurški induciran IM-a trajnim podvezivanjem LAD-a 2 mm ispod lijeve aurikule. 96 sati nakon infarkta preživjele životinje su žrtvovane, srca su eksplantirana i dalje histološki obrađena (Slika 4).

Verificiranje uspješno induciranog IM-a provedeno je na nekoliko načina: pojavom bljedila površine srca netom nakon podvezivanja, EKG zapisom s ishemijskim nalazom (ST elevacija, proširenje QRS kompleksa i inverzija T-vala) (Slika 5), a kao konačna potvrda postojanja transmuralnog IM-a vršila se mikroskopskim pregledom parafinskih rezova srca nakon trikromnog Mallory bojanja koji je jasno prikazao novostvoreno granulacijsko tkivo i prožetost transmuralnog IM-a upalnim stanicama.



Slika 5: EKG zapisi prije i poslije podvezivanja LAD-a. Promjene koje upućuju na ishemijsku su: ST-elevacija u I i II odvodu i proširen QRS kompleks odvod III te u aVR i aVL.

Životinje koje su uključene u daljnju imunohistokemijsku analizu preživjele su 96 sati nakon IM-a, imale su transmuralan IM te su konzumirale ≥ 8 ml alkoholnog pića na dan. Ukupan broj štakora uključenih u studiju nakon svakog navedenog koraka prikazan je dijagramom na Slici 6.



Slika 6: Dijagram toka studije koji prikazuje kriterije isključenja i preostali broj životinja u svakoj fazi studije.

3.4. Pokusna alkoholna pića

3.4.1. Standardno bijelo vino – pokusno vino

Vina korištena u ovom istraživanju napravljena su od grožđa Graševina (13% volumnog udjela alkohola) u vinariji Krauthaker u Kutjevu, Hrvatska. Graševina, bijelo grožđe nejasnog podrijetla iz srednje i istočne Europe, najčešće je uzgajana bijela sorta grožđa u Hrvatskoj. Poznata je pod raznim imenima: Welschriesling u Austriji, Olaszrizling u Mađarskoj i Laški Rizling u Sloveniji. U najnovijoj globalnoj referentnoj knjizi o vinskim sortama, "Wine Grapes," ime Graševina, koje se koristi u Hrvatskoj, izabrano je kao glavno ime za ovu sortu [168]. Ovo priznanje naglašava važnost sorte i bogatu baštinu hrvatskog vinogradarstva.

Standardno bijelo vino proizvedeno je uobičajenim postupkom vinifikacije za bijela vina, pri čemu se tijekom fermentacije odvajaju čvrsti dijelovi grožđa od groždanog soka. Detaljna enološka analiza vina provedena je korištenjem akreditiranih metoda opisanih u Kompendiju međunarodnih metoda za analizu vina i mošta Međunarodne organizacije za vinarstvo i vinogradarstvo (OIV 2016). Analiza uključuje pH, gustoću, sadržaj etanola, pepela, ugljikov dioksid, slobodni i ukupni sumporov dioksid, te koncentracije ukupnog suhog ekstrakta, reducirajućih šećera, ekstrakta bez šećera, nehlapljivih kiselih produkata, ukupnih i hlapljivih kiselina, vinske kiseline, jabučne, mliječne, sorbinske i glukonske kiseline, kao i ukupni sadržaj polifenolnih komponenti. Provedena je i biokemijska analiza korištenog vina. Koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida određene su spektrofotometrijskim mjerenjima koristeći UV - VIS spektrofotometar "Specord 200" tvrtke Analytik Jena GmbH, Jena, Njemačka. Ukupni fenoli izmjereni su metodom Folin-Ciocalteu, a rezultati su izračunati u tri ponavljanja i izraženi kao mg/L ekvivalenta galne (trihidroksibenzojeve) kiseline (GAE). Koncentracije flavonoida i neflavonoida određene su istom metodom, nakon precipitacije s formaldehidom (24 sata na sobnoj temperaturi), koji reagira s flavonoidima, uzrokujući njihovo taloženje i lako uklanjanje filtracijom. Ukupna koncentracija flavonoida dobiva se izračunavanjem razlike između ukupnih fenola i neflavonoida. Kalorijska vrijednost vina računata je kao produkt kalorijske vrijednosti etanola s njegovom koncentracijom u vinu.

Fizikalno kemijski parametri korištenog bijelog vina dani su u Tablici 1, a fenolni profil je prikazan Tablicom 2.

Tablica 1: Fizikalno-kemijski parametri korištenog bijelog vina.

Parameter	Vrijednost
Gustoća (g/L)	989
Etanol (vol%)	13.0
Etanol (g/L)	102.3
Kalorijska vrijednost (kJ/mL)	3.04
Ukupni suhi ekstrakt (g/L)	24.8
Reducirajući šećeri (g/L)	4.0
Ekstrakt bez šećera (g/L)	21.8
Nehlapljivi kiselih produkata (g/L)	17.5
Pepeo (g/L)	2.59
pH	3.54
CO ₂ (mg/L)	1382
Ukupne kiseline (g/L)	3.56
Nehlapljive kiseline (g/L)	0.25
Vinska kiselina (g/L)	3.36
Jabučna kiselina (g/L)	1.56
Mliječna kiselina (g/L)	0.03
Sorbinska kiselina (g/L)	0
Glukonska kiselina (g/L)	-0.54
Slobodni SO ₂ (mg/L)	27
Ukupni SO ₂ (mg/L)	124

Tablica 2: Fenolni profil korištenog bijelog vina.

Parametar	Vrijednost
Ukupni fenoli (mg/L)	305.3 ± 3.4
Katehin (mg/L)	5.18 ± 0.10
Epikatehin (mg/L)	1.16 ± 0.02
Dimer B1 (mg/L)	2.73 ± 0.13
Dimer B2 (mg/L)	1.17 ± 0.01
Dimer B3 (mL)	2.14 ± 0.05
Dimer B4 (mg/L)	2.66 ± 0.10
Σ monomeri (mg/L)	6.34 ± 0.12
Σ dimeri (mg/L)	8.70 ± 0.01
Galna kiselina (mg/L)	2.18 ± 0.01
Siringinska kiselina (mg/L)	2.60 ± 0.01
Kafeinska kiselina (mg/L)	3.39 ± 0.08
Kaftarna kiselina (mg/L)	25.5 ± 0.25
Cis-koutarična kiselina (mg/L)	1.53 ± 0.01
Trans-koutarična kiselina (mg/L)	3.01 ± 0.04
Cis-ferulična kiselina (mg/L)	1.93 ± 0.01
Trans-ferulična kiselina (mg/L)	3.30 ± 0.01
Resveratrol (mg/L)	0.12 ± 0.02

3.4.2. Vodena otopina etanola

Vodena otopina etanola pripravljena je u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju na Medicinskom fakultetu u Splitu. Kako bi se postiglo pripremanje adekvatne otopine, volumen etanola poznate koncentracije razrijeđen je odgovarajućim volumenom vode. Cilj je bio stvoriti vodenu otopinu etanola s 13% volumnim udjelom etanola, koja točno odgovara sadržaju etanola u standardnom bijelom vinu korištenom u studiji (Graševina).

3.5. Postupci u sklopu induciranja infarkta miokarda

3.5.1. Anestezija i priprema za operacijski zahvat

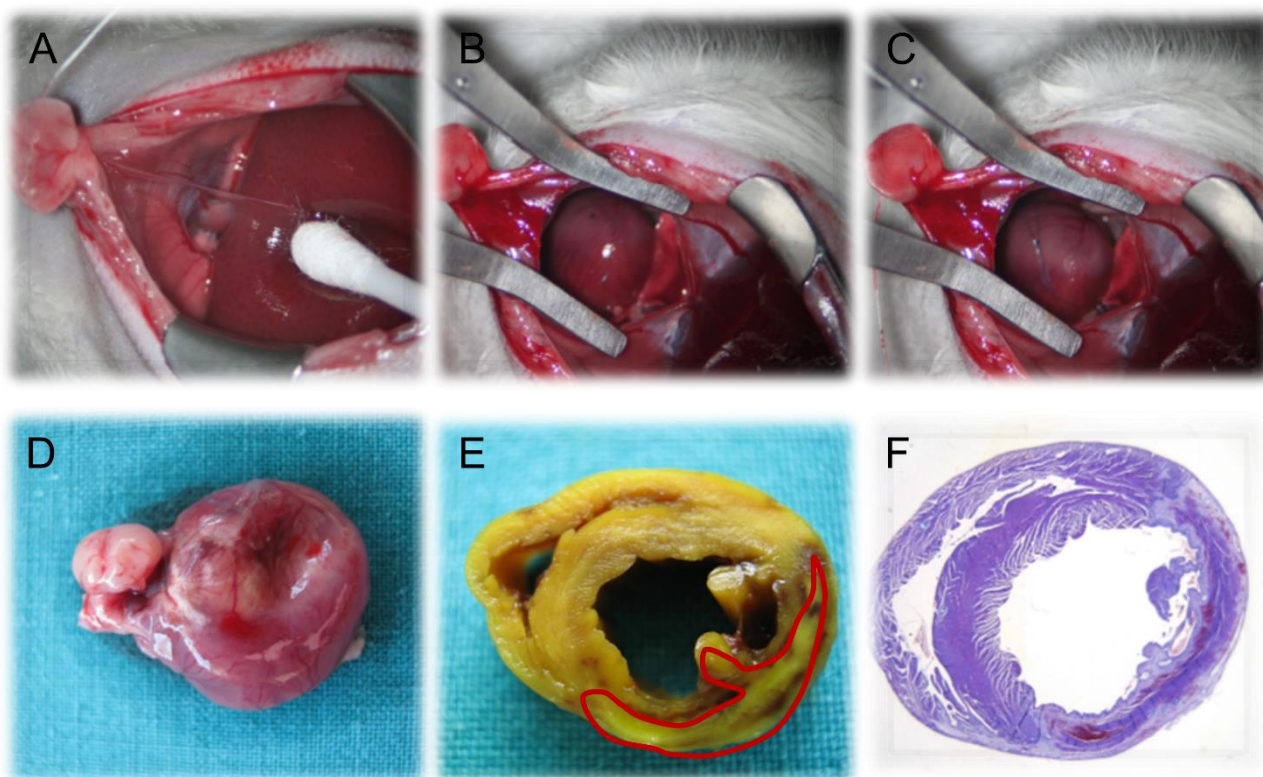
U predoperativnoj prostoriji u sklopu Nastambe za životinje obavljalo se anesteziranje životinja. Nepredno prije ovog postupka životinje su vagane kako bi se odredila točna doza za svaku od njih pomoću tablice koja prikazuje odnos tjelesne mase životinje i potrebnog volumena anestetika. Mješavina ketamina (Ketaminol 10, 1,4 ml/kg, Intervet International, Nizozemska) i ksilazina (Xylapan, 0.6 ml/kg, Vetoquintol, Švicarska) injektirana je u stražnju mišićnu skupinu desne natkoljenice. Šišaćem i britvicom uklonjene su dlake u području gornjih kvadranta trbušne stijenke sve do 1cm iznad ksifoidnog nastavka prsne kosti. Endotrahealna intubacija izvedena je pomoću arterijskog katetera od 18 gauge. Životinje su potom postavljene na ravnu operacijsku podlogu i spojene pomoću iglenih elektroda na 6 kanalni EKG uređaj (Cardioline Delta 1). Prije početka operacije napravljen je kontrolni EKG zapis za usporedbu s drugim EKG zapisom nakon operacije kako bi se provjerile promjene koje ukazuju na ishemiju srčanog tkiva. Nakon ovog postupka pristupilo se operacijskom zahvatu (Slika 5).

3.5.2. Kirurško podvezivanje LAD-a

Životinje koje nisu odbijale konzumirati alkoholna pića i sve kontrolne životinje nakon 28 dana protokola prekondicioniranja različitim pićima podvrgnute su kirurškom podvezivanju LAD-a (Slika 7 A-C) čime se izazvao IM-a. Korišten je „transdijafragmatični pristup“ koji, u usporedbi s „interkostalnim pristupom“, uzrokuje drastično manje postoperativne boli kod životinja zbog činjenja reza u medijalnoj liniji gdje se nalazi najmanji broj živčanih završetaka. Kako i krvne žile minimalno anastomoziraju u ravnini simetrije, i krvarenje je ovim pristupom bilo praktičko nepostojeće. Najprije je kirurškim skalpelom učinjen mediosagitalni rez kože i potkožnog tkiva kako bi se prikazali mišići prednje trbušnog zida. Peritonealna šupljina otvorena je rezanjem lineae albae sve do 0,5 cm iznad ksifoidnog nastavka, koji se zatim secirao i podizanjem se pričvrstio na stalak čime se bolje vizualizirala abdominalna površina dijafragme.

Koristeći kirurški mikroskop (Leica, M520 MC1, Švicarska), vizualizirane su sitnije strukture. Dva retraktora korištena su za proširenje kirurškog polja. Jedan retractor držao je rubove trbušne stijenke, dok je drugi držao rubove dijafragme nakon što je napravljen rez u obliku slova „I“, koji se protezao jednu trećinu kroz središnji tetivni dio, a dvije trećine reza prolazilo je kroz mišićni dio. Zbog jatrogenog pneumotoraksa, uzrokovanog otvaranjem dijafragme, životinje se spojilo na životinjski ventilator (SAR 830, CWE Inc, USA) postavljen na točno određene parametre (56 udisaja u minuti i

udisajni tlak od 10 do 12 cm\H2O). Zatim je perikard pažljivo oljušten kako bi se jasno prikazala površina srca. Polazište LAD-a nalazi se na polovici linije koja spaja lijevu aurikulu i plućno deblo. Za razliku od LAD koja je dublje smještena, istoimena vena nalazi se površnije te je jasno vidljiva.



Slika 7: A-C Indukcija IM-a kirurškim podvezivanjem LAD-a. D Eksplantirano srce životinje koja je preživjela period od 96 sati nakon operacije. E Fiksirano i narezano srčano tkivo. E Trikromno Mallory bojanje jednog srčanog presjeka.

Svim životinjama podvezivanje se vršilo na istom mjestu, u razini donjeg ruba lijeve aurikule, što prema literaturi odgovara udaljenosti od 2-3 mm od njezinog početka. Podvezivanje se vršilo pomoću atraumatskog neresorptivnog kirurškog konca, veličine 8-0 (Prolene, 8-0, 6.5 mm, 3/8c, 60 cm, 8732H, Ethicon INC, New Jersey, USA) činjenjem tri čvora kako bi se osigurala permanentna okluzija. Uspješno podvezivanje srca potvrđeno je makroskopski uočljivim bljedilom srca, dokumentiranog fotoaparatom Canon PowerShot A480 (Canon, Japan). Nakon uklanjanja retraktora, dijafragma je zašivena jednostavnim produžnim šavom polazeći od mišićnog prema tetivnom dijelu neresorptivnim kirurškim koncem veličine 7-0 (Prolene, 7-0, 8.0 mm, 3/8c, 60 cm, 8735H, Ethicon INC, New Jersey, USA) ili 8-0 (Prolene, 8-0, 6.5 mm, 3/8c, 60 cm, 8732H, Ethicon INC, New Jersey, USA). Reekspanzija pluća izvodena je pomoću velike šprice (bez igle) spojene na dugu cijev i nastavkom, kako bi se evakuirao preostali zrak iz prsne šupljine i omogućilo životinji samostalno disanje nakon

odvajanja od ventilatora neporeдно prije učvršćivanja posljednjeg šava na dijafragmi. Trbušni zid zašiven je jednostavnim produžnim šavom s kirurškim koncem veličine 4-0, a zatim je zašivena i koža. Po završetku operacije snimio se još jedan EKG zapis kako bi se potvrdio IM. Promjene u EKG zapisu koje su upućivale na ishemijsku ozljedu su: ST elevacija, proširenje QRS kompleksa i inverzija T-vala (Slika 5). Životinje su provjerene zbog krvarenja iz rane i pravilnog samostalnog disanja prije nego što su stavljene pod lampu u čisti kavez kojim se sprječavala hipotermija tijekom postoperativnog razdoblja (3-5 sati). One životinje koje su preživjele 96 sati nakon operacije uključene su u daljnju imunohistokemijsku analizu.

3.6. Protokol pripreme tkiva

Nakon 96 sati od induciranja IM-a, životinje su ponovno anestetizirane i žrtvovane. Srca su eksplantirana (Slika 7D) te u cijelosti imerzijski fiksirana u Zambonijevom fiksativu (4% paraformaldehida i 0,2% pikrične kiseline u 0,1M PBS s pH 7.4) prema standardnoj proceduri (AbCam fixation protocol for IHC). Fiksiranje je trajalo tri dana, nakon čega su srca isprana PBS-om (Phosphate buffered saline) te rezana na tri dijela: prvi rez učinjen je 2 mm ispod ruba lijeve aurikule, a sljedeći rez 4 mm ispod tog reza. Tkivo je fotografirano (Canon PowerShot A480, Canon, Japan) (Slika 7E). Dehidriranje tkiva srca provodi se premještanjem tkiva u alkohol sve veće koncentracije (uzlazni niz alkohola), zatim se prebacuje u ksilol kako bi on zamijenio alkohol čime tkivo postaje prozirno (prosvjetljavanje). Nakon toga, tkivo se uklapa u parafinske blokove u termostatu na temperaturi 56-60°C. Oblikovani parafinski blokovi pojedinog uzroka režu se na rezove debljine 4-6 mikrometara korištenjem rotacijskog mikrotoma Leica RM 2155 (Leica Microsystems AG, Njemačka) koji se postavljaju na predmetna stakalca.

3.6.1. Trikromno bojanje po Malloryu i bojanje hematoksinom i eozinom (H&E)

Kako bi se identificirali reprezentativni uzorci s transmuralnim IM-om, uključujući sve relevantne zone koje se istražuju, histološki rezovi su obojeni trikromnim Mallory i H&E bojanjem (Slika 7F). Obojani uzorci fotografirani su digitalnim fotoaparatom (Canon PowerShot A480, Canon, Japan) postavljenog na visoko povećanje, a rezovi na kojima su se prikazivale sve zone od interesa pregledane su pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus CH20, Olympus, Japan). Na mikrofotografijama obrađenim osnovnim imunohistokemijskim bojanjima uočene su sljedeće morfološke promjene u tkivu srca: gubitak poprečne ispruganosti, gubitak kardiomiocita, infiltracija upalnih stanica (neutrofila, limfocita i pretežito makrofaga) u periinfarktnom području oko infarciranog mrtvog tkiva, stanjenje stijenke klijetke, proširenje klijetke i početni znakovi stvaranja

granulacijskog tkiva. Mallory bojanjem, koji vrlo jasno boja kolagen, moguće je precizno odrediti granice infarciranog tkiva i periinfarktne zone u odnosu na zdravi miokard stoga je to bojanje poslužilo kao konačna potvrda transmuralnog IM-a.

3.7. Imunofluorescencijska tehnika

Rezovi štakorskih srca (životinja uključenih u daljnje istraživanje) deparafinirani su uranjanjem u ksilol, nakon čega je provedeno rehidriranje tkiva uranjanjem u alkohole sve nižih koncentracija. Rezovi su kratko odstajali u destiliranoj vodi te su potom stavljeni u prethodno zagrijani citratni pufer (pH = 6,0) na 30 minuta u kuhu na pari kako bi se otkrili epitopi i prikazali antigeni. Minimiziranje nespecifičnog vezanja antigena postignuto je korištenjem Protein Block otopine kroz 30 min nakon što su se rezovi ohladili u citratnom puferu i bili blago isprani. Rezovi su inkubirani kroz noć u vlažnoj komori na +4°C s primarnim protutijelima.

Primarna protutijela korištena u istraživanju:

1. rabbit recombinant monoclonal anti – CD163 antibody (ab182422, Abcam, UK, razrjeđenje 1:250)
2. mouse monoclonal anti – CD68 antibody (ab31630, Abcam, UK, razrjeđenje 1:250)
3. mouse monoclonal anti – α -SMA antibody (ab7817, Abcam, UK, razrjeđenje 1:500)

Protutijela na CD163 i na CD68 bojana su na istom rezu, a protutijelo na α -SMA na sljedećem zasebnom rezu. Nakon inkubacije tijekom noći te poslije višestrukog ispiranja primarnih protutijela u PBS-u, rezovi su inkubirani tijekom 1,5 sati na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutijelima:

1. Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (ab150084, Abcam, UK, razrjeđenje 1:200)
2. Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150117, Abcam, UK, razrjeđenje 1:200)

Nakon inkubacije i trostrukog ispiranja PBS-om, rezovi su 1-2 minute inkubirani s DAPI indikatorom (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Abcam, UK), fluorescentnim bojilom koje se specifično veže za DNA, a služi za prikazivanje jezgre stanica. Rezovi su zatim isprani pod mlazom destilirane vode, osušeni na zraku te prekriveni Immu-mount medijom (Immu-Mount, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD), kako bi se moglo staviti pokrovno stakalce i mikroskopirati na imunofluorescencijskom mikroskopu.

