Izražaj adhezijskih molekula na granulocitima i monocitima nakon infarkta miokarda kod štakora koji su konzumirali bijelo vino te na tumorskim staničnim linijama nakon tretmana inhibitorom fosfolipaze C

Mastelić, Angela

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:064526

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Angela Mastelić

IZRAŽAJ ADHEZIJSKIH MOLEKULA NA GRANULOCITIMA I MONOCITIMA NAKON INFARKTA MIOKARDA KOD ŠTAKORA KOJI SU KONZUMIRALI BIJELO VINO TE NA TUMORSKIM STANIČNIM LINIJAMA NAKON TRETMANA INHIBITOROM FOSFOLIPAZE C

Doktorski rad

Split, 2020.

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

VODITELJ RADA: prof. dr. sc. Anita Markotić

Doktorska disertacija je izrađena u sklopu HRZZ 8652 projekta, „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“ voditelja prof. dr. sc. Mladena Bobana, projekta MZOŠ RH 216-2160133-0066 „Patobiokemija glikosfingolipidnih antigena“ voditeljice prof. dr. sc. Anite Markotić te dijelom iz sredstava za namjensko višegodišnje institucijsko financiranje znanstvene djelatnosti MZO RH.

ZAHVALA

Od sveg srca hvala mojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Markotić na njenom vodstvu, strpljivosti i neizmjernoj pomoći pri izradi ove doktorske disertacije.

Na svemu, veliko hvala izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić.

Posebno hvala prof. dr. sc. Mladenu Bobanu na pruženoj prilici za izradu ovog rada.
Posebno hvala i prof. dr. sc. Ivici Grkoviću.

Na iznimnoj pomoći, hvala izv. prof. dr. sc. Ivani Mudnić i dr. sc. Benjaminu Benzonu.

Hvala i doc. dr. sc. Nikolini Režić Mužinić.

Hvala „ekipi iz štale“: dr. sc. Ani Mariji Dželalija, dr.sc. Benjaminu Benzonu, Danici Boban, dr. med., dr. sc. Diani Jurić, Miji Grga-Škaro, mag. i dr.sc. Nikoli Ključeviću.

Zahvaljujem članicama stručnog povjerenstva izv. prof. dr. sc. Ivani Novak Nakir, prof. dr. sc. Tatijani Zemunik i doc. dr. sc. Tihani Boraska Jelavić koje su svojim komentarima i prijedlozima obogatile izvornu verziju.

Hvala voditeljima studija prof. dr. sc. Damiru Sapunaru i prof. dr. sc. Liviji Puljak te Juliji Pusić i Ines Matutinović iz Službe za poslijediplomske studije.

Na svemu hvala mojim kemičarkama i biokemičarkama.

Hvala mojim dragim prijateljicama i prijateljima te svima koji su na bilo koji način pomogli da moja doktorska disertacija ugleda svjetlo dana.

Mojim ljubljenim roditeljima, sestri i bratu, koji su mi stalna podrška i oslonac u životu, veliko hvala!

I na kraju, hvala Njemu bez Kojega ničega od ovoga ne bi bilo…

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Imunološki sustav	2
1.1.1.	Uloga imunološkog sustava u upalnom procesu	3
1.1.2.	Ekstravazacija leukocita do mjesta upale	4
1.1.3.	Ekstravazacija trombocita u infarcirano srčano tkivo	5
1.2.	Građa i funkcija adhezijskih molekula	7
1.2.1.	Građa leukocitnog liganda endotelnog selektina CD15s	8
1.2.2.	Građa leukocitnog liganda međustanične adhezijske molekule CD11b	8
1.2.3.	Građa leukocitnog receptora za hijaluronat izvanstaničnog matriksa CD44	9
1.3.	Građa i uloga gangliozida GM3 u plazma membranama	10
A.1.4.	Infarkt miokarda	11
A.1.4.1.	Cijeljenje srca zahvaćenog infarktom	12
A.1.4.2.	Vino i infarkt miokarda	16
B.1.4.	Tumori	20
B.1.4.1.	Trostruko negativni rak dojke i njegova stanična linija	20
B.1.4.2.	Rak prostate neovisan o androgenima i njegova stanična linija	23
B.1.4.3.	Matične stanice raka	24
B.1.4.4.	Fosfolipaza C kao ciljna molekula u terapiji tumora	26
2.	CILJEVI I HIPOTEZE	28
A.2.1.	Ciljevi istraživanja na modelu infarkta miokarda	29
A.2.2.	Hipoteze istraživanja na modelu infarkta miokarda	29
B.2.1.	Ciljevi istraživanja na staničnim modelima raka	30
B.2.2.	Hipoteze istraživanja na staničnim modelima raka	30
3.	MATERIJALI I METODE	31
A.3.1.	Pokusne životinje za model infarkta miokarda	32
A.3.2.	Postupci pri istraživanju na modelu infarkta miokarda	33
A.3.2.1.	Priprema životinja za operaciju	34
A.3.2.2.	Izazivanje infarkta miokarda	34
A.3.2.3.	Protočna citometrija	34