3.7.1. Prikupljanje fotografija/podataka

Rezovi obojani primarnim (i sekundarnim) protutijelima pregledani su na epifluorescentnom mikroskopu (Olympus BX51, Tokio, Japan) i fotografirani su pomoću Nikon DS-Ri2 kamere (Nikon Corporation, Tokio, Japan) uz korištenje softvera NIS-Elements F software (version 5. 22. 00). Na svakom rezu zabilježene su četiri zone koje okružuju infarcirano područje: periinfarktne zone na rubovima infarkta s obje strane u kontaktu sa zdravim tkivom, subepikardijalna zona između infarciranog miokarda i epikarda te subendokardijalna zona između infarciranog područja i endokarda. Unutar svake zone odabrana su četiri nepreklapajuća polja koja su fotografirana na povećanju 40 puta. Za svako polje (rezova bojanih na CD163 i CD68) fotografirane su slike kroz tri filtera: zeleni (Alexa Fluor 488), crveni (Alexa Fluor 594) i plavi (DAPI). Signal α -SMA sniman je kroz zeleni filter (Alexa Fluor 488). Sve fotografije snimljene su s istom rezolucijom (1360 x 1024) i ekspozicijom (1000 ms), a spot size je podešen na 0,1 %.

3.7.2. Kvantitativna analiza podataka

Prikupljene mikrofotografije obrađene i analizirane pomoću kompjuterskog programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD) i Adobe Photoshop 7.0 programa. Slike polja na sva tri filtera preklapljene su u programu ImageJ u jednu sliku (Merge Channels) kako bi se omogućila kolokalizacija protutijela CD163 i CD68 (biljega makrofaga). Nakon toga, slike unutar pojedinačnog kanala obrađene su kako bi se ublažio intenzitet DAPI signala i postigla optimalna vidljivost pozitivnog signala primarnih protutijela (Channels tools i Brightness/Contrast alata). Kvantifikacija ukupnog broja pozitivnih stanica na biljege makrofaga po polju izvršena je uz pomoć „Multipoint tool“ alata, pri čemu su se kao pozitivne stanice brojale one koje su pokazivale preklapanje DAPI i signala pojedinog primarnog protutijela. Gustoća stanica za svaki biljeg izračunata je po površini polja nakon isključenja zdravih dijelova tkiva i artefakata sa slike. Analiza signala α -SMA provedena je korištenjem „Color Threshold“ alata, gdje su postavljeni jednaki intervali za intenzitet pozitivnog signala čime se izračunala površina slike pokrivena pozitivnim signalom, izražena kao broj piksela. kako bi se izračunala površina slike pokrivena pozitivnim signalom, izražena kao broj piksela. Postotak površine prekrivene pozitivnim signalom izračunava se kao omjer površine prekrivene pozitivnim signalom u pikselima prema ukupnoj površini slike u pikselima, uz prethodno oduzimanje zdravih dijelova i artefakata. Ovim pristupom postignuta je maksimalna objektivnost i konzervativnost u mjerenju izražaja pozitivnog signala.

$$\rho(\text{CD68 ili CD163}) = \frac{\text{br. pozitivnih stanica (CD68 ili CD163)}}{\text{ukupna površina slika (pixela) - zdravo tkivo te artefakti (pixela)}}$$

ρ - gustoća makrofaga pozitivnih na pojedino primarno protutijelo (CD68 ili CD163) izražena kao broj pozitivnih stanica na pojedino protutijelo po površini slike izračunate u pixelima

$$P(\% \alpha - \text{SMA}) = \frac{\text{pozitivan zeleni signal } \alpha - \text{SMA (pixela)}}{\text{ukupna površina slike (pixela) - zdravo tkivo te artefakti (pixela)}}$$

P – postotak pozitivnog signala α -SMA od ukupne površine slike izračunate u pixelima

Konačan rezultat izražaja svakog od korištenih biljega za pojedinu zonu dobiven je izračunom prosječne vrijednosti za četiri slike unutar subendokardijalne i subepikardijalne zone, a rezultati za obje periinfarktne zone su prikazani kao jedan broj (prosječna vrijednost od ukupno osam polja, četiri za svako periinfartno područje).

3.8. Statistička analiza podataka

R programski jezik za statističko računanje, verzija 4.4.2, korišten je za analizu i vizualizaciju podataka. Statistička značajnost postavljena je na razini $p < 0,05$. Studentov t-test za nezavisne uzorke primijenjen je za usporedbu srednjih vrijednosti kada su uzorci bili normalno distribuirani. U slučaju da uzorci nisu bili normalno raspodijeljeni, korišten je Mann-Whitney test. Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilk testom. Za usporedbu proporcija (stope preživljenja) proveden je test temeljen na distribuciji generiranoj „bootstrap metodom“ pod pretpostavkom nul-hipoteze da nema razlike između skupina. Podatci su prezentirani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Ovi testovi primijenjeni su u članku koji se bavio preživljenjem štakora nakon IM-a.

U drugom radu, normalnost distribucije također je bila testirana Shapiro-Wilk testom. Usporedba srednjih vrijednosti između tri grupe provedena je jednosmjernom analizom varijance (one-way ANOVA), dok je usporedba dviju grupa rađena koristeći t-test za neovisne uzorke. Marginalne vrijednosti procijenjene su iz linearnog modela prilagođenog podacima, uzimajući u obzir varijable eksperimentalne grupe i količinu popijenog alkoholnog pića. Ovi testovi korišteni su u članku koji je uključivao imunohistokemijsko bojanje i analizu polarizacije makrofaga. Razina značajnosti prikazana je korištenjem sljedećih oznaka: *** $p < 0,001$, ** $p \geq 0,001$ i $p < 0,01$, * $p \geq 0,01$ i $p < 0,05$ te n.s. $p \geq 0,05$.

U ranijim pokusima na ishemijsko-reperfuzijskom modelu te na pokusu s trajnim podvezivanjem LAD-a uz prekondicioniranje bijelim vinom te žrtvovanjem nakon 24h bile su potrebne 4 životinje

po skupini za signifikantnost razlika u procesu cijeljenja na staničnoj razini, pa se sa velikom sigurnošću smatralo da bi ti brojevi bili dovoljni i za ovaj pokus.

Na početku istraživanja uključen je veći broj štakora (80) da bi nakon primjene kriterija uključivanja i isključenja životinja u istraživanju u svakoj skupini ostalo 7 životinja. Početni broj životinja procijenjen je s obzirom na višegodišnje iskustvo istraživača te rezultate ranijih publikacija u kojima su primjenjivani slični protokoli kako bi se mogao odrediti najmanji mogući broj životinja potrebnih za dobivanje pouzdanih i objavljivih rezultata optimalne statističke snage za predloženu temu.

4. REZULTATI

Rezultati su podijeljeni u dvije faze. U prvom dijelu uspoređivane su stope preživljenja u trima eksperimentalnim skupinama. Kroz drugi dio promatrane su razlike u dinamici cijeljenja u proliferativnoj fazi kroz praćenje udjela protuupalnih makrofaga i izražaj biljega miofibroblasta. U oba slučaja, u obzir su uzete i količine popijenog alkoholnog pića kako bi se mogle napraviti relevantne usporedbe između skupina.

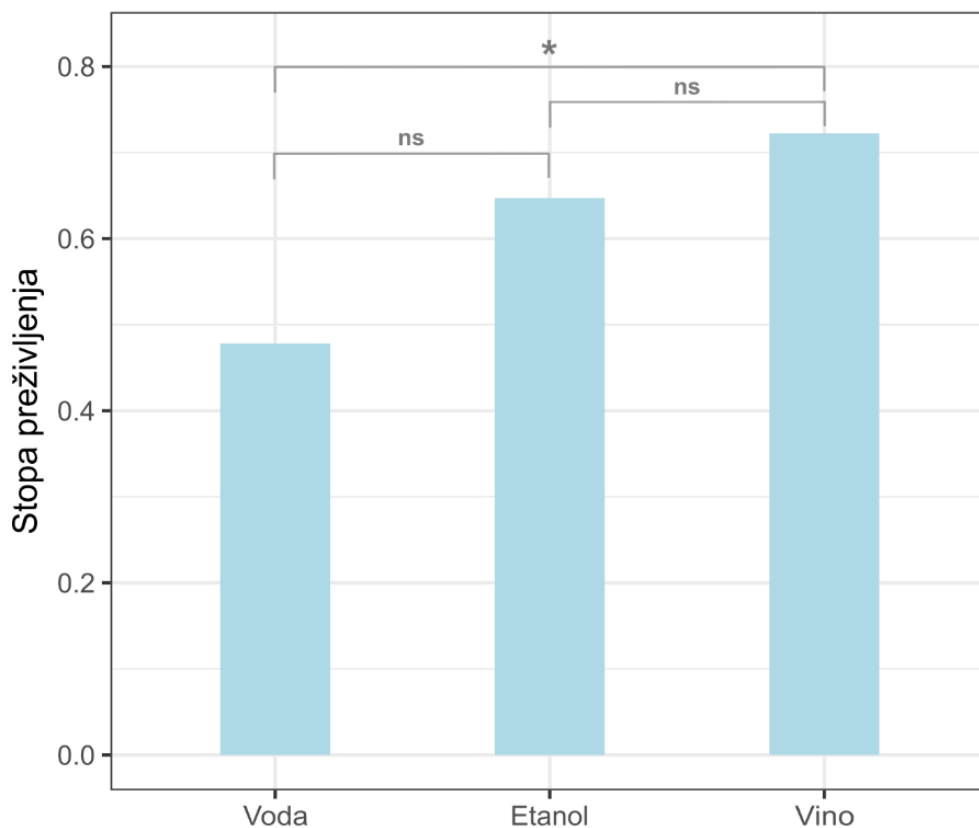
4.1. Stope preživljenja

Primjenom kriterija isključenja koji su prethodili operaciji (Slika 6) i analiziranjem samo životinja kojima je indukcija IM-a potvrđena usporedbom EKG-a nakon i prije operacije (Slika 5), preostalo je 18 životinja u vinskoj skupini, 17 u etanolnoj skupini i 23 u skupini koja je pila samo vodu (Tablica 3). Stopa preživljenja bila je najviša u skupini koja je pila vino (72,2%) i najniža u skupini koja je pila samo vodu (47,8%).

Tablica 3: Broj štakora 96 sati nakon uspješno inducirano IM-a s obzirom na skupinu i status preživljenja.

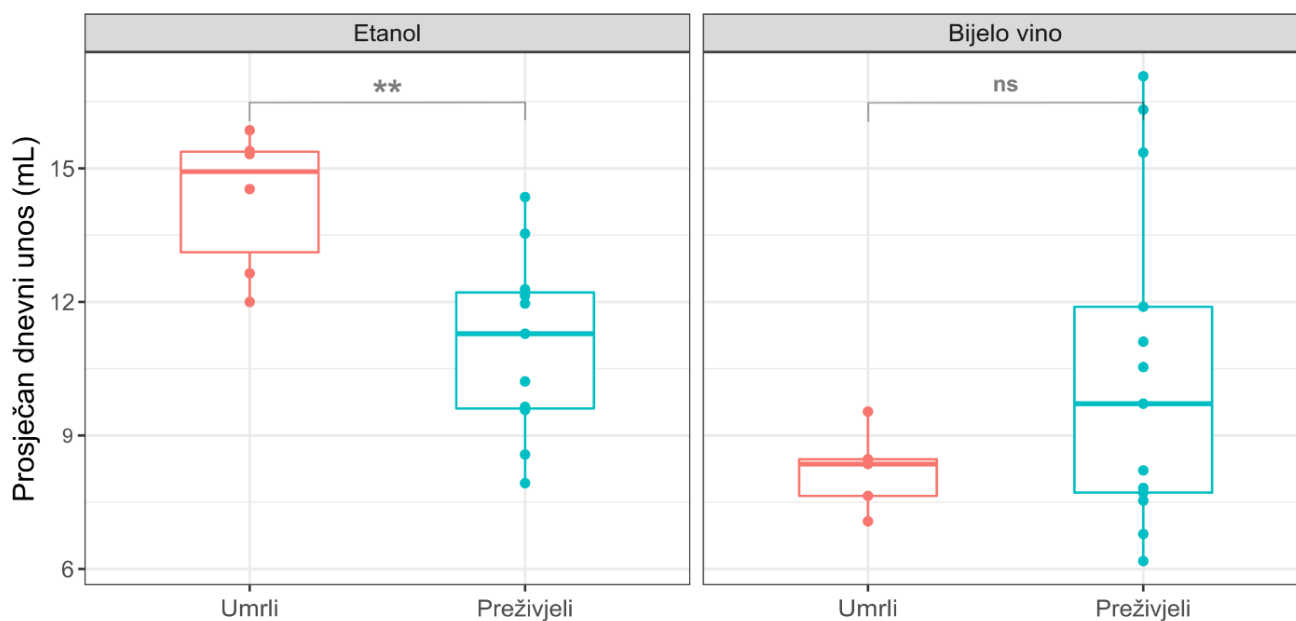
Skupina	Preživjeli	Umrli	Ukupno
Bijelo vino	13 (72.2%)	5 (27.8%)	18
Vodena otopina etanola	11 (64.7%)	6 (35.3%)	17
Voda	11 (47.8%)	12(52.2%)	23

Stopa preživljenja etanolne skupine bila je u sredini s vrijednošću od 64,7%. Stopa preživljenja u skupini koja je pila vino bila je značajno veća nego u skupini koja je pila samo vodu ($p = 0,048$). Između skupine koja je pila samo vodu i skupine koja je pila vodenu otopinu etanola nije bilo statistički značajne razlike ($p = 0,143$), kao ni između skupine koja je pila vodenu otopinu etanola i one koja je pila vino ($p = 0,363$) (Slika 8) .



Slika 8: Usporedba stopa preživljenja između skupina štakora koji su pili bijelo vino i vodu, 13% etanola i vodu ili samo vodu. ns = nije značajan. * označava p-vrijednost između 0,01 i 0,05.

Kako bi se dobio bolji uvid u razliku između etanolne i vinske skupine, provjerena je distribucija prosječnog dnevnog unosa vina u skupinama s obzirom na to je li životinja preživjela 96 sati nakon inducirano IM-a (Slika 9). Unutar svake skupine, životinje koje su preživjele nisu se značajno razlikovale od umrlih životinja po masi i prosječnom dnevnom unosu vode (Tablica 4).



Slika 9: Usporedba dnevnog unosa vodene otopine etanola i bijelog vina ovisno o ishodu (umro ili preživio) četiri dana nakon indukcije IM-a. ns = nije značajno. ** označava p-vrijednost između 0,001 i 0,01.

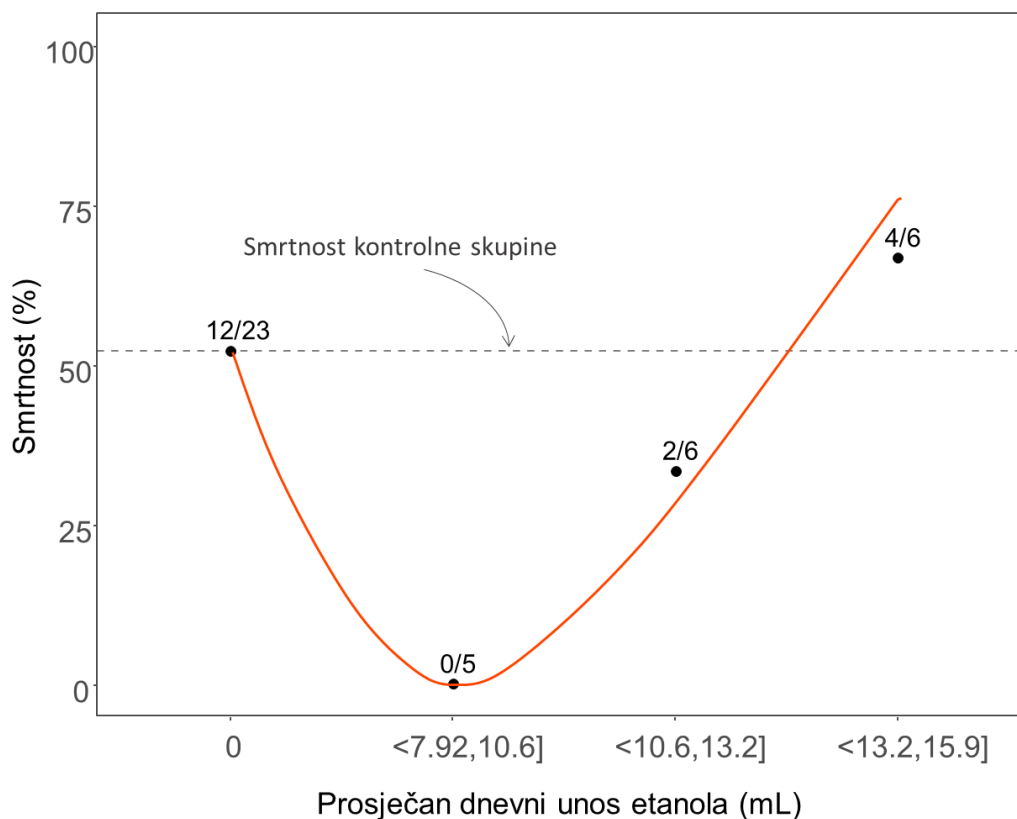
Tablica 4: Unos bijelog vina, vodene otopine etanola i vode na temelju ishoda nakon inducirano^g IM-a. Posljednji redak sadrži p-vrijednosti značajnosti razlika između odgovarajućih mjerenja unutar iste skupine. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. P-vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom. ns = nije značajno. ** označava p-vrijednost između 0,001 i 0,01. VOE = vodena otopina etanola.

Status preživljenja	Vinska skupina			Etanolna skupina		
	Vino (ml)	Voda (ml)	Masa (g)	VOE (ml)	Voda (ml)	Masa (g)
Preživjeli	10,5 \pm 3,7	20,1 \pm 1,2	329 \pm 13	11,0 \pm 2,1	12,1 \pm 2,1	330 \pm 37
Umrla	8,21 \pm 0,93	19,4 \pm 8,2	351 \pm 11	14,3 \pm 1,6	11,9 \pm 2,3	345 \pm 1
Značajnost	ns	ns	ns	**	ns	ns

No, rezultati ukazuju na postojanje značajne razlike između prosječnog dnevnog unosa alkoholnog pića umrlih i preživjelih životinja u etanolnoj skupini, dok razlika nije bila značajna u vinskoj skupini (Tablica 4, Slika 9). Također, nijedna životinja u etanolnoj skupini nije preživjela ukoliko je dnevno

prosječno unosila više od 15 ml vodene otopine etanola. U vinskoj skupini takva gornja granica nije uočena na usporedivim vrijednostima prosječnog dnevnog unosa bijelog vina (prosječni volumeni mogu se direktno uspoređivati jer je vodena otopina etanola pripravljena tako da postotak etanola odgovara postotku etanola u danom bijelom vinu). Dapače, u vinskoj skupini umirale su samo životinje s prosječnim dnevnim unosom manjim od 10 ml bijelog vina.

S obzirom na uočeno postojanje gornje granice unosa vodene otopine etanola s obzirom na preživljenje, napravljena je i vizualizacija promjene stope smrtnosti s obzirom na volumne intervale konzumacije vodene otopine etanola. Intervali su određeni na način da se količine unosa podijele u tri kategorije tako da svaka kategorija pokriva jednako velik volumni raspon (Slika 10).



Slika 10: Trend promjene smrtnosti štakora u etanolnoj skupini s obzirom na prosječan dnevni unos vodene otopine etanola životinja. Unosi su ravnomjerno podijeljeni u tri kategorije na način da svaka kategorija predstavlja jednako velik volumni interval.

4.2. Dinamika cijeljenja u proliferativnoj fazi

Isključenjem životinja koje nisu preživjele 96 sati nakon indukcije IM-a, nisu imale vidljiv transmuralan infarkt nakon bojanja po Malloryju ili su dnevno prosječno pile manje od 8 ml alkoholnog pića, preostalo je 7 životinja u svakoj ekperimentalnoj skupini (Slika 6).

Usporedba unosa alkoholnih pića, vode i mase za konačno analizirane životinje dana je u Tablici 5. Nije bilo statistički značajne razlike u konačnoj tjelesnoj masi u vrijeme operacije između tri skupine ($p = 0,54$, jednosmjerni ANOVA test). Prosječna količina dnevnog unosa alkoholnih pića također se nije značajno razlikovala među skupinama ($p = 0,11$, Studentov t-test s dva uzorka). Količina konzumirane vode bila je značajno veća u skupini vode, ali nije uočena značajna razlika kada su uspoređene skupine vodene otopine etanola i bijelog vina ($p = 0,21$, Studentov t-test za nezavisne uzorke).

Tablica 5: Usporedba unosa alkoholnih pića, vode i mase među eksperimentalnim skupinama. Donji redak prikazuje p-vrijednosti jednosmjernog ANOVA testa u slučaju uspoređivanja tri skupine ili studentova t-testa za neovisne uzorke pri usporedbi razlika odgovarajućih parametara između dvije skupine. $p < 0,001$, ** $p \geq 0,001$ i $p < 0,01$, * $p \geq 0,01$ i $p < 0,5$, n.s. $p \geq 0,05$.

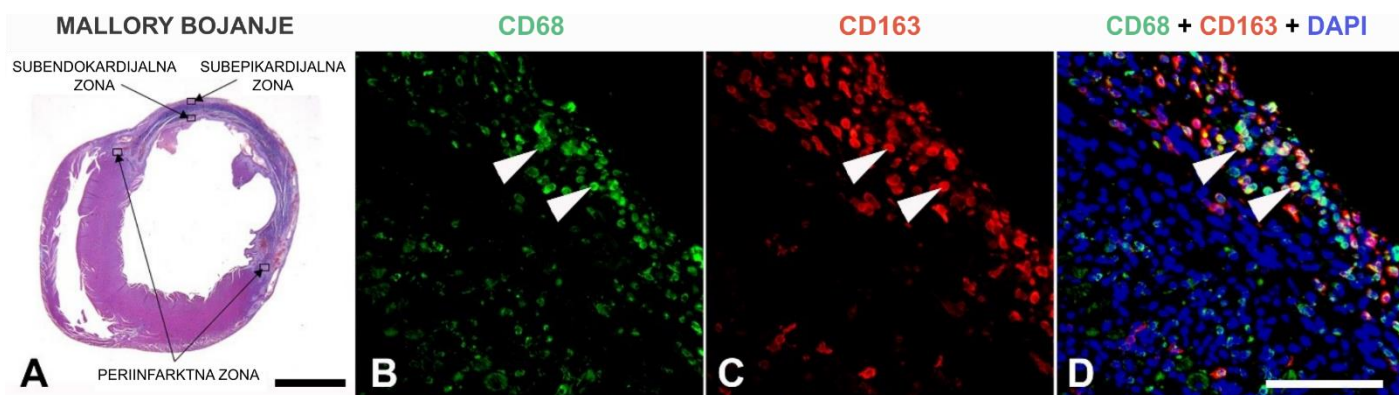
Skupina	Alkoholno piće (ml)	Voda (ml)	Masa(g)
Bijelo vino	12.8 ± 1.3	15.2 ± 2.1	325 ± 14
Vodena otopina etanola	10.3 ± 0.6	12.1 ± 0.1	321 ± 5
Voda	/	37 ± 1	336 ± 5
Značajnost	n.s.	***	n.s.

Kako bi se eliminirao utjecaj potencijalne značajne razlike između veličina IM-a u pojedinim skupinama, nakon Mallory bojanja infarciranog tkiva mjerena je veličina IM-a za svaku životinju. Jednosmjerni ANOVA test nije pokazao postojanje značajne razlike između skupina s obzirom na veličinu IM-a ($p = 0,583$).

4.2.1. Analiza razlika među skupinama s obzirom na brojnost i vrstu makrofaga

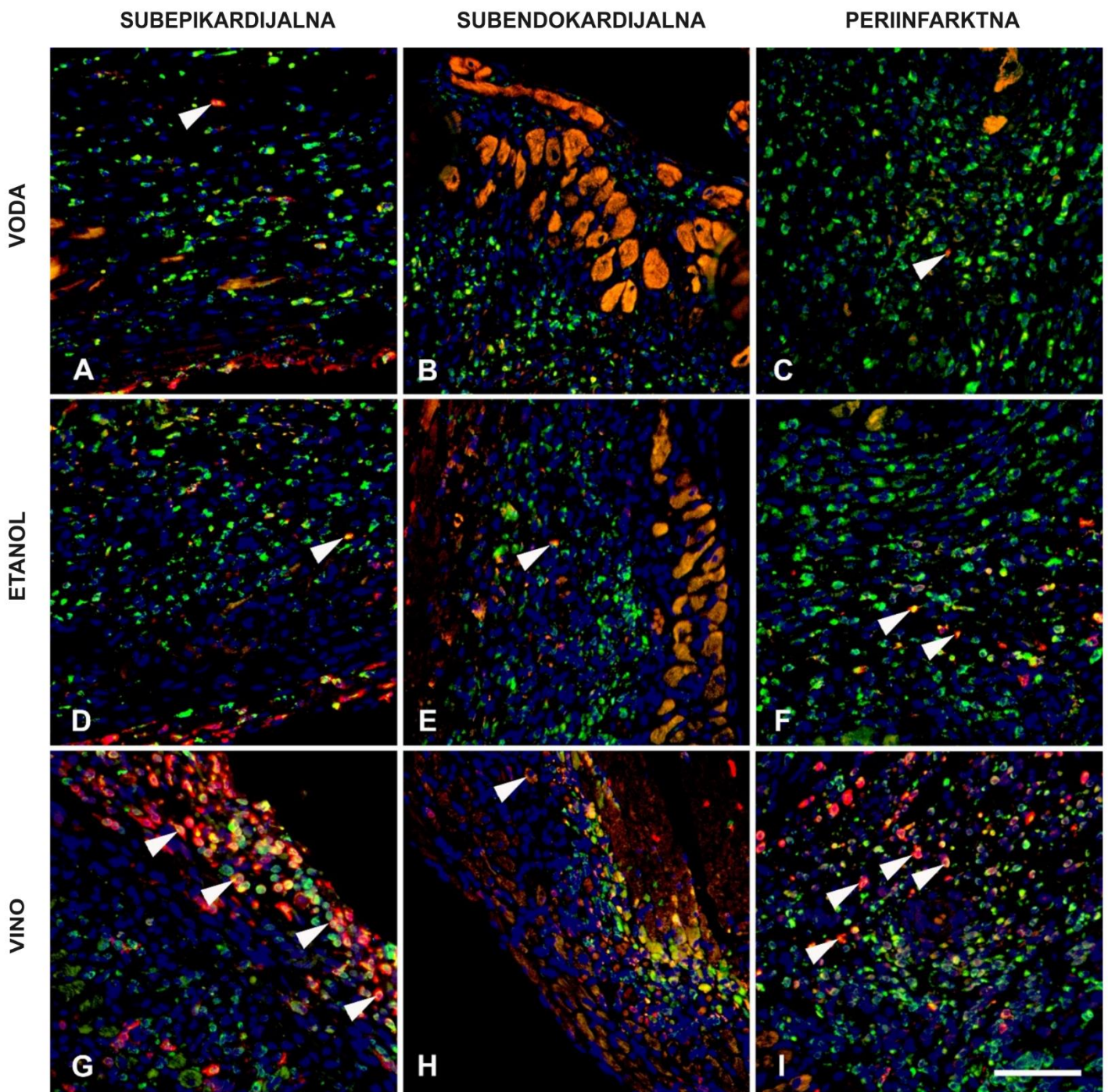
Na presjeku tkiva srca odabrane su četiri zone od interesa: dvije periinfarktne zone na krajevima infarciranog područja, subepikardijalna i subendokardijalna zona (Slika 11A). Četiri susjedna polja koja se ne preklapaju snimljena su pri povećanju od 40× za svako od navedenih zona. Za svako polje snimljene su tri fotografije kroz tri različita filtra: zeleni (Alexa Fluor 488) (Slika 11B), crveni (Alexa Fluor 594) (Slika 11C) i plavi (DAPI). Slika 11D prikazuje kompozitnu sliku dobivenu preklapanjem slika sa sva tri signala. Analiza takvih slika omogućava kolokalizaciju CD163

i CD68 pozitivnih makrofaga s DAPI-jem na svakom analiziranom polju kako bi se učinkovito mogla odrediti područja preklopa.



Slika 11: **A)** Poprečni presjek srca (trikromno bojanje po Malloryu) koji pokazuje veliko infarktno područje prednjeg zida lijeve klijetke s četiri zone od interesa. Imunofluorescencijske slike CD68 (zelena) **(B)** i CD163 (crvena) **(C)** imunoreaktivnosti subepikardijalne zone. Bijele strelice pokazuju označene makrofage. **D)** Preklop slika **B** i **C** s DAPI signalom za detekciju kolokalizacije (bijeli vrhovi strelica). Skala: A = 2,5 mm, B-D = 100 μ m.

Slika 12 prikazuje kompozitne slike sa sva tri signala za sve kombinacije zona i eksperimentalnih skupina. Jasno se vidi da je na slikama za vinsku skupinu udio stanica obilježenih crvenim biljgom (CD163 pozitivni, tj. protuupalni M2 makrofazi) znatno veći nego na slikama za etanolnu skupinu i kontrolnu skupinu koja je konzumirala vodu.

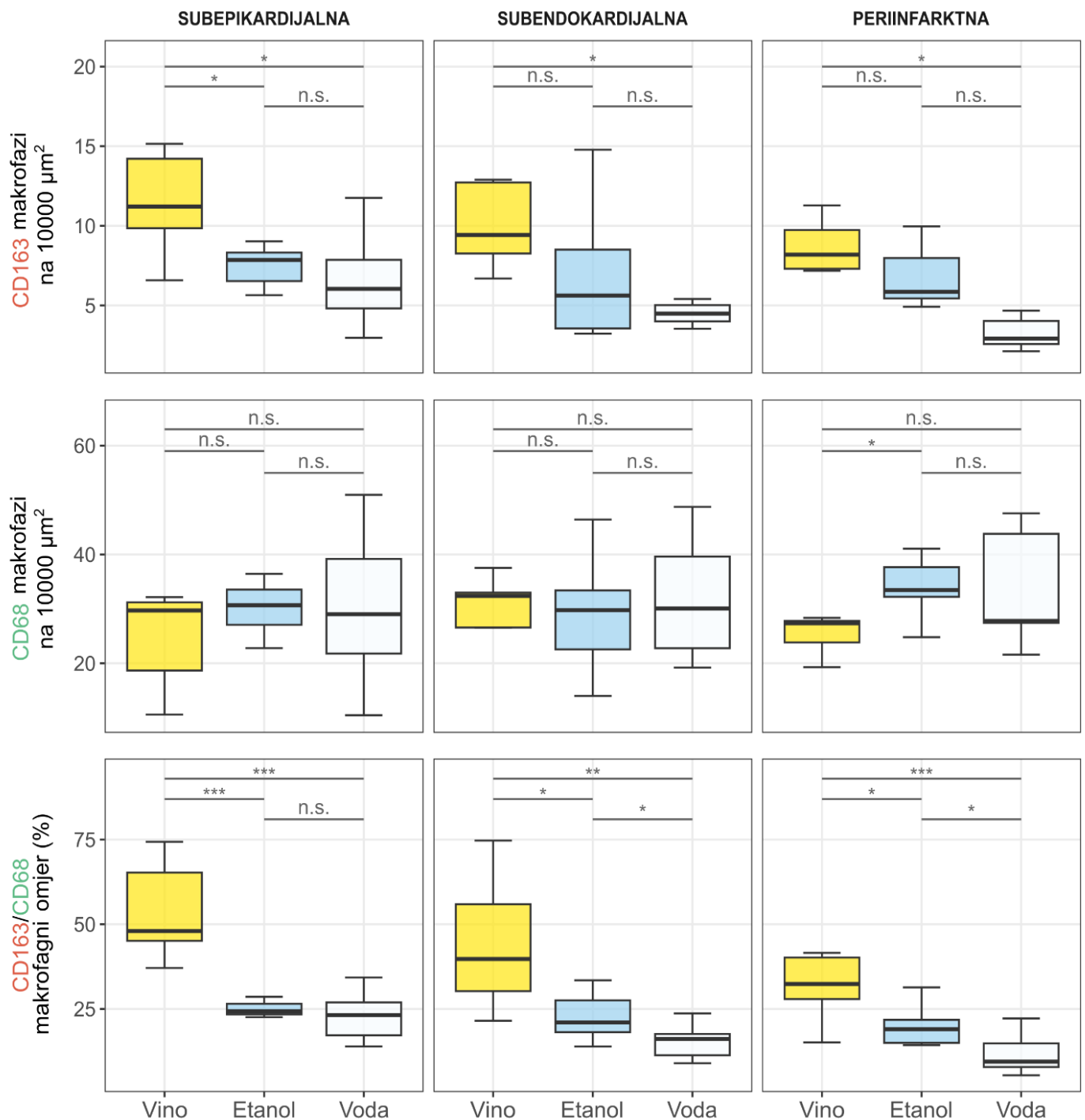


Slika 12: Razlike gustoće naseljenosti pojedinih biljega makrofaga u analiziranim zonama ovisno o eksperimentalnoj grupi. Slike A-C predstavljaju primjere za grupu koja je pila isključivo vodu, D-F za grupu koja je uz vodu pila i vodenu otopinu etanola, te G-I za grupu koja je uz vodu imala pristup i bijelom vinu. Bijele strelice pokazuju primjere kolokalizacije (vrhovi strelica). Sve slike su istog povećanja, a skala na slici i predstavlja 75 μm .

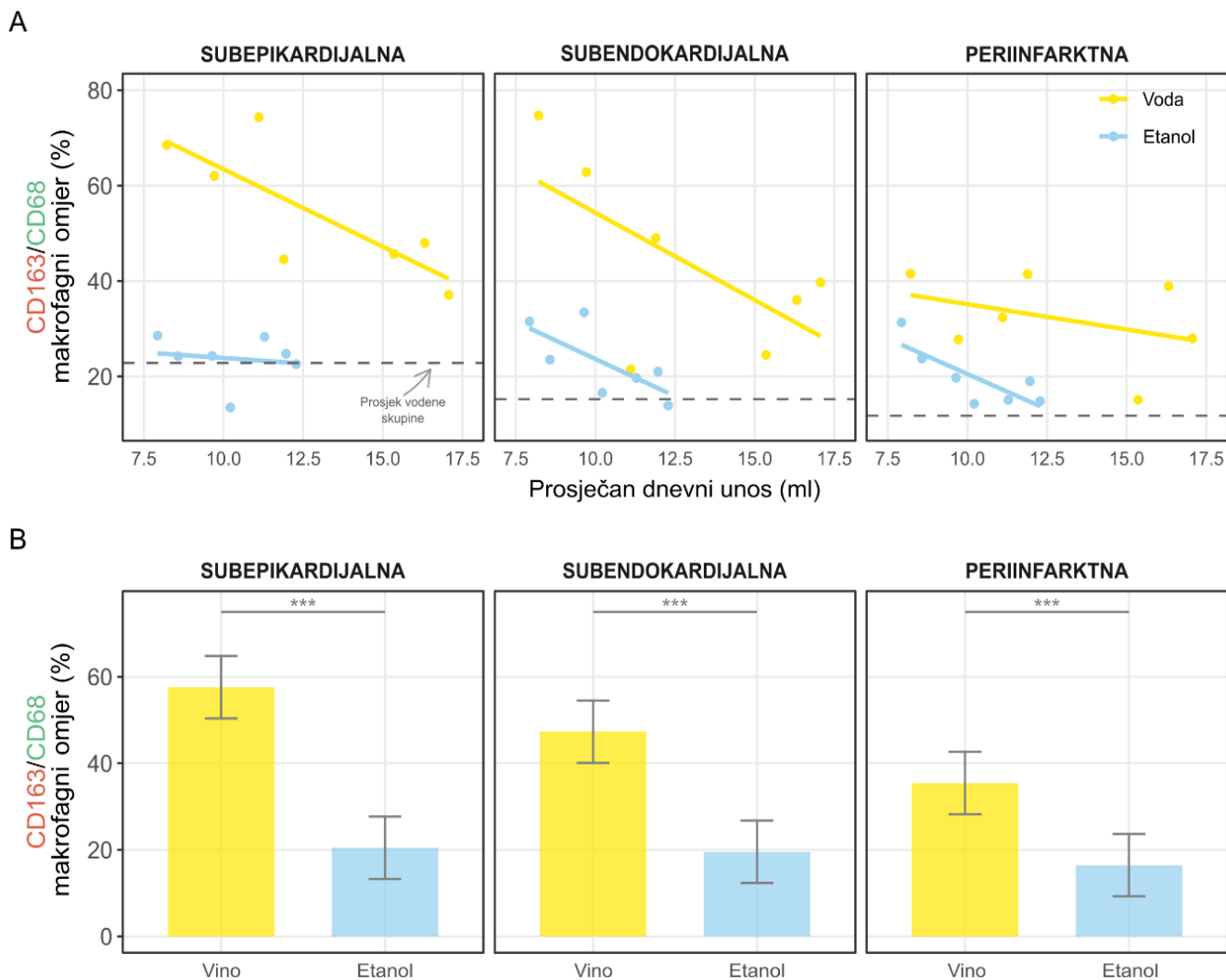
Kako bi se ispitalo postojanje razlika između učinaka bijelog vina, vodene otopine etanola i vode na upalne aspekte procesa zacjeljivanja nakon IM-a, kvantitativnom analizom mikroskopskih slika za svaku zonu koja okružuje infarktno srčano tkivo određene su tri vrijednosti: gustoća CD163 i CD68 pozitivnih makrofaga te omjer broja CD163 i CD68 pozitivnih makrofaga.

Rezultati analize nisu pokazali značajne razlike u gustoći CD68 panmakrofagnog biljega između skupina ni u jednoj zoni, osim rubno značajne razlike između vinske skupine i etanolne skupine u periinfarktnoj zoni (Slika 12, Slika 13). S druge strane, analiza gustoće CD163 pozitivnih makrofaga (biljeg protuupalnih, M2, makrofaga), pokazala je statistički značajne razlike između vinske skupine i skupine koja je konzumirala vodu u svim zonama. Usporedba gustoća između vinske i etanolne skupine bila je značajna samo u subepikardijalnoj zoni, dok razlike između etanolne i skupine koja je pila vodu nisu bile značajne ni u jednoj zoni.

Osim zasebnih gustoća, računat je i njihov omjer kako bi se istovremeno obuhvatile obje informacije. Računati omjer CD163 i CD68 pozitivnih makrofaga predstavlja udio protuupalnih u ukupnom broju makrofaga, i bio je najveći u vinskoj skupini, a slijede ga etanolna skupina i skupina koja je pila samo vodu. Uočene su značajne razlike između svih kombinacija skupina u svim zonama, osim razlike između etanolne skupine i skupine koja je pila vodu u subepikardijalnoj zoni koja nije ispala značajna.



Slika 13: Usporedba gustoća naseljenosti i omjera tih gustoća za različite tipove makrofaga između eksperimentalnih grupa u tri zone od interesa. Vodoravne crte na vrhu dijagrama i tekst iznad njih ukazuju na značajnost t-test za nezavisne uzorke. $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ i $p < 0,01$, \geq^* $p < 0,01$ i $p < 0,05$, n.s. $p \geq 0,05$.