A.3.3.	Statistička analiza rezultata pokusa na modelu infarkta miokarda	35
B.3.1.	Stanične linije i novosintetizirani inhibitor	36
B.3.2.	Određivanje metaboličke aktivnosti stanica MTT testom	37
B.3.3.	Istraživanje biokemijskog mehanizma djelovanja inhibitora	39
B.3.3.1.	Određivanje postotka apoptotskih stanica	40
B.3.3.2.	Određivanje matičnih stanica i staničnog izražaja CD15s i GM3(NeuAc)	40
B.3.4.	Statistička analiza rezultata pokusa na staničnim linijama raka	41
4.	REZULTATI	42
A.4.	Štakorski model infarkta miokarda	43
A.4.1.	Odabir pojedinih leukocitnih subpopulacija u citogramu	43
A.4.2.	Veliki monociti	44
A.4.3.	Monociti	48
A.4.4.	Granulociti	51
B.4.	Stanični modeli raka	54
B.4.1.	Citotoksično djelovanje inhibitora ovisno o vremenu i koncentraciji	54
B.4.2.	Karakterizacija apoptotskih stanica	57
B.4.3.	Djelovanje inhibitora na postotak matičnih stanica raka	58
B.4.4.	Djelovanje inhibitora na izražaj GM3(NeuAc) na matičnim stanicama raka i na postotak GM3(NeuAc)+ subpopulacije matičnih stanica raka	59
B.4.5.	Djelovanje inhibitora na izražaj CD15s i na postotak CD15s+ subpopulacije matičnih stanica raka	61
5.	RASPRAVA	63
A.	Štakorski model infarkta miokarda	64
B.	Stanični modeli raka	68
6.	ZAKLJUČCI	73
7.	LITERATURA	75
8.	SAŽETAK	95
9.	SUMMARY	97
10.	ŽIVOTOPIS	99

POPIS OZNAKA I KRATICA

ALDH1A1	član A1 obitelji aldehid dehidrogenaze (engl. *aldehyde dehydrogenase family 1 member A1*)
α-SMA	α-aktin glatkih mišića (engl. *α-smooth muscle actin*)
ATP	adenozin-trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)
Bcl-2	protein kodiran genom „B-cell lymphoma/leukemia-2“, ključni regulator apoptoze, otkriven pri istraživanju non-Hodgkinova limfoma B-stanica (engl. *B-cell Leukemia 2*)
BL	neoperirani štakori (engl. *baseline*)
C	kontrolni štakori (engl. *control*)
CD	razlikovna skupina (engl. *cluster of differentiation*)
CI	interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)
CSC	matične stanica raka (engl. *cancer stem cells*)
DAG	diacilglicerol
DAMP	molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (engl. *damage associated molecular patterns*)
DMSO	dimetilni sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)
EGF	epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor*)
EMT	epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *epithelial-mesenchymal transition*)
ER	estrogenski receptor
FBS	fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)
FGF	fibroblastni čimbenik rasta (engl. *fibroblast growth factor*)
FMO	obojenje svim protutijelima osim jednim (engl. *fluorescence minus one)*
GI50	inhibicija rasta polovine populacije stanica (engl. *the 50% growth inhibition*)
GPCR	receptor povezan s G proteinom (engl. *G protein coupled receptor*)
HA	hijaluronska kiselina (engl. *hyaluronic acid*)
HDL-C	kolesterol iz lipoproteina visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein cholesterol*)
HER2	receptor 2 ljudskog epidermalnog čimbenika rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)
HMGB1	protein visoke pokretljivosti skupine 1 (engl. *high mobility group box 1*)
HPLC	kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)
HSP	protein toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*)
ICAM	međustanična adhezijska molekula (engl. *intercellular adhesion molecule*)