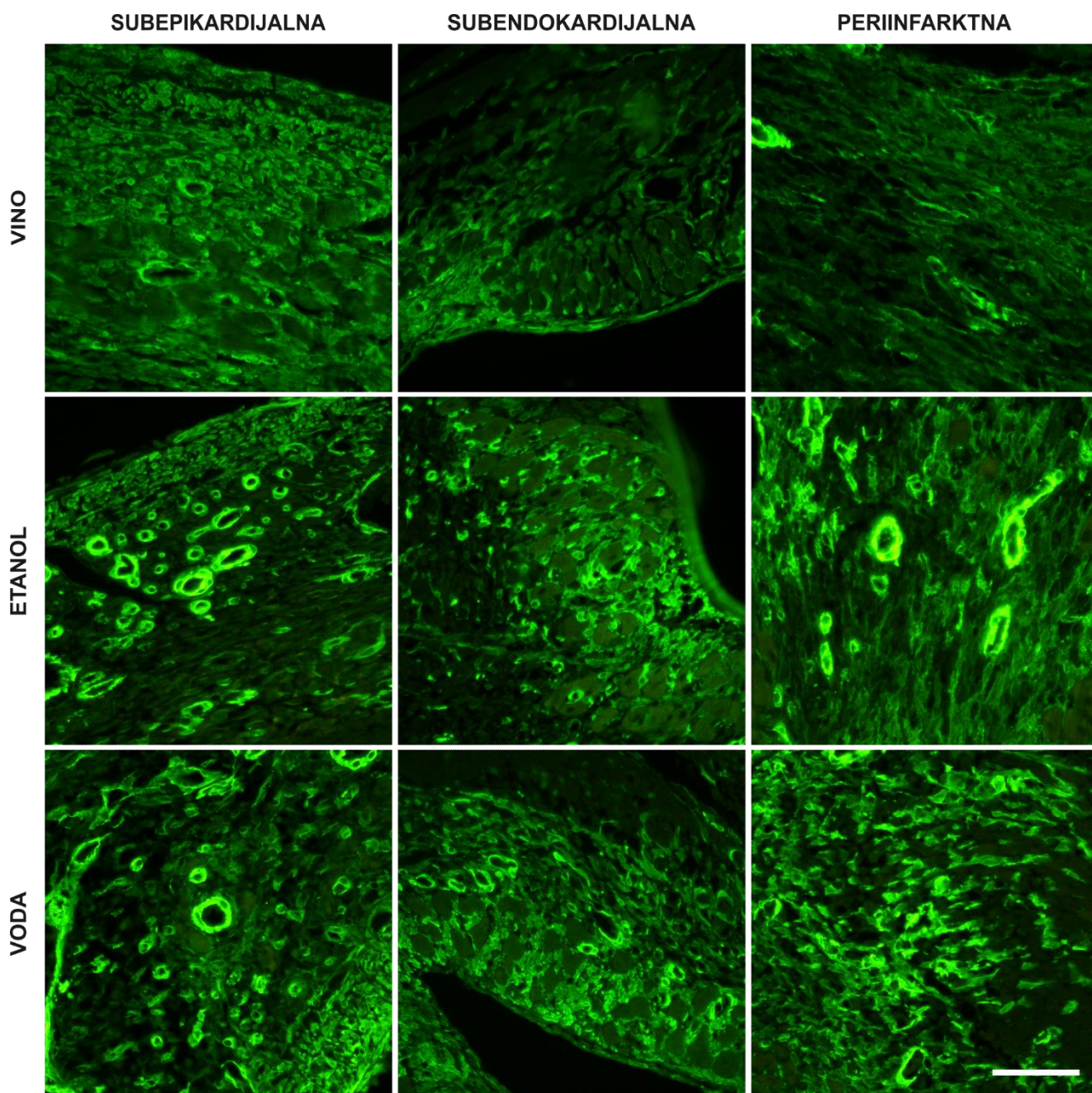


Slika 14: Usporedba omjera CD163 i CD68 pozitivnih makrofaga između skupina koje su pile vodenu otopinu etanola i bijelo vino za svaku zonu. **A)** Trend vrijednosti omjera s obzirom na prosječan dnevni unos alkoholnog pića od strane životinja u svakoj skupini za svaku analiziranu zonu. Vodoravna isprekidana linija označava prosječnu vrijednost omjera za kontrolnu skupinu vode. **B)** Usporedba CD163/CD68 makrofagnog omjera prilagođenog s obzirom na razlike u prosječnom unosu etanola između skupina. Pogreške označavaju interval pouzdanosti od 95%. Vodoravne crte na vrhu dijagrama i tekst iznad njih označavaju značajnost t-testa za nezavisne uzorke. $p < 0,001$, $** p \geq 0,001$ i $p < 0,01$, $* p \geq 0,01$ i $p < 0,05$, n.s. $p \geq 0,05$.

S obzirom na postojanje gornje granice prosječnog unosa etanola kod preživjelih životinja u etanolnoj skupini i izostanak te granice u vinskoj skupini (Slika 9), detaljnije je analizirana i ovisnost CD163/CD68 omjera o prosječnom dnevnom unosu alkoholnog pića analiziranih životinja. Uočen je trend smanjenja omjera u svim zonama i za vinsku i za etanolnu skupinu (Slika 14A). Kvantifikacija snage trenda napravljena je prilagodbom linearnog modela na podatke svake skupine. Dobiveni model iskorišten je za procjenu marginalnih srednjih vrijednosti koje uzimaju u obzir efekt ovog trenda i postojanje gornje granice u etanolnoj skupini na usporedbu vrijednosti makrofagnog omjera. Usporedbom tako dobivenih vrijednosti, razlike u vrijednostima omjera u tim dvjema skupinama postale su još izraženije (Slika 14B), s visokom razinom statističke značajnosti u svim analiziranim zonama.

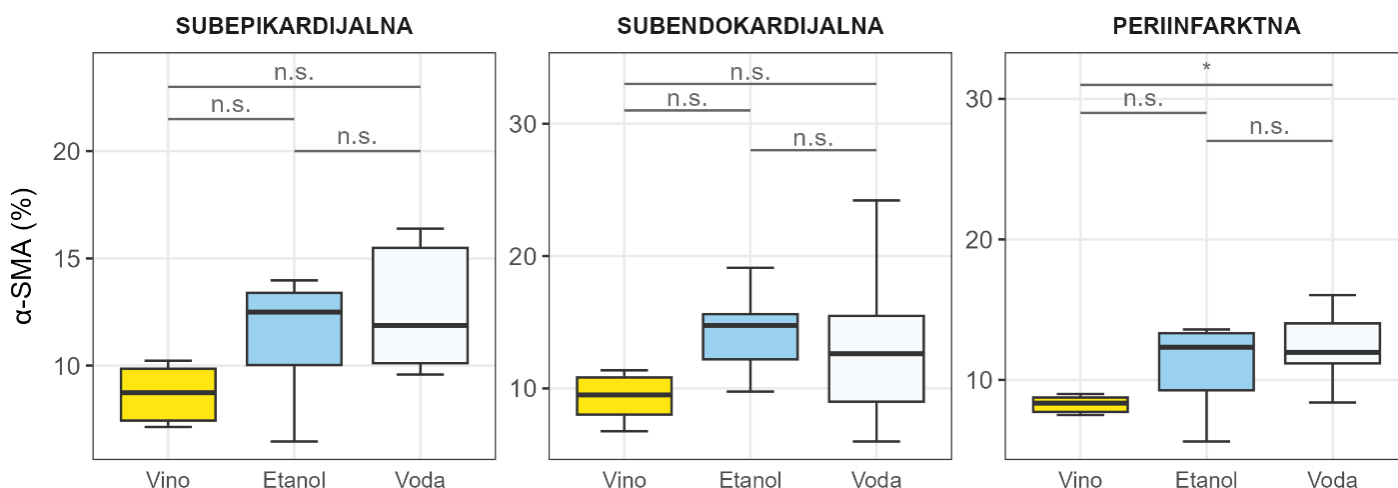
4.2.2. Usporedba izražaja α -SMA biljega miofibroblasta

Osim analize gustoće naseljenosti i vrste makrofaga, provedeno je i bojanje rezova tkiva α -SMA biljekom kako bi se ustanovila i usporedila aktivnost miofibroblasta u zonama od interesa (Slika 15). Slike dobivene fluorescencijskom mikroskopijom vizualno ukazuju na razlike u izražaju α -SMA biljega između grupa u svakoj zoni. Izražaj ovog biljega čini se najmanjim u vinskoj skupini u svim zonama, s tim da je razlika najuočljivija u periinfarktnoj zoni.



Slika 15: Razlike u izražaju α -SMA biljega u analiziranim zonama ovisno o eksperimentalnoj skupini. Sve slike istog su povećanja. Skala u donjem desnom kutu predstavlja 75 μ m.

Kvantifikacijom intenziteta biljega izračunate su prosječne vrijednosti izražaja za svaku skupinu i zonu. Dobiveni numerički rezultati slažu se s dojmom sa slika. Najmanje prosječne vrijednosti biljega dobivene su u vinskoj skupini, srednje velike vrijednosti u etanolnoj skupini te najveće u skupini koja je pila vodu. Unatoč vidljivosti trendova na grafovima, statistička značajnost razlika ustanovljena je samo pri usporedbi prosječnih vrijednosti vinske skupine i skupine koja je pila vodu u periinfarktnoj zoni (Slika 16).



Slika 16: Usporedba izražaja α -SMA biljega između eksperimentalnih skupina u tri zone od interesa. Vodoravne crte na vrhu dijagrama i tekst iznad njih ukazuju na značajnost t-test za nezavisne uzorke. $p < 0,001$, ** $p < 0,001$ i $p < 0,01$, \geq^* $p < 0,01$ i $p < 0,05$, n.s. $p \geq 0,05$.

5. RASPRAVA

Utjecaj konzumacije vina duže vrijeme privlači pažnju istraživača zbog svojih potencijalnih kardioprotektivnih učinaka, posebno u kontekstu IM-a. Istraživanja u podlozi ove doktorskog rada pružaju uvid u učinak konzumacije bijelog vina na preživljenje i cijeljenje nakon kirurški inducirano IM-a kod štakora.

5.1. Stope preživljenja

Usporedbom stopa preživljenja štakora nakon kirurški izazvanog IM-a između tri eksperimentalne skupine, utvrđeno je da su oni koji su konzumirali bijelo vino tijekom četiri tjedna prije postupka imali znatno bolje stope preživljenja u usporedbi s kontrolnim životinjama koje su pile samo vodu (Slika 8). Važno je napomenuti da iako je etanolna skupina pokazala nešto veću stopu preživljenja, razlika vrijednosti između etanolne i skupine koja je pila vodu nije bila statistički značajna, što sugerira da se zaštitni učinci bijelog vina ne mogu pripisati samo njegovom sadržaju etanola.

Bitno je naglasiti da se unos etanola mogao svrstati u režim umjerenog pijenja i u etanolnoj i u vinskoj skupini [169,170]. Unatoč tome, detaljnija analiza smrtnosti s obzirom na količinu unesenog etanola pokazala je da u etanolnoj skupini postoji gornja granica unosa etanola nakon koje sve životinje uginu, dok isti učinak nije bio uočeno u vinskoj skupini (Slika 9). Štoviše, u vinskoj skupini životinja, nijedna koja je prosječno pila više od otprilike 10 ml dnevno nije uginula. Ove razlike upućuju na postojanje hormetskog odgovora na etanol u kojem male doze tvari ostvaruju suprotan učinak od veće količine iste tvari [171,172].

Promatranjem stopa smrtnosti s obzirom na prosječnu dnevnu konzumaciju vodene otopine etanola te usporedbom sa stopom smrtnosti kontrolne skupine koja je pila samo vodu, uočava se karakteristični J-oblik krivulje (Slika 10). S obzirom na nepostojanje gornje granice konzumacije u vinskoj skupini, već samo donje granice iznad koje su svi preživjeli, računanjem stopa preživljenja po ekvivalentnim podskupinama nije moguće dobiti cijelu J-krivulju, već samo njen početni dio.

Drugim riječima, iako bismo i za vino s obzirom na prijašnje studije očekivali postojanje J-krivulje [173,174] dobiveni rezultati ukazuju da se širina i strmost tih krivulja razlikuje u ovisnosti o vrsti alkoholnog pića kojim se unosi etanol. Izostanak donje granice kod etanolne skupine i gornje granice kod vinske skupine na izmjerenim vrijednostima unosa ukazuju na to da je etanolna J-krivulja u donosu na vinsku pomaknuta prema nižim razinama unosa etanola. Ovaj zaključak u skladu je sa studijama na ljudima koje su uspoređivale utjecaj etanola s obzirom na vrstu alkoholnog pića kojom se on unosio [136,139,149].

5.2. Imunofluorescencijska analiza rezova tkiva

U drugi dio istraživanja bile su uključene samo životinje koje su preživjele period od 96 sati nakon inducirano IM-a, dnevno prosječno unosile više od 8 ml alkoholnog pića i pokazivale znakove transmuralnog IM-a na presjecima tkiva nakon eksplantacije srca i bojanja po Malloryju. Period od 96 sati odabran je kako bi se analizirala proliferativna faza cijeljenja. Iako bi ovaj vremenski period kod ljudi odgovarao prijelazu s upalne na proliferativnu fazu, štakori nakon istog vremenskog odmaka već su na vrhuncu proliferativne faze cijeljenja [41]. Kako bi se omogućilo donošenje zaključaka o dinamici cijeljenja, imunofluorescencijskim bojanjem označivani su makrofazi i miofibroblasti.

5.2.1. Analiza infiltracije makrofaga

Za analizu makrofaga korišteni su CD163 i CD68 biljezi. Tradicionalna podjela makrofage dijeli na dvije glavne subpopulacije - M1 makrofage koji posreduju u oštećenju tkiva i pokreću upalne reakcije, te protuupalne M2 makrofage kao bitne čimbenike u razrješenju upale. Biljeg CD163 u literaturi se smatra specifičnim za M2 makrofage, a CD68 za procjenu ukupnog broja makrofaga oba tipa (panmakrofagni biljeg). Kolokalizacija oba markera na istoj mikroskopskoj slici omogućuje računanje omjera broja stanica pozitivnih na CD163 biljeg sa brojem stanica pozitivnih na CD68. Interpretacija ovog omjera bila bi udio protuupalnih makrofaga u ukupnoj populaciji makrofaga. Posljedično, ovaj omjer pozitivno je koreliran s omjerom protuupalnih i proupalnih makrofaga (M2/M1) te se u literaturi često koristi kako bi se donijeli zaključci o omjeru tih dvaju fenotipova [175,176].

Rezultati analize infiltracije makrofaga pokazali su slične ukupne gustoće makrofaga, ali uz značajne razlike u gustoćama M2 makrofaga (Slika 12, Slika 13). Slijedom toga, i CD163/CD68 omjer također je pokazivao značajne razlike među skupinama u svim analiziranim zonama, s najvećim vrijednostima u vinskoj skupini, zatim etanolnoj, te najmanjim vrijednostima u kontrolnoj skupini. Budući da se M2/M1 makrofagni omjer povezuje s dinamikom oporavka organa tokom upale ili cijeljenja [177,178], dobiveni rezultati ponovno upućuju na dodatne zaštitne utjecaje ostalih, nealkoholnih, sastojaka vina.

Osim usporedbe prosječnih vrijednosti CD163/CD68 omjera među skupinama, provedena je i analiza ovisnosti ovog omjera o količini unesenog alkoholnog pića kako bi se ustvrdile eventualne razlike u odgovoru na ekvivalentne količine etanola (Slika 14A). S obzirom na to da je etanolna otopina pripremljena na način da sadrži jednak postotak etanola kao i korišteno bijelo vino, iste prosječne vrijednosti popijenog alkoholnog pića odgovarale su istom prosječnom unosu etanola. I u etanolnoj i

u vinskoj skupini uočen je trend smanjenja vrijednosti omjera povećanjem unešene količine etanola. Drugim riječima, benefiti protuupalnog učinka alkoholnih pića smanjuje se povećanjem konzumirane količine. Unatoč tome, čak i životinje koje su imale najveći prosječan dnevni unos etanola u vinskoj skupini pokazivale su veće vrijednosti makrofagnog omjera od bilo koje životinje u etanolnoj skupini.

Prognostički značaj promatranog makrofagnog omjera vidljiv je i u sukladnosti dobivenih rezultata sa stopama preživljenja pojedinih skupina. Naime, ekstrapolacijom trenda promjene vrijednosti CD163/CD68 omjera i usporedbom s prosječnom vrijednošću omjera u kontrolnoj skupini koja je pila samo vodu, možemo odrediti količinu etanola koja anulira protektivne učinke za svaku skupinu. Ova kritična vrijednost postigla bi se na unosu od otprilike 12.5 ml (1.5 ml čistog etanola) za skupinu koja je konzumirala etanolnu otopinu te otprilike 19 ml (2.5 ml čistog etanola) za skupinu koja je pila vino. Uz pretpostavku da bi iste razine makrofagnog omjera trebale polučivati iste stope preživljenja, na tim razinama unosa očekivali bismo slične stope preživljenja kao i u kontrolnoj skupini (~ 50%). Usporedimo li ove vrijednosti s doznom ovisnošću statusa preživljenja u pojedinoj skupini, vidimo da je pretpostavka opravdana. U etanolnoj skupini na vrijednosti oko 12.5 ml otprilike pola životinja ugiba, dok u vinskoj skupini za iste unose sve preživljavaju. Štoviše, budući da nijedna životinja u vinskoj skupini nije dosegla prosječnu razinu unosa od 19 ml (maksimum je bio otprilike 17 ml), očekivali bismo znatno manju stopu smrtnosti od kontrolne skupine, što je u skladu s izostankom gornje granice unosa u vinskoj skupini za izmjerene vrijednosti konzumacije vina. Za razliku od podataka o preživljenju s obzirom na unos, ovi podatci omogućuju i donošenje zaključaka o relativnoj širini minimuma J-krivulja etanolne i vodene skupine. Konkretno, J-krivulja za vino trebala bi biti 19/12.5 ~ 1.5 puta šira, tj. pozitivni učinci vina trebali bi se očitovati i za 50% veće vrijednosti unosa etanola u odnosu na iste razine konzumacije kroz pića koja sadrže samo etanol.

Budući da su pri analizi tkiva korištene samo životinje koje su preživjele 96-satni period nakon indukcije IM-a, a u etanolnoj skupini je postojala gornja granica unosa za preživljenje, u vinskoj skupini postojalo je nekoliko životinja s unosima većim od maksimalnog unosa u etanolnoj skupini. Taj disbalans skupa s negativnim trendom za posljedicu bi imao umanjenje razlike u omjeru između etanolne i vinske skupine. Zato je model za izračun trenda iskorišten za procjenu marginalnih srednjih vrijednosti koje uzimaju u obzir učinak ove razlike u unosu etanola. Usporedbom tako dobivenih vrijednosti, razlike u vrijednostima omjera u tim dvjema skupinama postale su još izraženije, s visokom razinom statističke značajnosti u svim analiziranim zonama.

5.2.2. Analiza aktivnosti miofibroblasta

Osim analize gustoće naseljenosti i vrste makrofaga, provedeno je i bojanje rezova tkiva α -SMA biljegom kako bi se ustanovila i usporedila aktivnost miofibroblasta između eksperimentalnih skupina. U svim zonama i na mikroskopskim slikama (Slika 15) i nakon analize (Slika 16) bio je uočljiv trend porasta izraženosti biljega počevši od vinske, preko etanolne, do kontrolne skupine koja je pila samo vodu. Unatoč tome, razlika je bila statistički značajna samo između vinske i kontrolne skupine u periinfarktnoj zoni (Slika 16). Za razliku od infarciranog tkiva, u zdravom miokardu bio je prisutan samo u stijenkama krvnih žila, što je utvrđeno pregledom neinfarciranog područja miokarda (interventikularni septum).

Stvaranje granulacijskog tkiva, u kojem su prisutni u velikom broju reparativni makrofazi i fibroblasti (koji se transdiferenciraju u miofibroblaste), nužan je preduvjet za stvaranje zrelog ožiljka tijekom faze maturacije u okviru cijeljenja nakon IM. Budući da se time osigurava strukturalna stabilnost srca, vrlo je bitno da se taj proces odvija u prikladnoj mjeri. Miofibroblasti su nužni za brzo i robusno formiranje ožiljka te zajedno s reparativnim makrofazima utječu na proizvodnju protupalnih, proangiogenih i profibrotičkih medijatora čime utišavaju upalu. Pored ove funkcije vrlo su bitni u okviru remodeliranja srca nakon različitih patoloških stanja kao što su hipertenzija i IM, a posebno u zatajenju srca. Prilikom saniranja ishemijske ozljede dolazi do pojačanog odlaganja proteina izvanstanične tvari unutar ozljeđenog tkiva, a funkcionalnost miofibroblasta očituje se i u izražavanju kontraktilnih proteina (među njima i α -SMA kojeg smo u ovom radu koristili za detekciju miofibroblasta). Zbog toga miofibroblasti imaju sposobnost kontrakcije poput mišićnih stanica, a to im omogućava da smanje veličinu ožiljka i spriječe rupturu tkiva [165]. Miofibroblasti međusobno komuniciraju preko tijesnih spojeva (engl. gap junction) i omogućuju razmjenu električki nabijenih i nenabijenih tvari. S obzirom na to, da se zaključiti kako su miofibroblasti važni za prijenos mehaničke kontraktilne sile na srčani ožiljak preko kontakta fibroneksusa s izvanstaničnom tvari. Time je omogućeno „sidrenje“ ožiljka i smanjenje ožiljka kontrakcijom, a također na taj način miofibroblasti utječu na remodeliranje klijetke [41,45,131,166]. Već krajem proliferativne faze, njihov bi se broj trebao smanjivati jer ukoliko zaostaju duže u ozljeđenom tkivu mogu dovesti do pretjeranog fibroziranja tkiva i uzrokovati nepovoljno remodeliranje srca, naročito ako su aktivni miofibroblasti u zdravom miokardu čime nastaje reaktivna fibroza [5,6,25–28,167]. Taj proces dovodi do povećanja krutosti srčanog tkiva i pogoršava srčanu funkciju i u konačnici vodi razvoju srčanog zatajenja. Pretjerano odlaganje kolagena i gubitak kardiomiocita uzrokovat će i probleme s provodljivošću električnog signala [25] i time mogu povećati šansu za nastanak raznih aritmija. Čak i izravno spajanje kardiomiocita na miofibroblaste može pridonijeti aritmogenezi [179]. Uzimajući u obzir da

su razvoj aritmija i srčanog zatajenja jedne od najčešćih komplikacija nakon preboljelog IM te potencijalan uzrok mortaliteta, naslućuje se važnost ostvarivanja ravnoteže u razini stvaranja ožiljkastog tkiva kako bi ishod za pacijenta bio optimalan. Tijekom sazrijevanja granulacijskog tkiva dolazi do smanjenja broja miofibroblasta, pa time i snižene razine α -SMA, što uključuje neke apoptotske putove. Time se u konačnici stvara hipocelularni, a zatim acelularni zreli ožiljak. Miofibroblastni izražaj α -SMA može donekle procjenjivati i prikazivati dinamiku cijeljenja IM-a.

Uzimajući u obzir činjenicu da je u vinskoj skupini α -SMA bio manje izražen, možemo pretpostaviti nekoliko stvari. Prvo, da vino djelomično potiskuje transdiferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste i time optimizira razinu fibroziranja tkiva te djeluje na očuvanje kontraktilne sposobnosti srca. Druga pretpostavka može biti da su upalna i proliferativna faza ranije završile u vinskoj skupini te da dolazi do smanjenja broja miofibroblasta apoptozom, što u konačnici dovodi do bržeg cijeljenja nakon preboljelog IM-a. U prilog tome govori i drugi nalaz ovog istraživanja, a to je povećan CD163/CD68 makrofagni omjer, čime se može zaključiti da se polarizacija u vinskoj skupini odvija prema M2 fenotipu makrofaga. Interferiranje s miofibroblastnom transformacijom (kao terapijskom opcijom za liječenje IM-a) može rezultirati proširenjem infarciranog područja, stanjenjem stijenke klijetke, proširenjem klijetke te sistoličkom disfunkcijom i povećavanjem šanse od nastanka rupture srca.

5.3. Utjecaj nealkoholnih komponenti vina

Fenolni spojevi smatraju se ključnim nealkoholnim bioaktivnim sastojcima vina. Zbog specifičnog postupka proizvodnje bijelog vina, pri kojem sok fermentira bez dodira s kožicom i sjemenkama grožđa, ukupna količina fenola u bijelim vinima znatno je manja u usporedbi s crnima [154,180]. Međutim, i bijelo vino sadrži raznolike fenolne spojeve, a neki su prisutni u značajnim količinama. Među njima su fenolne kiseline, čiji je najpoznatiji predstavnik kafeinska kiselina [180]. Osim toga, bijelo vino sadrži i tirozol, koji se u mnogim bijelim vinima ističe kao drugi najzastupljeniji monofenol koji ne pripada skupini hidroksicinamata [181], i nastaje tijekom fermentacije kao produkt metabolizma aminokiseline tirozina od strane kvasca [182].

Zanimljivo je da etanol može potaknuti stvaranje tirozola unutar ljudskog organizma i povećati njegovu apsorpciju iz prehrambenih izvora [183]. Brojna istraživanja sugeriraju da antioksidativna i protuupalna svojstva tirozola i kafeinske kiseline mogu značajno pridonijeti povoljnim učincima umjerene konzumacije bijelog vina na zdravlje [181,184]. Pokazano je da kafeinska kiselina i njezini derivati pozitivno djeluju na kardiovaskularni sustav, posebice kod ozljeda izazvanih ishemijskom i reperfuzijom, smanjujući staničnu disfunkciju uzrokovanu različitim štetnim čimbenicima [184,185]. Tirozol je također prepoznat kao kardioprotektivni spoj jer može smanjiti veličinu IM-a i poboljšati

funkciju lijeve klijetke [186]. Nadalje, istraživanja provedena na štakorima koji su tijekom 30 dana konzumirali bijelo vino bogato kafeinskom kiselinom, tirozolum i šikiminskom kiselinom pokazala su njegove zaštitne učinke kod ozljeda izazvanih ishemijom i reperfuzijom [187]. Rezultati ove i ranijih studija koje su ispitivale utjecaj bijelog vina na preživljenje nakon IM-a [188] u skladu su s dosadašnjim saznanjima o kardiovaskularnim koristima bijelog vina i njegovih komponenti.

5.4. Mehanizmi djelovanja sastojaka bijelog vina

5.4.1. Preživljenje

Izraz „hibernirajući miokard“ odnosi se kronične promjene u kontraktilnosti miokarda uzrokovane dugotrajnom ishemijom dijela srčanog tkiva zbog nedovoljne opskrbe krvlju koronarnim arterijama. Kardiomiociti u ovom stanju ostaju i dalje živi, ali su disfunkcionalni jer primaju minimalnu količinu krvi, stoga ATP troše za osnovne stanične funkcije. Uspostavom protoka krvi, reperfuzijom ili angiogenezom, hibernirajući miokard postupno vraća kontraktilnu sposobnost i polako se oporavlja. Epikatehin [189], flavonoid prisutan u bijelom vinu, može djelovati kardioprotektivno zahvaljujući svojoj sposobnosti induciranja hibernirajućeg stanja miokarda. Djelovanjem na proteine odgovorne za apoptozu, rast i citoprotekciju omogućuje djelomično irigiranim kardiomiocitima da prežive tijekom ishemije [190]. Može se pretpostaviti da bi u slučaju ishemije njegov učinak bio usmjeren na kardiomiocite u rubnom području IM-a, gdje bi se ozljeda mogla dodatno širiti. Očuvanjem većeg broja viabilnih kardiomiocita tijekom ishemije smanjio bi se ukupan broj odumrlih stanica, ublažila upalna reakcija i u konačnici bi se mogla poboljšati stopa preživljenja.

5.4.2. Polarizacija makrofaga

Iako ovaj rad ne istražuje detaljne mehanizme djelovanja sastojaka bijelog vina na polarizaciju makrofaga u tkivu srca nakon IM-a, postoje snažni dokazi da antioksidativna i protuupalna svojstva prehrambenih fenolnih spojeva, uključujući one prisutne u vinu, mogu u uvjetima jake upale stvoriti okruženje pogodno za polarizaciju makrofaga u reparativni M2 fenotip. Polarizacija makrofaga složen je i precizno reguliran proces u kojem sudjeluju različite transkripcijske, epigenetske i posttranskripcijske regulatorne mreže, kao i brojne signalne putanje, među kojima su ključne one povezane s nuklearnim čimbenikom (eritroidno deriviran 2)-sličnim 2 (Nrf2) i nuklearnim čimbenikom- κ B (NF- κ B). Ova dva transkripcijska čimbenika imaju ključnu ulogu u regulaciji odgovora stanica na oksidacijski stres i upalu [191–193]. Brojna istraživanja potvrđuju da fenolni spojevi iz vina ostvaruju svoje antioksidativne i protuupalne učinke putem interakcije s Nrf2 i NF-

κ B signalnim putevima [194–197], što ukazuje na njihovu povezanost s dinamikom makrofagne polarizacije. Nadalje, pokazano je da polifenoli prisutni u vinu mogu inhibirati pojedine članove iz skupine TRP kanala i s njima povezani signalni put P2X7/NLRP3 [198]. Poznato je, naime, da TRP kanali imaju važnu ulogu u modulaciji aktivacije i funkcije makrofaga, uključujući i njihovu polarizaciju [199].

5.4.2. Fibroziranje

Više studija utvrdilo je djelovanje samog alkohola ili vina na stvaranje ožiljka nakon IM-a. Dio studija koje su koristile bijelo vino ili komponente bijelog vina došle su do zaključka kako se apoptoza kardiomiocita, a time i veličine IM-a smanjuje Akt/FOXO3a/SIRT1 signalnim putem, što posljedično dovodi do smanjenja fibroze i očuvanja srčane funkcije [187,200]. Druge studije uzimaju u obzir djelovanje drugih komponenti, poput EGCG (epigalokatehin galata) koji također utječe na smanjenu fibrozu u procesu cijeljenja ozljeđenog tkiva [201]. U studiji koja se također bavila utjecajem EGCG na cijeljenje, utvrđeno je da EGCG inhibira CTGF (connective tissue growth factor) čime se smanjuje odlaganje kolagena i posljedična fibroza, a kroz inhibiciju p65 pojedinih NF- κ B onemogućeno je nakupljanje proupalnih čimbenika i pretjerani izražaj CTGF-a [202]. Bitno je naglasiti kako do suprotnog učinka dolazi kod konzumacije veće količine EGCG čime se aktiviraju profibrotički signalni putevi [203]. Taj zaključak je u skladu s činjenicom da se i pretjeranom konzumacijom vina i alkohola gube protektivni učinci, stoga kao i alkoholna pića i ovu komponentu vina bi trebalo konzumirati u umjerenj količini kako bi se ostvarilo protektivno djelovanje. Resveratrol, iako u manjoj mjeri prisutan u bijelom vinu također može utjecati na smanjenje fibroze djelovanjem na TGF- β signalni put [204].

6. ZAKLJUČCI

Glavni zaključak ovog istraživanja je da umjerena konzumacija bijelog vina pruža zaštitni učinak u kontekstu teških patofizioloških izazova, poput kirurški induciranog IM-a na modelu štakora. Učinak je potvrđen usporedbom stopa preživljenja, gdje su štakori koji su pili vino imali značajno višu stopu preživljenja (72,2%) u odnosu na grupu koja je pila vodu (47,8%). Osim toga, bijelo vino se čini sigurnijim i učinkovitijim od usporedive količine etanola u vodenoj otopini (64,7%), što sugerira da etanol nije glavna komponenta odgovorna za poboljšano preživljenje nakon IM-a, već da su to druge nealkoholne komponente vina, poput polifenola. U slučaju Graševine, to su vjerojatno epikatehin, katehin, kafeična kiselina, tirozol, resveratrol i galična kiselina, ali s obzirom da nismo istraživali pojedine komponente vina, o tome možemo samo spekulirati.

Tijekom istraživanja zabilježena je gornja granica zaštitnog učinka vodene otopine etanola (otprilike 12,5 ml/dan), pri kojoj se učinak izjednačava s kontrolnom grupom i nakon koje nijedna životinja nije preživjela 96 sati nakon IM-a. Suprotno tome, za vino takva granica nije utvrđena, što jasno prikazuje uski kardioprotektivni interval etanola. Kako bismo dodatno istražili procese povezane s promatranim zaštitnim učincima konzumacije bijelog vina, provedena su daljnja istraživanja o parametrima cijeljenja nakon IM.

Naši rezultati ukazuju na to da nealkoholni sastojci bijelog vina značajno doprinose njegovim superiornim učincima u povoljnoj modulaciji postinfarktne upale i reparativne faze cijeljenja u odnosu na sam etanol. Uočena je smanjena infiltracija proupalnih M1 makrofaga naspram M2 makrofaga kod životinja koje su konzumirale bijelo vino u usporedbi s onima koje su pile vodenu otopinu etanola i kontrolnim životinjama. Ovaj nalaz sugerira povoljniji tijek upalne i reparativne faze cijeljenja kod štakora koji su prekondicionirani bijelim vinom prije IM-a.

Smanjeni izražaj α -SMA nakon konzumacije bijelog vina ukazuje na dodatno djelovanje vina u smanjenju fibroziranja infarciranog tkiva te time potencijalnog smanjenja rizika od lošeg remodeliranja klijetke koje bi moglo dovesti do srčanog zatajenja ili razvoja različitih vrsta aritmija. Čini se da omjeri CD163/CD68, kao pokazatelj polarizacije makrofaga, mogu biti koristan prediktor oporavka i preživljenja nakon IM-a, barem pod kontroliranim eksperimentalnim uvjetima.

Rastuća popularnost bijelog vina u različitim prehrambenim kulturama i perspektive povećane globalne potražnje opravdavaju potrebu za daljnjim istraživanjima o biološkim učincima bijelog vina. Ovo istraživanje može produbiti znanje o kardioprotektivnom djelovanju vina unutar proliferativne faze cijeljenja, ali i na preživljenje koje je već široko istraženo i potvrđeno na brojnim epidemiološkim studijama.

7. OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA

1. Životna dob: Podvezivanje LAD-a vršilo se eksperimentalnim životinjama koje su mlade i zdrave, što nije tipična dob za obolijevanje od IM-a u općoj populaciji, s obzirom da se ta bolest češće javlja kod starijih osoba.
2. Komorbiditeti: U općoj populaciji prisutni su mnogi komorbiditeti, poput ateroskleroze, visokog krvnog tlaka, povećanih masoća u krvi i šećerne bolesti, koje nismo mogli replicirati u našem istraživanju. Ovi čimbenici mogli su utjecati na ishod istraživanja.
3. Polipragmazija: Starijim osobama često je pripisan velik broj lijekova zbog prisutnosti komorbiditeta, dok su eksperimentalne životinje genetski usklađene i zdrave te ne uzimaju nikakvu terapiju.
4. Spol: Sve životinje uključene u ovo istraživanje su muškog spola kako bi se osigurala homogenost skupina. U istraživanjima koja slijede trebalo bi ponoviti pokus i na životinjama ženskog spola kako bi zaključci bili potpuniji i kako bi se lakše translaterali na opću populaciju.
5. Mehanizam nastanka IM-a: IM kod ljudi najčešće nastaje kao posljedica postojanja aterosklerotskog plaka koji može potpuno začepiti koronarnu arteriju ili može puknuti fibrozna kapa plaka, što potiče razvoj tromba unutar arterije. U ovom eksperimentalnom modelu ishemijskog srčanog tkiva je ostvarena vanjskim podvezivanjem LAD-a, ali i pridružene vene (što nije slučaj u IM kod ljudi), a IM je nastao akutno.
6. Fiziologija srca: Novonastali poremećaji srčanog ritma (ventrikularne aritmije) nakon IM-a kod ljudi su najčešći uzrok morbiditeta i mortaliteta, dok je kod štakora najčešći uzrok smrti puknuće stijenke klijetke zbog opsežne nekroze i upalne reakcije.
7. Veličina IM-a: S obzirom na to da smo veličinu IM-a mjerili na rezovima srca, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je to objektivna metoda, iako nisu zabilježene statistički značajne razlike među grupama.
8. Polifenolna grupa: U istraživanje nije uključena ni planirana grupa koja bi konzumirala dealkoholizirano vino kako bi se odredili kardioprotektivni učinci polifenola ili utvrdio potencijalni sinergistički učinak zajedno s alkoholom u formi vina. Bilo bi poželjno provesti i takvu vrstu istraživanja.
9. Biljezi fenotipova makrofaga: Nisu korišteni specifični biljezi za M1 fenotip niti biljezi za razlikovanje podskupina M2 fenotipa (M2a, M2b, M2c i M2d). U budućim istraživanjima

moglo bi se razmotriti ispitivanje podskupina makrofaga kako bi se dodatno poboljšalo razumijevanje procesa ozdravljenja.

10. Diferencijacija makrofaga: Ovo istraživanje fokusira se samo na jedan fenomen proliferativne faze oporavka nakon IM-a, s ograničenom mogućnošću povezivanja s drugim procesima i mehanizmima koji se istovremeno odvijaju.
11. Mehanizmi djelovanja vina: Konačno, mogući mehanizmi koji povezuju konzumaciju bijelog vina i polarizaciju makrofaga mogli su se razmatrati samo na spekulativnoj razini.

8. LITERATURA

1. WHO Cardiovascular Diseases Data Available online: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 (accessed on 14 January 2025).
2. Kotseva, K.; De Backer, G.; De Bacquer, D.; Rydén, L.; Hoes, A.; Grobbee, D.; Maggioni, A.; Marques-Vidal, P.; Jennings, C.; Abreu, A.; et al. Lifestyle and Impact on Cardiovascular Risk Factor Control in Coronary Patients across 27 Countries: Results from the European Society of Cardiology ESC-EORP EUROASPIRE V Registry. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2019**, *26*, 824–835, doi:10.1177/2047487318825350.
3. Slavin, S.D.; Khera, R.; Zafar, S.Y.; Nasir, K.; Warraich, H.J. Financial Burden, Distress, and Toxicity in Cardiovascular Disease. *Am. Heart J.* **2021**, *238*, 75–84.
4. Lewis, E.F.; Moye, L.A.; Rouleau, J.L.; Sacks, F.M.; Arnold, J.M.O.; Warnica, J.W.; Flaker, G.C.; Braunwald, E.; Pfeffer, M.A. Predictors of Late Development of Heart Failure in Stable Survivors of Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2003**, *42*, 1446–1453, doi:10.1016/S0735-1097(03)01057-X.
5. PRABHU, S. Post-Infarction Ventricular Remodeling: An Array of Molecular Events. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**, *38*, 547–550, doi:10.1016/j.yjmcc.2005.01.014.
6. Sutton, M.G.S.J.; Sharpe, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation* **2000**, *101*, 2981–2988, doi:10.1161/01.CIR.101.25.2981.
7. FRANGOIANNIS, N. The Immune System and Cardiac Repair. *Pharmacol. Res.* **2008**, *58*, 88–111, doi:10.1016/j.phrs.2008.06.007.
8. Moras, E.; Yakkali, S.; Gandhi, K.D.; Virk, H.U.H.; Alam, M.; Zaid, S.; Barman, N.; Jneid, H.; Vallabhajosyula, S.; Sharma, S.K.; et al. Complications in Acute Myocardial Infarction: Navigating Challenges in Diagnosis and Management. *Hearts* **2024**, *5*, 122–141, doi:10.3390/hearts5010009.
9. Hanssen, T.A.; Nordrehaug, J.E.; Eide, G.E.; Bjelland, I.; Rokne, B. Anxiety and Depression after Acute Myocardial Infarction: An 18-Month Follow-up Study with Repeated Measures and Comparison with a Reference Population. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2009**, *16*, 651–659, doi:10.1097/HJR.0b013e32832e4206.
10. Mechanic, O.J.; Gavin, M.; Grossman, S.A. *Acute Myocardial Infarction*; 2025;
11. Kusama, I.; Hibi, K.; Kosuge, M.; Nozawa, N.; Ozaki, H.; Yano, H.; Sumita, S.; Tsukahara, K.; Okuda, J.; Ebina, T.; et al. Impact of Plaque Rupture on Infarct Size in ST-Segment Elevation Anterior Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *50*, 1230–1237, doi:10.1016/j.jacc.2007.07.004.
12. Di Cesare, M.; Perel, P.; Taylor, S.; Kabudula, C.; Bixby, H.; Gaziano, T.A.; McGhie, D.V.; Mwangi, J.; Pervan, B.; Narula, J.; et al. The Heart of the World. *Glob. Heart* **2024**, *19*, doi:10.5334/gh.1288.
13. Vaduganathan, M.; Mensah, G.A.; Turco, J.V.; Fuster, V.; Roth, G.A. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2022**, *80*, 2361–2371, doi:10.1016/j.jacc.2022.11.005.
14. Shield, K.; Manthey, J.; Rylett, M.; Probst, C.; Wettlaufer, A.; Parry, C.D.H.; Rehm, J. National, Regional, and Global Burdens of Disease from 2000 to 2016 Attributable to Alcohol Use: A Comparative Risk Assessment Study. *Lancet Public Heal.* **2020**, *5*, e51–e61, doi:10.1016/S2468-2667(19)30231-2.
15. Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; Chaitman, B.R.; Bax, J.J.; Morrow, D.A.; White, H.D. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *72*, 2231–2264, doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1038.

16. Jennings, R.B.; Murry, C.E.; Steenbergen, C.; Reimer, K.A. Development of Cell Injury in Sustained Acute Ischemia. *Circulation* **1990**, *82*, II2-12.
17. Frangogiannis, N.G. Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. *Circ. Res.* **2012**, *110*, 159–173, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243162.
18. Anderson, J.L. ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients with Unstable Angina/Non–ST-Segment Elevation Myocardial Infarction—A Summary Article. In *Acute Coronary Syndromes: A Companion to Braunwald's Heart Disease*; Elsevier, 2011; pp. 385–404.
19. Yan, X.; Anzai, A.; Katsumata, Y.; Matsuhashi, T.; Ito, K.; Endo, J.; Yamamoto, T.; Takeshima, A.; Shinmura, K.; Shen, W.; et al. Temporal Dynamics of Cardiac Immune Cell Accumulation Following Acute Myocardial Infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2013**, *62*, 24–35, doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.023.
20. Watanabe, T.; Hatayama, N.; Guo, M.; Yuhara, S.; Shinoka, T. Bridging the Gap: Advances and Challenges in Heart Regeneration from In Vitro to In Vivo Applications. *Bioengineering* **2024**, *11*, 954, doi:10.3390/bioengineering11100954.
21. Jackson, K.A.; Majka, S.M.; Wang, H.; Pocius, J.; Hartley, C.J.; Majesky, M.W.; Entman, M.L.; Michael, L.H.; Hirschi, K.K.; Goodell, M.A. Regeneration of Ischemic Cardiac Muscle and Vascular Endothelium by Adult Stem Cells. *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 1395–1402, doi:10.1172/JCI12150.
22. Kim, Y.; Nurakhayev, S.; Nurkesh, A.; Zharkinbekov, Z.; Saparov, A. Macrophage Polarization in Cardiac Tissue Repair Following Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2715, doi:10.3390/ijms22052715.
23. Ter Horst, E.; Hakimzadeh, N.; Van der Laan, A.; Krijnen, P.; Niessen, H.; Piek, J. Modulators of Macrophage Polarization Influence Healing of the Infarcted Myocardium. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29583–29591, doi:10.3390/ijms161226187.
24. Hochman, J.S.; Bulkley, B.H. Expansion of Acute Myocardial Infarction: An Experimental Study. *Circulation* **1982**, *65*, 1446–1450, doi:10.1161/01.CIR.65.7.1446.
25. Pfeffer, M.A.; Braunwald, E. Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. Experimental Observations and Clinical Implications. *Circulation* **1990**, *81*, 1161–1172, doi:10.1161/01.CIR.81.4.1161.
26. Cohn, J.N.; Ferrari, R.; Sharpe, N. Cardiac Remodeling—Concepts and Clinical Implications: A Consensus Paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2000**, *35*, 569–582, doi:10.1016/S0735-1097(99)00630-0.
27. Heusch, G.; Libby, P.; Gersh, B.; Yellon, D.; Böhm, M.; Lopaschuk, G.; Opie, L. Cardiovascular Remodelling in Coronary Artery Disease and Heart Failure. *Lancet* **2014**, *383*, 1933–1943, doi:10.1016/S0140-6736(14)60107-0.
28. St John Sutton, M.; Lee, D.; Rouleau, J.L.; Goldman, S.; Plappert, T.; Braunwald, E.; Pfeffer, M.A. Left Ventricular Remodeling and Ventricular Arrhythmias After Myocardial Infarction. *Circulation* **2003**, *107*, 2577–2582, doi:10.1161/01.CIR.0000070420.51787.A8.
29. *Waldeyer - Anatomie Des Menschen*; Waldeyer, A.J., Fanghänel, J., Pera, F., Anderhuber, F., Nitsch, R., Eds.; Walter de Gruyter, 2002; ISBN 978-3-11-016561-6.
30. Zurbier, C.J.; Bertrand, L.; Beauloye, C.R.; Andreadou, I.; Ruiz-Meana, M.; Jespersen, N.R.; Kula-Alwar, D.; Prag, H.A.; Eric Botker, H.; Dambrova, M.; et al. Cardiac Metabolism as a Driver and Therapeutic Target of Myocardial Infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 5937–5954, doi:10.1111/jcmm.15180.
31. Morciano, G.; Giorgi, C.; Bonora, M.; Punzetti, S.; Pavasini, R.; Wieckowski, M.R.; Campo, G.; Pinton, P. Molecular Identity

- of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Its Role in Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, 78, 142–153, doi:10.1016/j.yjmcc.2014.08.015.
32. Agyapong, E.D.; Pedriali, G.; Ramaccini, D.; Bouhamida, E.; Tremoli, E.; Giorgi, C.; Pinton, P.; Morciano, G. Calcium Signaling from Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria Contact Sites in Acute Myocardial Infarction. *J. Transl. Med.* **2024**, 22, 552, doi:10.1186/s12967-024-05240-5.
 33. Fu, Z.; Jiao, Y.; Wang, J.; Zhang, Y.; Shen, M.; Reiter, R.J.; Xi, Q.; Chen, Y. Cardioprotective Role of Melatonin in Acute Myocardial Infarction. *Front. Physiol.* **2020**, 11, doi:10.3389/fphys.2020.00366.
 34. Heusch, G.; Gersh, B.J. The Pathophysiology of Acute Myocardial Infarction and Strategies of Protection beyond Reperfusion: A Continual Challenge. *Eur. Heart J.* **2016**, ehw224, doi:10.1093/eurheartj/ehw224.
 35. Curley, D.; Lavin Plaza, B.; Shah, A.M.; Botnar, R.M. Molecular Imaging of Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. *Basic Res. Cardiol.* **2018**, 113, 10, doi:10.1007/s00395-018-0668-z.
 36. Giordano, F.J. Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia, and Heart Failure. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 500–508, doi:10.1172/JCI24408.
 37. Davies, K.J.A. Oxidative Stress: The Paradox of Aerobic Life. *Biochem. Soc. Symp.* **1995**, 61, 1–31, doi:10.1042/bss0610001.
 38. Weyrich, A.S.; Ma, X.Y.; Lefer, D.J.; Albertine, K.H.; Lefer, A.M. In Vivo Neutralization of P-Selectin Protects Feline Heart and Endothelium in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *J. Clin. Invest.* **1993**, 91, 2620–2629, doi:10.1172/JCI116501.
 39. Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, 13, 159–175, doi:10.1038/nri3399.
 40. Eltzschig, H.K.; Eckle, T. Ischemia and Reperfusion—from Mechanism to Translation. *Nat. Med.* **2011**, 17, 1391–1401, doi:10.1038/nm.2507.
 41. Dobaczewski, M.; Gonzalez-Quesada, C.; Frangogiannis, N.G. The Extracellular Matrix as a Modulator of the Inflammatory and Reparative Response Following Myocardial Infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, 48, 504–511, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.07.015.
 42. Prabhu, S.D.; Frangogiannis, N.G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **2016**, 119, 91–112, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
 43. van der Laan, A.M.; Nahrendorf, M.; Piek, J.J. Healing and Adverse Remodelling after Acute Myocardial Infarction: Role of the Cellular Immune Response. *Heart* **2012**, 98, 1384–1390, doi:10.1136/heartjnl-2012-301623.
 44. de Haan, J.J.; Smeets, M.B.; Pasterkamp, G.; Arslan, F. Danger Signals in the Initiation of the Inflammatory Response after Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm.* **2013**, 2013, 1–13, doi:10.1155/2013/206039.
 45. Frangogiannis, N.G. The Extracellular Matrix in Myocardial Injury, Repair, and Remodeling. *J. Clin. Invest.* **2017**, 127, 1600–1612, doi:10.1172/JCI87491.
 46. Satoh, M.; Shimoda, Y.; Maesawa, C.; Akatsu, T.; Ishikawa, Y.; Minami, Y.; Hiramori, K.; Nakamura, M. Activated Toll-like Receptor 4 in Monocytes Is Associated with Heart Failure after Acute Myocardial Infarction. *Int. J. Cardiol.* **2006**, 109, 226–234, doi:10.1016/j.ijcard.2005.06.023.

47. Kawaguchi, M.; Takahashi, M.; Hata, T.; Kashima, Y.; Usui, F.; Morimoto, H.; Izawa, A.; Takahashi, Y.; Masumoto, J.; Koyama, J.; et al. Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* **2011**, *123*, 594–604, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982777.
48. Schroder, K.; Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* **2010**, *140*, 821–832, doi:10.1016/j.cell.2010.01.040.
49. Asgari, E.; Le Friec, G.; Yamamoto, H.; Perucha, E.; Sacks, S.S.; Köhl, J.; Cook, H.T.; Kemper, C. C3a Modulates IL-1 β Secretion in Human Monocytes by Regulating ATP Efflux and Subsequent NLRP3 Inflammasome Activation. *Blood* **2013**, *122*, 3473–3481, doi:10.1182/blood-2013-05-502229.
50. Rossol, M.; Pierer, M.; Raulien, N.; Quandt, D.; Meusch, U.; Rothe, K.; Schubert, K.; Schöneberg, T.; Schaefer, M.; Krügel, U.; et al. Extracellular Ca²⁺ Is a Danger Signal Activating the NLRP3 Inflammasome through G Protein-Coupled Calcium Sensing Receptors. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1329, doi:10.1038/ncomms2339.
51. Pomerantz, B.J.; Reznikov, L.L.; Harken, A.H.; Dinarello, C.A. Inhibition of Caspase 1 Reduces Human Myocardial Ischemic Dysfunction via Inhibition of IL-18 and IL-1 β . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 2871–2876, doi:10.1073/pnas.041611398.
52. Bergsbaken, T.; Fink, S.L.; Cookson, B.T. Pyroptosis: Host Cell Death and Inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 99–109, doi:10.1038/nrmicro2070.
53. Case, C.L.; Shin, S.; Roy, C.R. Asc and Ipaf Inflammasomes Direct Distinct Pathways for Caspase-1 Activation in Response to Legionella Pneumophila. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 1981–1991, doi:10.1128/IAI.01382-08.
54. Fernández-Velasco, M.; Prieto, P.; Terrón, V.; Benito, G.; Flores, J.M.; Delgado, C.; Zaragoza, C.; Lavin, B.; Gómez-Parrizas, M.; López-Collazo, E.; et al. NOD1 Activation Induces Cardiac Dysfunction and Modulates Cardiac Fibrosis and Cardiomyocyte Apoptosis. *PLoS One* **2012**, *7*, e45260, doi:10.1371/journal.pone.0045260.
55. Sandanger, Ø.; Ranheim, T.; Vinge, L.E.; Bliksøen, M.; Alfsnes, K.; Finsen, A. V.; Dahl, C.P.; Askevold, E.T.; Florholmen, G.; Christensen, G.; et al. The NLRP3 Inflammasome Is Up-Regulated in Cardiac Fibroblasts and Mediates Myocardial Ischaemia–Reperfusion Injury. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *99*, 164–174, doi:10.1093/cvr/cvt091.
56. Volz, H.C.; Laohachewin, D.; Seidel, C.; Lasitschka, F.; Keilbach, K.; Wienbrandt, A.R.; Andrassy, J.; Bierhaus, A.; Kaya, Z.; Katus, H.A.; et al. S100A8/A9 Aggravates Post-Ischemic Heart Failure through Activation of RAGE-Dependent NF-KB Signaling. *Basic Res. Cardiol.* **2012**, *107*, 250, doi:10.1007/s00395-012-0250-z.
57. Lenardo, M.J.; Baltimore, D. NF-KB: A Pleiotropic Mediator of Inducible and Tissue-Specific Gene Control. *Cell* **1989**, *58*, 227–229, doi:10.1016/0092-8674(89)90833-7.
58. Park, M.; Hong, J. Roles of NF-KB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells* **2016**, *5*, 15, doi:10.3390/cells5020015.
59. Lindsey, M.L.; Zamilpa, R. Temporal and Spatial Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Following Myocardial Infarction. *Cardiovasc. Ther.* **2012**, *30*, 31–41, doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00207.x.
60. Proudfoot, A.E.I.; Handel, T.M.; Johnson, Z.; Lau, E.K.; LiWang, P.; Clark-Lewis, I.; Borlat, F.; Wells, T.N.C.; Kosco-Vilbois, M.H. Glycosaminoglycan Binding and Oligomerization Are Essential for the in Vivo Activity of Certain Chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 1885–1890, doi:10.1073/pnas.0334864100.
61. Murakami, M.; Kamimura, D.; Hirano, T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines.

62. Nah, D.-Y.; Rhee, M.-Y. The Inflammatory Response and Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Korean Circ. J.* **2009**, *39*, 393, doi:10.4070/kcj.2009.39.10.393.
63. Bujak, M.; Dobaczewski, M.; Chatila, K.; Mendoza, L.H.; Li, N.; Reddy, A.; Frangogiannis, N.G. Interleukin-1 Receptor Type I Signaling Critically Regulates Infarct Healing and Cardiac Remodeling. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173*, 57–67, doi:10.2353/ajpath.2008.070974.
64. Kurrelmeyer, K.M.; Michael, L.H.; Baumgarten, G.; Taffet, G.E.; Peschon, J.J.; Sivasubramanian, N.; Entman, M.L.; Mann, D.L. Endogenous Tumor Necrosis Factor Protects the Adult Cardiac Myocyte against Ischemic-Induced Apoptosis in a Murine Model of Acute Myocardial Infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 5456–5461, doi:10.1073/pnas.070036297.
65. Zlotnik, A.; Yoshie, O. Chemokines. *Immunity* **2000**, *12*, 121–127, doi:10.1016/S1074-7613(00)80165-X.
66. Dobaczewski, M.; Bujak, M.; Zymek, P.; Ren, G.; Entman, M.L.; Frangogiannis, N.G. Extracellular Matrix Remodeling in Canine and Mouse Myocardial Infarcts. *Cell Tissue Res.* **2006**, *324*, 475–488, doi:10.1007/s00441-005-0144-6.
67. Frangogiannis, N.G.; Ren, G.; Dewald, O.; Zymek, P.; Haudek, S.; Koerting, A.; Winkelmann, K.; Michael, L.H.; Lawler, J.; Entman, M.L. Critical Role of Endogenous Thrombospondin-1 in Preventing Expansion of Healing Myocardial Infarcts. *Circulation* **2005**, *111*, 2935–2942, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510354.
68. Pinckard, R.N.; Olson, M.S.; Giclas, P.C.; Terry, R.; Boyer, J.T.; O'Rourke, R.A. Consumption of Classical Complement Components by Heart Subcellular Membranes in Vitro and in Patients after Acute Myocardial Infarction. *J. Clin. Invest.* **1975**, *56*, 740–750, doi:10.1172/JCI108145.
69. Nesargikar, P.; Spiller, B.; Chavez, R. The Complement System: History, Pathways, Cascade and Inhibitors. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **2012**, *2*, 103–111, doi:10.1556/EuJMI.2.2012.2.2.
70. Pinto, A.R.; Ilinykh, A.; Ivey, M.J.; Kuwabara, J.T.; D'Antoni, M.L.; Debuque, R.; Chandran, A.; Wang, L.; Arora, K.; Rosenthal, N.A.; et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 400–409, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778.
71. Wang, S.; Voisin, M.-B.; Larbi, K.Y.; Dangerfield, J.; Scheiermann, C.; Tran, M.; Maxwell, P.H.; Sorokin, L.; Nourshargh, S. Venular Basement Membranes Contain Specific Matrix Protein Low Expression Regions That Act as Exit Points for Emigrating Neutrophils. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 1519–1532, doi:10.1084/jem.20051210.
72. Cua, D.J.; Tato, C.M. Innate IL-17-Producing Cells: The Sentinels of the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 479–489, doi:10.1038/nri2800.
73. Entman, M.L.; Youker, K.; Shoji, T.; Kukielka, G.; Shappell, S.B.; Taylor, A.A.; Smith, C.W. Neutrophil Induced Oxidative Injury of Cardiac Myocytes. A Compartmented System Requiring CD11b/CD18-ICAM-1 Adherence. *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 1335–1345, doi:10.1172/JCI115999.
74. Ma, Y.; Yabluchanskiy, A.; Iyer, R.P.; Cannon, P.L.; Flynn, E.R.; Jung, M.; Henry, J.; Cates, C.A.; Deleon-Pennell, K.Y.; Lindsey, M.L. Temporal Neutrophil Polarization Following Myocardial Infarction. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *110*, 51–61, doi:10.1093/cvr/cvw024.
75. Alard, J.-E.; Ortega-Gomez, A.; Wichapong, K.; Bongiovanni, D.; Horckmans, M.; Megens, R.T.A.; Leoni, G.; Ferraro, B.; Rossaint, J.; Paulin, N.; et al. Recruitment of Classical Monocytes Can Be Inhibited by Disturbing Heteromers of Neutrophil

76. Mollenhauer, M.; Friedrichs, K.; Lange, M.; Gesenberg, J.; Remane, L.; Kerkenpaß, C.; Krause, J.; Schneider, J.; Ravekes, T.; Maass, M.; et al. Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circ. Res.* **2017**, *121*, 56–70, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310870.
77. Horckmans, M.; Ring, L.; Duchene, J.; Santovito, D.; Schloss, M.J.; Drechsler, M.; Weber, C.; Soehnlein, O.; Steffens, S. Neutrophils Orchestrate Post-Myocardial Infarction Healing by Polarizing Macrophages towards a Reparative Phenotype. *Eur. Heart J.* **2016**, ehw002, doi:10.1093/eurheartj/ehw002.
78. Nahrendorf, M.; Swirski, F.K.; Aikawa, E.; Stangenberg, L.; Wurdinger, T.; Figueiredo, J.-L.; Libby, P.; Weissleder, R.; Pittet, M.J. The Healing Myocardium Sequentially Mobilizes Two Monocyte Subsets with Divergent and Complementary Functions. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 3037–3047, doi:10.1084/jem.20070885.
79. Leor, J.; Rozen, L.; Zuloff-Shani, A.; Feinberg, M.S.; Amsalem, Y.; Barbash, I.M.; Kachel, E.; Holbova, R.; Mardor, Y.; Daniels, D.; et al. Ex Vivo Activated Human Macrophages Improve Healing, Remodeling, and Function of the Infarcted Heart. *Circulation* **2006**, *114*, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000331.
80. Hayashidani, S.; Tsutsui, H.; Shiomi, T.; Ikeuchi, M.; Matsusaka, H.; Suematsu, N.; Wen, J.; Egashira, K.; Takeshita, A. Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Attenuates Left Ventricular Remodeling and Failure After Experimental Myocardial Infarction. *Circulation* **2003**, *108*, 2134–2140, doi:10.1161/01.CIR.0000092890.29552.22.
81. Martinez, F.O.; Gordon, S. The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment. *F1000Prime Rep.* **2014**, *6*, doi:10.12703/P6-13.
82. Frangogiannis, N.G. Chemokines in the Ischemic Myocardium: From Inflammation to Fibrosis. *Inflamm. Res.* **2004**, *53*, 585–595, doi:10.1007/s00011-004-1298-5.
83. Gillitzer, R.; Goebeler, M. Chemokines in Cutaneous Wound Healing. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 513–521.
84. Courties, G.; Heidt, T.; Sebas, M.; Iwamoto, Y.; Jeon, D.; Truelove, J.; Tricot, B.; Wojtkiewicz, G.; Dutta, P.; Sager, H.B.; et al. In Vivo Silencing of the Transcription Factor IRF5 Reprograms the Macrophage Phenotype and Improves Infarct Healing. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *63*, 1556–1566, doi:10.1016/j.jacc.2013.11.023.
85. Zhou, L.-S.; Zhao, G.-L.; Liu, Q.; Jiang, S.-C.; Wang, Y.; Zhang, D.-M. Silencing Collapsin Response Mediator Protein-2 Reprograms Macrophage Phenotype and Improves Infarct Healing in Experimental Myocardial Infarction Model. *J. Inflamm.* **2015**, *12*, 11, doi:10.1186/s12950-015-0053-8.
86. Ahuja, V.; Miller, S.E.; Howell, D.N. Identification of Two Subpopulations of Rat Monocytes Expressing Disparate Molecular Forms and Quantities of CD43. *Cell. Immunol.* **1995**, *163*, 59–69, doi:10.1006/cimm.1995.1099.
87. Swirski, F.K.; Nahrendorf, M.; Etzrodt, M.; Wildgruber, M.; Cortez-Retamozo, V.; Panizzi, P.; Figueiredo, J.-L.; Kohler, R.H.; Chudnovskiy, A.; Waterman, P.; et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science (80-)*. **2009**, *325*, 612–616, doi:10.1126/science.1175202.
88. Sonmez, O.; Sonmez, M. Role of Platelets in Immune System and Inflammation. *Porto Biomed. J.* **2017**, *2*, 311–314, doi:10.1016/j.pbj.2017.05.005.
89. Varda-Bloom, N.; Leor, J.; Ohad, D.G.; Hasin, Y.; Amar, M.; Fixler, R.; Battler, A.; Eldar, M.; Hasin, D. Cytotoxic T Lymphocytes Are Activated Following Myocardial Infarction and Can Recognize and Kill Healthy Myocytes In Vitro. *J. Mol.*

Cell. Cardiol. **2000**, 32, 2141–2149, doi:10.1006/jmcc.2000.1261.

90. Hofmann, U.; Beyersdorf, N.; Weirather, J.; Podolskaya, A.; Bauersachs, J.; Ertl, G.; Kerkau, T.; Frantz, S. Activation of CD4 + T Lymphocytes Improves Wound Healing and Survival After Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* **2012**, 125, 1652–1663, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044164.
91. Weirather, J.; Hofmann, U.D.W.; Beyersdorf, N.; Ramos, G.C.; Vogel, B.; Frey, A.; Ertl, G.; Kerkau, T.; Frantz, S. Foxp3 + CD4 + T Cells Improve Healing After Myocardial Infarction by Modulating Monocyte/Macrophage Differentiation. *Circ. Res.* **2014**, 115, 55–67, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303895.
92. Witherel, C.E.; Abeyayehu, D.; Barker, T.H.; Spiller, K.L. Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, 8, doi:10.1002/adhm.201801451.
93. Frangiannis, N.G.; Lindsey, M.L.; Michael, L.H.; Youker, K.A.; Bressler, R.B.; Mendoza, L.H.; Spengler, R.N.; Smith, C.W.; Entman, M.L. Resident Cardiac Mast Cells Degranulate and Release Preformed TNF- α , Initiating the Cytokine Cascade in Experimental Canine Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Circulation* **1998**, 98, 699–710, doi:10.1161/01.CIR.98.7.699.
94. Scalise, R.F.M.; De Sarro, R.; Caracciolo, A.; Lauro, R.; Squadrito, F.; Carerj, S.; Bitto, A.; Micari, A.; Bella, G. Di; Costa, F.; et al. Fibrosis after Myocardial Infarction: An Overview on Cellular Processes, Molecular Pathways, Clinical Evaluation and Prognostic Value. *Med. Sci.* **2021**, 9, 16, doi:10.3390/medsci9010016.
95. Dewald, O.; Ren, G.; Duerr, G.D.; Zoerlein, M.; Klemm, C.; Gersch, C.; Tincey, S.; Michael, L.H.; Entman, M.L.; Frangiannis, N.G. Of Mice and Dogs. *Am. J. Pathol.* **2004**, 164, 665–677, doi:10.1016/S0002-9440(10)63154-9.
96. Ma, Y.; Mouton, A.J.; Lindsey, M.L. Cardiac Macrophage Biology in the Steady-State Heart, the Aging Heart, and Following Myocardial Infarction. *Transl. Res.* **2018**, 191, 15–28, doi:10.1016/j.trsl.2017.10.001.
97. Ben-Mordechai, T.; Palevski, D.; Glucksam-Galnoy, Y.; Elron-Gross, I.; Margalit, R.; Leor, J. Targeting Macrophage Subsets for Infarct Repair. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2015**, 20, 36–51, doi:10.1177/1074248414534916.
98. Li, M.O.; Flavell, R.A. Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10. *Immunity* **2008**, 28, 468–476, doi:10.1016/j.immuni.2008.03.003.
99. Li, J.; Brown, L.F.; Hibberd, M.G.; Grossman, J.D.; Morgan, J.P.; Simons, M. VEGF, Flk-1, and Flt-1 Expression in a Rat Myocardial Infarction Model of Angiogenesis. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **1996**, 270, H1803–H1811, doi:10.1152/ajpheart.1996.270.5.H1803.
100. Schiller, M.; Javelaud, D.; Mauviel, A. TGF- β -Induced SMAD Signaling and Gene Regulation: Consequences for Extracellular Matrix Remodeling and Wound Healing. *J. Dermatol. Sci.* **2004**, 35, 83–92, doi:10.1016/j.jdermsci.2003.12.006.
101. Hilgendorf, I.; Gerhardt, L.M.S.; Tan, T.C.; Winter, C.; Holderried, T.A.W.; Chousterman, B.G.; Iwamoto, Y.; Liao, R.; Zirlik, A.; Scherer-Crosbie, M.; et al. Ly-6C High Monocytes Depend on Nr4a1 to Balance Both Inflammatory and Reparative Phases in the Infarcted Myocardium. *Circ. Res.* **2014**, 114, 1611–1622, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303204.
102. Mosser, D.M.; Edwards, J.P. Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, 8, 958–969, doi:10.1038/nri2448.
103. Harel-Adar, T.; Mordechai, T. Ben; Amsalem, Y.; Feinberg, M.S.; Leor, J.; Cohen, S. Modulation of Cardiac Macrophages by Phosphatidylserine-Presenting Liposomes Improves Infarct Repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 1827–1832, doi:10.1073/pnas.1015623108.

104. Hulsmans, M.; Clauss, S.; Xiao, L.; Aguirre, A.D.; King, K.R.; Hanley, A.; Hucker, W.J.; Wülfers, E.M.; Seemann, G.; Courties, G.; et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* **2017**, *169*, 510-522.e20, doi:10.1016/j.cell.2017.03.050.
105. Porta, C.; Rimoldi, M.; Raes, G.; Brys, L.; Ghezzi, P.; Di Liberto, D.; Dieli, F.; Ghisletti, S.; Natoli, G.; De Baetselier, P.; et al. Tolerance and M2 (Alternative) Macrophage Polarization Are Related Processes Orchestrated by P50 Nuclear Factor KB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 14978–14983, doi:10.1073/pnas.0809784106.
106. Takeda, N.; O’Dea, E.L.; Doedens, A.; Kim, J.; Weidemann, A.; Stockmann, C.; Asagiri, M.; Simon, M.C.; Hoffmann, A.; Johnson, R.S. Differential Activation and Antagonistic Function of HIF- α Isoforms in Macrophages Are Essential for NO Homeostasis. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 491–501, doi:10.1101/gad.1881410.
107. Anzai, A.; Anzai, T.; Nagai, S.; Maekawa, Y.; Naito, K.; Kaneko, H.; Sugano, Y.; Takahashi, T.; Abe, H.; Mochizuki, S.; et al. Regulatory Role of Dendritic Cells in Postinfarction Healing and Left Ventricular Remodeling. *Circulation* **2012**, *125*, 1234–1245, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.052126.
108. Ushach, I.; Zlotnik, A. Biological Role of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) and Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) on Cells of the Myeloid Lineage. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100*, 481–489, doi:10.1189/jlb.3RU0316-144R.
109. Howangyin, K.-Y.; Zlatanova, I.; Pinto, C.; Ngkelo, A.; Cochain, C.; Rouanet, M.; Vilar, J.; Lemitre, M.; Stockmann, C.; Fleischmann, B.K.; et al. Myeloid-Epithelial-Reproductive Receptor Tyrosine Kinase and Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor 8 Coordinately Improve Remodeling After Myocardial Infarction via Local Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor. *Circulation* **2016**, *133*, 826–839, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020857.
110. Sica, A.; Mantovani, A. Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 787–795, doi:10.1172/JCI59643.
111. Sobirin, M.A.; Kinugawa, S.; Takahashi, M.; Fukushima, A.; Homma, T.; Ono, T.; Hirabayashi, K.; Suga, T.; Azalia, P.; Takada, S.; et al. Activation of Natural Killer T Cells Ameliorates Postinfarct Cardiac Remodeling and Failure in Mice. *Circ. Res.* **2012**, *111*, 1037–1047, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.270132.
112. Zymek, P.; Bujak, M.; Chatila, K.; Cieslak, A.; Thakker, G.; Entman, M.L.; Frangogiannis, N.G. The Role of Platelet-Derived Growth Factor Signaling in Healing Myocardial Infarcts. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2006**, *48*, 2315–2323, doi:10.1016/j.jacc.2006.07.060.
113. Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P.A. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 33–45, doi:10.1038/nrm1004.
114. Fiorentino, D.F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T.R.; Howard, M.; O’Garra, A. IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. *J. Immunol.* **1991**, *147*, 3815–3822.
115. Frangogiannis, N.G. Transforming Growth Factor- β in Tissue Fibrosis. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, doi:10.1084/jem.20190103.
116. Dobaczewski, M.; Chen, W.; Frangogiannis, N.G. Transforming Growth Factor (TGF)- β Signaling in Cardiac Remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2011**, *51*, 600–606, doi:10.1016/j.yjmcc.2010.10.033.
117. Juban, G.; Saclier, M.; Yacoub-Youssef, H.; Kernou, A.; Arnold, L.; Boisson, C.; Ben Larbi, S.; Magnan, M.; Cuvellier, S.; Th  ret, M.; et al. AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF-B1 Secretion by Pro-Inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 2163-2176.e6, doi:10.1016/j.celrep.2018.10.077.

118. IKEUCHI, M.; TSUTSUI, H.; SHIOMI, T.; MATSUSAKA, H.; MATSUSHIMA, S.; WEN, J.; KUBOTA, T.; TAKESHITA, A. Inhibition of TGF- β Signaling Exacerbates Early Cardiac Dysfunction but Prevents Late Remodeling after Infarction. *Cardiovasc. Res.* **2004**, *64*, 526–535, doi:10.1016/j.cardiores.2004.07.017.
119. Dobaczewski, M.; Xia, Y.; Bujak, M.; Gonzalez-Quesada, C.; Frangogiannis, N.G. CCR5 Signaling Suppresses Inflammation and Reduces Adverse Remodeling of the Infarcted Heart, Mediating Recruitment of Regulatory T Cells. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 2177–2187, doi:10.2353/ajpath.2010.090759.
120. Chen, W.; Saxena, A.; Li, N.; Sun, J.; Gupta, A.; Lee, D.-W.; Tian, Q.; Dobaczewski, M.; Frangogiannis, N.G. Endogenous IRAK-M Attenuates Postinfarction Remodeling Through Effects on Macrophages and Fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2598–2608, doi:10.1161/ATVBAHA.112.300310.
121. Shinde, A. V.; Humeres, C.; Frangogiannis, N.G. The Role of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblast-Mediated Matrix Contraction and Remodeling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 298–309, doi:10.1016/j.bbdis.2016.11.006.
122. Sun, Y. Angiotensin Converting Enzyme and Myofibroblasts during Tissue Repair in the Rat Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1996**, *28*, 851–858, doi:10.1006/jmcc.1996.0080.
123. Lenga, Y.; Koh, A.; Perera, A.S.; McCulloch, C.A.; Sodek, J.; Zohar, R. Osteopontin Expression Is Required for Myofibroblast Differentiation. *Circ. Res.* **2008**, *102*, 319–327, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.160408.
124. Davis, J.; Burr, A.R.; Davis, G.F.; Birnbaumer, L.; Molkentin, J.D. A TRPC6-Dependent Pathway for Myofibroblast Transdifferentiation and Wound Healing In Vivo. *Dev. Cell* **2012**, *23*, 705–715, doi:10.1016/j.devcel.2012.08.017.
125. Frangogiannis, N. Myofibroblasts in Reperfused Myocardial Infarcts Express the Embryonic Form of Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SMemb). *Cardiovasc. Res.* **2000**, *48*, 89–100, doi:10.1016/S0008-6363(00)00158-9.
126. Santiago, J.; Dangerfield, A.L.; Rattan, S.G.; Bathe, K.L.; Cunnington, R.H.; Raizman, J.E.; Bedosky, K.M.; Freed, D.H.; Kardami, E.; Dixon, I.M.C. Cardiac Fibroblast to Myofibroblast Differentiation in Vivo and in Vitro: Expression of Focal Adhesion Components in Neonatal and Adult Rat Ventricular Myofibroblasts. *Dev. Dyn.* **2010**, *239*, 1573–1584, doi:10.1002/dvdy.22280.
127. Hinz, B.; Phan, S.H.; Thannickal, V.J.; Galli, A.; Bochaton-Piallat, M.-L.; Gabbiani, G. The Myofibroblast. *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 1807–1816, doi:10.2353/ajpath.2007.070112.
128. Frangogiannis, N.G. The Functional Pluralism of Fibroblasts in the Infarcted Myocardium. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 1049–1051, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309926.
129. Nakaya, M.; Watari, K.; Tajima, M.; Nakaya, T.; Matsuda, S.; Ohara, H.; Nishihara, H.; Yamaguchi, H.; Hashimoto, A.; Nishida, M.; et al. Cardiac Myofibroblast Engulfment of Dead Cells Facilitates Recovery after Myocardial Infarction. *J. Clin. Invest.* **2016**, *127*, 383–401, doi:10.1172/JCI83822.
130. CLEUTJENS, J.; KANDALA, J.; GUARDA, E.; GUNTAKA, R.; WEBER, K. Regulation of Collagen Degradation in the Rat Myocardium after Infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1995**, *27*, 1281–1292, doi:10.1016/S0022-2828(05)82390-9.
131. Sun, Y. Infarct Scar: A Dynamic Tissue. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *46*, 250–256, doi:10.1016/S0008-6363(00)00032-8.
132. Hirschel, B.J.; Gabbiani, G.; Ryan, G.B.; Majno, G. Fibroblasts of Granulation Tissue: Immunofluorescent Staining with Antismooth Muscle Serum. *Exp. Biol. Med.* **1971**, *138*, 466–469, doi:10.3181/00379727-138-35920.

133. Spinale, F.G.; Frangogiannis, N.G.; Hinz, B.; Holmes, J.W.; Kassiri, Z.; Lindsey, M.L. Crossing Into the Next Frontier of Cardiac Extracellular Matrix Research. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 1040–1045, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309916.
134. Devaux, B.; Scholz, D.; Hirche, A.; Klovekorn, W.P.; Schaper, J. Upregulation of Cell Adhesion Molecules and the Presence of Low Grade Inflammation in Human Chronic Heart Failure. *Eur. Heart J.* **1997**, *18*, 470–479, doi:10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a015268.
135. Perl, R. *Alcohol and Longevity*; Alfred A. Knopf: New York: New York, USA, 1926;
136. Di Castelnuovo, A.; Rotondo, S.; Iacoviello, L.; Donati, M.B.; de Gaetano, G. Meta-Analysis of Wine and Beer Consumption in Relation to Vascular Risk. *Circulation* **2002**, *105*, 2836–2844, doi:10.1161/01.CIR.0000018653.19696.01.
137. Pai, J.K.; Mukamal, K.J.; Rimm, E.B. Long-Term Alcohol Consumption in Relation to All-Cause and Cardiovascular Mortality among Survivors of Myocardial Infarction: The Health Professionals Follow-up Study. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 1598–1605, doi:10.1093/eurheartj/ehs047.
138. Janszky, I.; Ljung, R.; Ahnve, S.; Hallqvist, J.; Bennet, A.M.; Mukamal, K.J. Alcohol and Long-Term Prognosis after a First Acute Myocardial Infarction: The SHEEP Study. *Eur. Heart J.* **2007**, *29*, 45–53, doi:10.1093/eurheartj/ehm509.
139. Gronbaek, M.; Deis, A.; Sorensen, T.I.A.; Becker, U.; Schnohr, P.; Jensen, G. Mortality Associated with Moderate Intakes of Wine, Beer, or Spirits. *BMJ* **1995**, *310*, 1165–1169, doi:10.1136/bmj.310.6988.1165.
140. Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *Lancet* **1992**, *339*, 1523–1526, doi:10.1016/0140-6736(92)91277-F.
141. Mukamal, K.J.; Maclure, M.; Muller, J.E.; Sherwood, J.B.; Mittleman, M.A. Prior Alcohol Consumption and Mortality Following Acute Myocardial Infarction. *JAMA* **2001**, *285*, 1965, doi:10.1001/jama.285.15.1965.
142. Miyamae, M.; Diamond, I.; Weiner, M.W.; Camacho, S.A.; Figueredo, V.M. Regular Alcohol Consumption Mimics Cardiac Preconditioning by Protecting against Ischemia–Reperfusion Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 3235–3239, doi:10.1073/pnas.94.7.3235.
143. Golan, R.; Gepner, Y.; Shai, I. Wine and Health—New Evidence. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2019**, *72*, 55–59.
144. Bell, S.; Daskalopoulou, M.; Rapsomaniki, E.; George, J.; Britton, A.; Bobak, M.; Casas, J.P.; Dale, C.E.; Denaxas, S.; Shah, A.D.; et al. Association between Clinically Recorded Alcohol Consumption and Initial Presentation of 12 Cardiovascular Diseases: Population Based Cohort Study Using Linked Health Records. *BMJ* **2017**, *356*, j909, doi:10.1136/bmj.j909.
145. Crujisen, E.; De Ruiter, A.J.; Küpers, L.K.; Busstra, M.C.; Geleijnse, J.M. Alcohol Intake and Long-Term Mortality Risk after Myocardial Infarction in the Alpha Omega Cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* **2022**, *115*, 633–642, doi:10.1093/ajcn/nqab366.
146. Sadhu, J.S.; Novak, E.; Mukamal, K.J.; Kizer, J.R.; Psaty, B.M.; Stein, P.K.; Brown, D.L. Association of Alcohol Consumption After Development of Heart Failure With Survival Among Older Adults in the Cardiovascular Health Study. *JAMA Netw. open* **2018**, *1*, e186383, doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.6383.
147. Piano, M.R. Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol Res.* **2017**, *38*, 219–241.
148. Tian, Y.; Liu, J.; Zhao, Y.; Jiang, N.; Liu, X.; Zhao, G.; Wang, X. Alcohol Consumption and All-Cause and Cause-Specific Mortality among US Adults: Prospective Cohort Study. *BMC Med.* **2023**, *21*, 208, doi:10.1186/s12916-023-02907-6.
149. Arranz, S.; Chiva-Blanch, G.; Valderas-Martínez, P.; Medina-Remón, A.; Lamuela-Raventós, R.M.; Estruch, R. Wine, Beer,

Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients* **2012**, *4*, 759–781, doi:10.3390/nu4070759.

150. Di Castelnuovo, A.; Costanzo, S.; di Giuseppe, R.; de Gaetano, G.; Iacoviello, L. Alcohol Consumption and Cardiovascular Risk: Mechanisms of Action and Epidemiologic Perspectives. *Future Cardiol.* **2009**, *5*, 467–477, doi:10.2217/fca.09.36.
151. Heiss, C.; Keen, C.L.; Kelm, M. Flavanols and Cardiovascular Disease Prevention. *Eur. Heart J.* **2010**, *31*, 2583–2592, doi:10.1093/eurheartj/ehq332.
152. Forester, S.C.; Waterhouse, A.L. Metabolites Are Key to Understanding Health Effects of Wine Polyphenolics. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 1824S–1831S, doi:10.3945/jn.109.107664.
153. Queipo-Ortuño, M.I.; Boto-Ordóñez, M.; Murri, M.; Gomez-Zumaquero, J.M.; Clemente-Postigo, M.; Estruch, R.; Cardona Diaz, F.; Andrés-Lacueva, C.; Tinahones, F.J. Influence of Red Wine Polyphenols and Ethanol on the Gut Microbiota Ecology and Biochemical Biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 1323–1334, doi:10.3945/ajcn.111.027847.
154. Neveu, V.; Perez-Jimenez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; et al. Phenol-Explorer: An Online Comprehensive Database on Polyphenol Contents in Foods. *Database* **2010**, *2010*, bap024–bap024, doi:10.1093/database/bap024.
155. Herjavec, S.; Jeromel, A.; Da Silva, A.; Orlic, S.; Redzepovic, S. The Quality of White Wines Fermented in Croatian Oak Barrels. *Food Chem.* **2007**, *100*, 124–128, doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.034.
156. Carpena, M.; Pereira, A.G.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Wine Aging Technology: Fundamental Role of Wood Barrels. *Foods* **2020**, *9*, 1160, doi:10.3390/foods9091160.
157. Evolution of the World Wine Production and Consumption by Colour, International Organisation of Vine and Wine Available online: <https://www.oiv.int/press/focus-evolution-world-wine-production-and-consumption-colour>.
158. Xi, B.; Veeranki, S.P.; Zhao, M.; Ma, C.; Yan, Y.; Mi, J. Relationship of Alcohol Consumption to All-Cause, Cardiovascular, and Cancer-Related Mortality in U.S. Adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 913–922, doi:10.1016/j.jacc.2017.06.054.
159. Roerecke, M.; Rehm, J. Irregular Heavy Drinking Occasions and Risk of Ischemic Heart Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Epidemiol.* **2010**, *171*, 633–644, doi:10.1093/aje/kwp451.
160. Gea, A.; Bes-Rastrollo, M.; Toledo, E.; Garcia-Lopez, M.; Beunza, J.J.; Estruch, R.; Martinez-Gonzalez, M.A. Mediterranean Alcohol-Drinking Pattern and Mortality in the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) Project: A Prospective Cohort Study. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1871–1880, doi:10.1017/S0007114513004376.
161. Eleftheriou, D.; Benetou, V.; Trichopoulou, A.; La Vecchia, C.; Bamia, C. Mediterranean Diet and Its Components in Relation to All-Cause Mortality: Meta-Analysis. *Br. J. Nutr.* **2018**, *120*, 1081–1097, doi:10.1017/S0007114518002593.
162. U.S. News & World Report. Best Diets Overall 2024 [Internet]. U.S. News & World Report [Accessed on Nov 21, 2024]. Available at: <https://Health.USnews.Com/Best-Diet/Best-Diets-Overall>.
163. Chistiakov, D.A.; Killingsworth, M.C.; Myasoedova, V.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y. V CD68/Macrosialin: Not Just a Histochemical Marker. *Lab. Invest.* **2017**, *97*, 4–13, doi:10.1038/labinvest.2016.116.
164. Greaves, D.R.; Gordon, S. Macrophage-Specific Gene Expression: Current Paradigms and Future Challenges. *Int. J. Hematol.* **2002**, *76*, 6–15, doi:10.1007/BF02982713.
165. Venugopal, H.; Hanna, A.; Humeres, C.; Frangogiannis, N.G. Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in

Myocardial Infarction. *Cells* **2022**, *11*, 1386, doi:10.3390/cells11091386.

166. Virag, J.I.; Murry, C.E. Myofibroblast and Endothelial Cell Proliferation during Murine Myocardial Infarct Repair. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 2433–2440, doi:10.1016/S0002-9440(10)63598-5.
167. van den Borne, S.W.M.; Diez, J.; Blankesteyn, W.M.; Verjans, J.; Hofstra, L.; Narula, J. Myocardial Remodeling after Infarction: The Role of Myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* **2010**, *7*, 30–37, doi:10.1038/nrcardio.2009.199.
168. Robinson, J.; Harding, J.; Voullamoz, J. *Wine Grapes*; London, UK, 2012;
169. Milat, A.M.; Mudnić, I.; Grković, I.; Ključević, N.; Grga, M.; Jerčić, I.; Jurić, D.; Ivanković, D.; Benzon, B.; Boban, M. Effects of White Wine Consumption on Weight in Rats: Do Polyphenols Matter? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/8315803.
170. Westerterp, K.R. Alcohol and Body Weight. In *Health Issues Related to Alcohol Consumption*; McDonald, I., Ed.; 1999; pp. 103–123.
171. Hayes, D.P. Nutritional Hormesis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2007**, *61*, 147–159.
172. Hayes, D.P. Adverse Effects of Nutritional Inadequacy and Excess: A Hormetic Model. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 578S–581S, doi:10.1093/ajcn/88.2.578S.
173. Chiva-blanch, G.; Badimon, L. Benefits and Risks of Moderate Alcohol Consumption on Cardiovascular Disease: Current Findings and Controversies. *Nutrients* **2020**, *12*.
174. Corrao, G.; Rubbiati, L.; Bagnardi, V.; Zambon, A.; Poikolainen, K. Alcohol and Coronary Heart Disease: A Meta-analysis. *Addiction* **2000**, *95*, 1505–1523, doi:10.1046/j.1360-0443.2000.951015056.x.
175. Kato, E.; Muramoto, A.; Yonemoto, N.; Matsuwaki, Y.; Sakashita, M.; Fukushima, M.; Fujieda, S.; Kobayashi, M. High M2/M1 Macrophage Ratio Observed in Nasal Polyps Formed in Allergic Fungal Rhinosinusitis. *J. Histochem. Cytochem.* **2024**, *72*, 683–692, doi:10.1369/00221554241286571.
176. Niino, D.; Komohara, Y.; Murayama, T.; Aoki, R.; Kimura, Y.; Hashikawa, K.; Kiyasu, J.; Takeuchi, M.; Suefuji, N.; Sugita, Y.; et al. Ratio of M2 Macrophage Expression Is Closely Associated with Poor Prognosis for Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma (AITL). *Pathol. Int.* **2010**, *60*, 278–283, doi:10.1111/j.1440-1827.2010.02514.x.
177. Chen, S.; Saeed, A.F.U.H.; Liu, Q.; Jiang, Q.; Xu, H.; Xiao, G.G.; Rao, L.; Duo, Y. Macrophages in Immunoregulation and Therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 207, doi:10.1038/s41392-023-01452-1.
178. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6425–6440, doi:10.1002/jcp.26429.
179. Thompson, S.A.; Copeland, C.R.; Reich, D.H.; Tung, L. Mechanical Coupling Between Myofibroblasts and Cardiomyocytes Slows Electric Conduction in Fibrotic Cell Monolayers. *Circulation* **2011**, *123*, 2083–2093, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.015057.
180. WATERHOUSE, A.L. Wine Phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *957*, 21–36, doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x.
181. Santos-Buelga, C.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M. White Wine Polyphenols and Health. In *White Wine Technology*; Elsevier, 2022; pp. 205–220.

182. Mas, A.; Guillamon, J.M.; Torija, M.J.; Beltran, G.; Cerezo, A.B.; Troncoso, A.M.; Garcia-Parrilla, M.C. Bioactive Compounds Derived from the Yeast Metabolism of Aromatic Amino Acids during Alcoholic Fermentation. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–7, doi:10.1155/2014/898045.
183. Rodríguez-Morató, J.; Boronat, A.; Kotronoulas, A.; Pujadas, M.; Pastor, A.; Olesti, E.; Pérez-Mañá, C.; Khymenets, O.; Fitó, M.; Farré, M.; et al. Metabolic Disposition and Biological Significance of Simple Phenols of Dietary Origin: Hydroxytyrosol and Tyrosol. *Drug Metab. Rev.* **2016**, *48*, 218–236, doi:10.1080/03602532.2016.1179754.
184. Silva, H.; Lopes, N.M.F. Cardiovascular Effects of Caffeic Acid and Its Derivatives: A Comprehensive Review. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fphys.2020.595516.
185. Migliori, M.; Cantaluppi, V.; Mannari, C.; Bertelli, A.A.E.; Medica, D.; Quercia, A.D.; Navarro, V.; Scatena, A.; Giovannini, L.; Biancone, L.; 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*, e0117530, doi:10.1371/journal.pone.0117530.
186. Samuel, S.M.; Thirunavukkarasu, M.; Penumathsa, S.V.; 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. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9692–9698, doi:10.1021/jf802050h.
187. Thirunavukkarasu, M.; Penumathsa, S.V.; Samuel, S.M.; Akita, Y.; Zhan, L.; Bertelli, A.A.E.; Maulik, G.; Maulik, N. White Wine Induced Cardioprotection against Ischemia-Reperfusion Injury Is Mediated by Life Extending Akt/FOXO3a/NFκB Survival Pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6733–6739, doi:10.1021/jf801473v.
188. Boban, D.; Dželalija, A.M.; Gujinović, D.; Benzon, B.; Ključević, N.; Boban, Z.; Mudnić, I.; Grković, I. Differential Effects of White Wine and Ethanol Consumption on Survival of Rats after a Myocardial Infarction. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 1450, doi:10.3390/app13031450.
189. Braunwald, E.; Rutherford, J.D. Reversible Ischemic Left Ventricular Dysfunction: Evidence for the “Hibernating Myocardium.” *J. Am. Coll. Cardiol.* **1986**, *8*, 1467–1470, doi:10.1016/S0735-1097(86)80325-4.
190. Depre, C.; Kim, S.-J.; John, A.S.; Huang, Y.; Rimoldi, O.E.; Pepper, J.R.; Dreyfus, G.D.; Gaussin, V.; Pennell, D.J.; Vatner, D.E.; et al. Program of Cell Survival Underlying Human and Experimental Hibernating Myocardium. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 433–440, doi:10.1161/01.RES.0000138301.42713.18.
191. Hedayati, N.; Yaghoobi, A.; Salami, M.; Gholinezhad, Y.; Aghadavood, F.; Eshraghi, R.; Aarabi, M.-H.; Homayoonfal, M.; Asemi, Z.; Mirzaei, H.; et al. Impact of Polyphenols on Heart Failure and Cardiac Hypertrophy: Clinical Effects and Molecular Mechanisms. *Front. Cardiovasc. Med.* **2023**, *10*, doi:10.3389/fcvm.2023.1174816.
192. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF-κB Signaling in Inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17023, doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
193. Wardyn, J.D.; Ponsford, A.H.; Sanderson, C.M. Dissecting Molecular Cross-Talk between Nrf2 and NF-κB Response Pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 621–626, doi:10.1042/BST20150014.
194. Forman, H.J.; Ursini, F. Para-Hormesis: An Innovative Mechanism for the Health Protection Brought by Antioxidants in Wine. *Nutr. Aging* **2014**, *2*, 117–124, doi:10.3233/nua-130033.
195. Bonnefont-Rousselot, D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients* **2016**, *8*, 250, doi:10.3390/nu8050250.

196. Ehtiati, S.; Alizadeh, M.; Farhadi, F.; Khalatbari, K.; Ajiboye, B.O.; Baradaran Rahimi, V.; Askari, V.R. Promising Influences of Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester against Natural and Chemical Toxins: A Comprehensive and Mechanistic Review. *J. Funct. Foods* **2023**, *107*, 105637, doi:10.1016/j.jff.2023.105637.
197. Forman, H.J.; Davies, K.J.A.; Ursini, F. How Do Nutritional Antioxidants Really Work: Nucleophilic Tone and Para-Hormesis versus Free Radical Scavenging in Vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *66*, 24–35.
198. Li, W.; He, H.; Du, M.; Gao, M.; Sun, Q.; Wang, Y.; Lu, H.; Ou, S.; Xia, C.; Xu, C.; et al. Quercetin as a Promising Intervention for Rat Osteoarthritis by Decreasing M1-polarized Macrophages via Blocking the TRPV1-mediated P2X7 / NLRP3 Signaling Pathway. *Phyther. Res.* **2024**, *38*, 1990–2006, doi:10.1002/ptr.8158.
199. Wu, J.; Li, Z.; Deng, Y.; Lu, X.; Luo, C.; Mu, X.; Zhang, T.; Liu, Q.; Tang, S.; Li, J.; et al. Function of TRP Channels in Monocytes/Macrophages. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, doi:10.3389/fimmu.2023.1187890.
200. Samuel, S.M.; Thirunavukkarasu, M.; Penumathsa, S.V.; 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. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9692–9698, doi:10.1021/jf802050h.
201. Sheng, R.; Gu, Z.; Xie, M.; Zhou, W.; Guo, C. EGCG Inhibits Proliferation of Cardiac Fibroblasts in Rats with Cardiac Hypertrophy. *Planta Med.* **2009**, *75*, 113–120, doi:10.1055/s-0028-1088387.
202. Cai, Y.; Yu, S.-S.; Chen, T.-T.; Gao, S.; Geng, B.; Yu, Y.; Ye, J.-T.; Liu, P.-Q. EGCG Inhibits CTGF Expression via Blocking NF-KB Activation in Cardiac Fibroblast. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 106–113, doi:10.1016/j.phymed.2012.10.002.
203. Cai, Y.; He, S.-Q.; Hong, H.-Q.; Cai, Y.-P.; Zhao, L.; Zhang, M. High Doses of (–)-Epigallocatechin-3-Gallate from Green Tea Induces Cardiac Fibrosis in Mice. *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 2371–2377, doi:10.1007/s10529-015-1926-x.
204. Chen, T.; Li, J.; Liu, J.; Li, N.; Wang, S.; Liu, H.; Zeng, M.; Zhang, Y.; Bu, P. Activation of SIRT3 by Resveratrol Ameliorates Cardiac Fibrosis and Improves Cardiac Function via the TGF-β/Smad3 Pathway. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2015**, *308*, H424–H434, doi:10.1152/ajpheart.00454.2014.

9. SAŽETAK

NASLOV DOKTORSKOG RADA: UČINAK KONZUMACIJE VINA I ETANOLA NA PREŽIVLJENJE I PROLIFERATIVNU FAZU CIJELJENJA NAKON KIRURŠKI INDUCIRANOG INFARKTA MIOKARDA NA MODELU ŠTAKORA

UVOD: Istraživanja o kardioprotektivnim učincima vina uglavnom su usredotočena na crno vino zbog njegovog većeg sadržaja bioaktivnih spojeva u usporedbi s bijelim vinom. Iako neke studije sugeriraju postojanje kardioprotektivnog djelovanja bijelog vina, ne postoji jasan konsenzus o tome nadilaze li te koristi one koje pruža sam etanol.

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj ovog istraživanja bio je analizirati stope preživljenja i imunohistokemijske osobine infiltrata makrofaga te razinu aktivacije miofibroblasta u tkivu miokarda životinja koje su preživjele 96 sati nakon kirurški inducirano infarkta miokarda (IM), a koje su prethodno tijekom četiri tjedna konzumirale bijelo vino, vodenu otopinu etanola ili samu vodu.

MATERIJALI I METODE: U studiji je korišteno 80 muških štakora vrste Sprague-Dawley podijeljenih u tri skupine: skupina koja je pila samo vodu, bijelo vino uz vodu ili 13% v/v vodene otopine etanola uz vodu. Nakon četverotjednog perioda konzumacije pića, IM je induciran podvezivanjem prednje interventrikularne arterije. Srca životinja koje su preživjele 96 sati nakon IM-a, te koje su konzumirale najmanje 8 mL alkoholnih pića dnevno i imale usporedive veličine IM-a, prikupljena su za imunohistokemijsku analizu. Uzorci tkiva obojeni su pan-makrofagnim biljekom (CD68) i protuupalnim biljekom makrofaga (CD163) kako bi se procijenila polarizacija makrofaga koja je ključna za cijeljenje nakon IM-a. Osim analize biljega makrofaga, provedeno je i bojanje α -SMA biljekom kako bi se ustanovila i usporedila aktivnost miofibroblasta između eksperimentalnih skupina.

REZULTATI: Najviša stopa preživljenja zabilježena je u skupini koja je konzumirala bijelo vino (72,2%), dok je najniža bila u skupini koja je pila samo vodu (47,8%). Nije pronađena statistički značajna razlika u preživljenju između skupina koje su konzumirale vodenu otopinu etanola i vodu. Analiza volumena konzumiranih pića pokazala je da je niža količina konzumirane vodene otopine etanola bila povezana s većim stopama preživljenja. Suprotno tome, kod štakora koji su dnevno konzumirali oko 10 mL ili više bijelog vina nije zabilježen nijedan smrtni ishod. Imunofluorescencijskom analizom obradile su se četiri zone oko infarciranog područja — subepikardijalna, subendokardijalna i dvije periinfarktne zone. U svim analiziranim zonama najveći omjeri broja CD163 i CD68 pozitivnih makrofaga zabilježeni su u skupini koja je konzumirala bijelo vino. Što se tiče izražaja α -SMA, najmanje prosječne vrijednosti biljega dobivene su u vinskoj skupini

u svim zonama, no značajnost razlike ustanovljena je samo između vinske i kontrolne skupine u periinfarktnoj zoni.

ZAKLJUČAK: Zaključak studije je da umjerena konzumacija bijelog vina poboljšava preživljenje nakon IM-a, vjerojatno zahvaljujući njegovim nealkoholnim sastojcima. Konzumiranje veće količine vodene otopine etanola bilo je povezano s većom smrtnošću životinja, što ukazuje na gornju granicu zaštitnih učinaka ovog alkoholnog pića. Nijedna životinja koja je konzumirala prosječne količine vina ekvivalentne štetnoj količini etanolne otopine nije uginula, što sugerira da vino pruža dodatne zaštitne koristi koje nadmašuju učinke samog etanola.

U okviru proliferativne faze cijeljenja, uočena je povećana infiltracija protupalnih naspram proupalnih makrofaga kod životinja koje su konzumirale bijelo vino u usporedbi s onima koje su pile vodenu otopinu etanola i kontrolnim životinjama. Analiza je pokazala i smanjen izražaj α -SMA biljega u periinfarktnoj zoni kod životinja koje su konzumirale bijelo vino, posebno naglašen u periinfarktnoj zoni. Ovi rezultati ukazuju da bijelo vino sadrži sastojke koji dodatno podržavaju proces cijeljenja i smanjuju pretjeranu fibrozu tkiva u odnosu na druge dvije skupine.

Sveukupno, istraživanja u podlozi ovog doktorskog rada pokazuju da umjerena konzumacija bijelog vina poboljšava preživljenje te potiče prikladnije cijeljenje nakon IM-a zbog mehanizama koji nadilaze učinke samog etanola, vjerojatno zahvaljujući njegovim nealkoholnim bioaktivnim spojevima.

KLJUČNE RIJEČI: infarkt miokarda, štakor, bijelo vino, vodena otopina etanola, smrtnost, CD163, CD68, α -SMA

10. SUMMARY

TITLE OF THE DOCTORAL THESIS: THE EFFECT OF WINE AND ETHANOL CONSUMPTION ON THE SURVIVAL AND PROLIFERATIVE PHASE OF HEALING AFTER A SURGICALLY-INDUCED MYOCARDIAL INFARCTION ON THE RAT MODEL

INTRODUCTION: Studies on the cardioprotective effects of wine are primarily focused on red wine due to its higher content of bioactive compounds compared to white wine. Although some studies suggest that white wine may have cardioprotective properties, there is no clear consensus on whether these benefits surpass those provided by ethanol alone.

AIM OF THE STUDY: The aim of this study was to analyze the survival rates and immunohistochemical characteristics of macrophage infiltrates and the level of myofibroblast activation in myocardial tissue of animals that survived 96 hours after surgically induced myocardial infarction (MI), and that had previously consumed white wine, aqueous ethanol solution, or water alone for four weeks.

MATERIALS AND METHODS: In this study, 80 male Sprague Dawley rats were divided into three groups: one group consumed only water, another consumed white wine along with water, and the third group consumed a 13% v/v ethanol/water solution along with water. After a four-week drinking period, MI was induced by ligating the left anterior descending artery. Hearts from animals that survived the 96-hour post-infarction period, consumed at least 8 mL of alcoholic beverages daily, and had comparable infarct sizes, were collected for immunohistochemical analysis. Tissue samples were stained with CD68, a pan-macrophage marker, and CD163, an anti-inflammatory macrophage marker, to assess macrophage polarization, which is crucial for healing after MI. In addition to macrophage marker analysis, α -SMA staining was performed to establish and compare myofibroblast activity between experimental groups.

RESULTS: The highest survival rate was observed in the group that consumed white wine (72.2%), while the lowest was in the group that drank only water (47.8%). No statistically significant difference in survival rate was found between the groups that consumed ethanol solution and water. Analysis of the volumes of consumed beverages indicated that lower amounts of ethanol solution were associated with higher survival rates. Conversely, none of the rats that consumed around 10 mL or more of white wine daily died during the same period. Immunofluorescent analysis focused on four zones around the infarcted area: subepicardial, subendocardial, and two periinfarct zones. The highest ratios of CD163 and CD68 positive macrophages were recorded in the group consuming white wine across all analyzed zones. Regarding the α -SMA expression, the lowest average values were found in the wine

group across all zones. However, statistical significance was established only between the wine and control groups in the periinfarct zone.

CONCLUSION: The conclusion of the study was that moderate consumption of white wine improves survival after MI, likely due to its non-alcoholic components. Consuming a higher amount of aqueous ethanol solution is associated with higher mortality in animals, suggesting an upper limit to the protective effects of this alcoholic beverage. No animals died consuming higher amounts of white wine suggesting that wine provides additional protective benefits that exceed those of ethanol alone.

Within the proliferative phase of healing, an increased infiltration of anti-inflammatory versus pro-inflammatory macrophages was observed in animals that consumed white wine compared to those that drank an aqueous ethanol solution and the control animals. The analysis also showed a reduced expression of the α -SMA marker in the periinfarct zone in animals that consumed white wine, and the effect was especially pronounced in the periinfarct zone. These results indicate that white wine contains ingredients that further support the healing process and reduce excessive tissue fibrosis compared to the other two groups.

Overall, the research underlying this doctoral thesis shows that moderate consumption of white wine improves survival and promotes healing after a MI through mechanisms that go beyond the effects of ethanol alone, likely due to its non-alcoholic bioactive compounds.

KEYWORDS: myocardial infarction, rat, white wine, ethanol/water solution, mortality, CD163, CD68, α -SMA

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Danica Boban (djevojačko: Ivanković)

Adresa: Getaldićeva 23, 21000 Split

Elektronička pošta: danica.boban@mefst.hr

Državljanstvo: Hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 06.03.1991.

Udata, majka troje djece

IZOBRAZBA

- 2005-2009 Opća gimnazija, Srednja škola fra Andrije Kačića Miošića, Makarska
- 2009-2015 Medicinski fakultet u Zagrebu
- 8/2013-9/2013 Studentska asistentica na odjelu za gastroenterologiju, Wilhelm-Anton Hospital, Goch, Okrug Kleve, Njemačka
- 11/2015-4/2016 Pripravnički staž, KBC Sestre milosrdnice, Zagreb,
- 4/2016 Stručni ispit (licenca doktorice medicine), Zagreb
- 7/2016-10/2016 Doktorica u TIM1, Hitna pomoć, Ispostava Makarska, Zavod za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije, Hrvatska
- 2016-DANAS Asistentica na Katedri za anatomiju, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Sveučilište u Splitu
- 2017-DANAS Doktorski studij Klinička medicina utemeljena na dokazima (Evidence based medicine – EBM), Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

MATERINSKI JEZIK

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

- Engleski jezik
- Njemački jezik

OSTALE AKTIVNOSTI

- 2016-2019 Suradnica/Istraživačica na projektu HRZZ 8652 “Biological effects of wine: the influence of vinification technology, dealcoholisation and aging of wine”, voditelj projekta: prof. dr. sc. Mladen Boban, dr. med.
- Održavanje studentskih tečajeva za kirurško šivanje, Medicinski fakultet, Split
- 2016-DANAS članica HLK (Hrvatska liječnička komora)
- 2017-2021 članica HDM (Hrvatsko društvo morfologa)
- 2016 licencirana predavačica Prve pomoći, Hrvatski crveni križ, Zagreb
- 2012-2015 demonstratorica na Katedri za patofiziologiju, Medicinski fakultet, Zagreb

VJEŠTINE

- Microsoft Office, Programski jezici: Pascal, Basic, ImageJ, Photoshop,
- Vozačka dozvola, B kategorija

PUBLICIRANI RADOVI

1. Boban, D., Grković, I., Dželalija, A.M., Gujinović, D., Mudnić, I. & Boban, M. The effects of white wine and ethanol consumption on the proliferative phase of repair after a surgically induced myocardial infarction in rats. (under review)

2. Boban, D., Dželalija, A. M., Gujinović, D., Benzon, B., Ključević, N., Boban, Z., Mudnić, I., & Grković, I. (2023). Differential Effects of White Wine and Ethanol Consumption on Survival of Rats after a Myocardial Infarction. *Applied Sciences*, 13(3), 1450. <https://doi.org/10.3390/app130314502>.

2. Milat, A. M., Mudnić, I., Grković, I., Ključević, N., Grga, M., Jerčić, I., Jurić, D., **Ivanković, D.**, Benzon, B., & Boban, M. (2017). Effects of White Wine Consumption on Weight in Rats: Do Polyphenols Matter?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8315803. <https://doi.org/10.1155/2017/8315803>

3. Ključević, N., **Boban, D.**, Milat, A. M., Jurić, D., Mudnić, I., Boban, M., & Grković, I. (2019). Expression of Leukocytes Following Myocardial Infarction in Rats is Modulated by Moderate White Wine Consumption. *Nutrients*, 11(8), 1890. <https://doi.org/10.3390/nu11081890>