IC50	koncentracija koja smanjuje preživljenje stanica za 50% (engl. *the half maximal inhibitory concentration*)
IHD	ishemijska bolest srca (engl. *ischemic-hart disease*)
IL-1	interleukin-1
IP_3	inozitol-1,4,5-trifosfat (engl. *Inositol 1,4,5-Trisphosphate*)
IQR	interkvartilni raspon (engl. *Interquartile Range*)
LC	tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)
LDL-C	kolesterol iz lipoproteina niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein cholesterol*)
LFA-1	ili CD11aCD18, leukocitni funkcijski antigen 1 (engl. *leukocyte function-associated antigen-1*)
LHRH	hormon oslobađanja luteinizirajućeg hormona (engl. *luteinizing hormone-releasing hormone*)
LOX	lizil oksidaza (engl. *lysyl-oxidase*)
MAP kinaze	mitogenom aktivirane protein kinaze
MHC	molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)
MCP-1	monocitni kemotaktični protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*)
MI	infarkt miokarda (engl. *myocardial infarction*)
MMPs	metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*)
NK stanice	stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*)
PKC	protein kinaza C
PLC	fosfolipaza C
PIP_2	fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)
PR	progesteronski receptor
RAGE	receptor za glikacijske produkte (engl. *receptor for advanced glycation end products*)
Ras	protoonkogen, nazvan po otkriću transformirajućeg načela virusa štakorskog sarkoma (engl. *rat sarcoma*)
Rap	protein povezan s Ras-om (engl. *Ras-related protein*)
ROS	reaktivni kisikovi oblici (engl. *reactive oxygen species*)
RTK	receptorske tirozin kinaze
SH	prividno operirani štakori (engl. *sham*)
TCR	receptor T-stanica (engl. *T-cell receptor*)

TGF-β	transformirajući čimbenik rasta *β* (engl. *transforming growth factor β*)
TGI	potpuna inhibicija rasta (engl. *total growth inhibition*)
TLR	receptori slični Toll-u (engl. *Toll-like receptor*)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)
VCAM	vaskularna adhezijska stanična molekula (engl. *vascular cell adhesion molecule*)
VEGF	čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*)
vHTS	probir na osnovu računalnog modeliranja metodom vHTS (engl. *virtual high throughput screen*)
W	ispitna skupina (engl. *wine*)
VE	krvožilni endotel (engl. *vascular endothelium*)

1. UVOD

1.1. Imunološki sustav

Fiziološka je funkcija imunološkog sustava obrana od infektivnih mikroorganizama kao i odgovor na neinfektivne tvari. Imunološki sustav razlikuje se od ostalih tkivnih sustava po stalnom i reguliranom kretanju njegovih glavnih dijelova kroz krv, iz krvi u tkiva te iz tkiva u krv. Neke imunološke stanice prelaze iz krvi u ozlijeđeno ili zaraženo tkivo uklanjajući patogene, mrtvo tkivo te popravljajući oštećenje.

Imunost može biti prirođena (nativna) ili stečena (adaptivna). Nadalje, obje imunosti se mogu podijeliti na humoralnu i staničnu imunost. Prvu liniju obrane od mikroorganizama predstavljaju epitelne barijere i koža. Prirođena imunost predstavlja drugu liniju obrane, koju u staničnom dijelu čine leukociti sa sposobnošću fagocitoze i s izražajem receptora za karakteristične molekule mikroorganizama (primjerice neutrofili, makrofagi i dendritične stanice), potom nefagocitni leukociti (primjerice bazofili, eozinofili i mastociti) i stanice prirodne ubojice, NK stanice (od engl. *natural killer cells*). Topljivi cirkulirajući proteini (npr. komplement), citokini i kemokini (glikoproteini koji aktiviraju i koordiniraju mnoge aktivnosti stanica prirođene imunosti) su komponente humoralne prirođene imunosti.

Za razliku od prirođene imunosti, stečena je imunost obilježena iznimnom specifičnošću za određene makromolekule i imunološkim pamćenjem tj. sposobnošću brzog i jakog odgovora na ponovljeno izlaganje istom uzročniku. Imunološki odgovor stečene imunosti obuhvaća neke komponente humoralne imunosti koja je posredovana protutijelima te staničnu imunost koja je posredovana stanicama, prvenstveno limfocitima koji su mononuklearne stanice raznolikih imunoloških funkcija. Limfociti iz koštane srži ili timusa odlaze u sekundarne limfne organe gdje prepoznaju antigene te se diferenciraju u izvršne limfocite koji odlaze na mjesta zaraze. Limfociti B se, nakon prepoznavanja topljivih antigena ili antigena na površinama stanica te nakon afinitetnog sazrijevanja u limfnim čvorovima, diferenciraju u plazma stanice koje proizvode protutijela koja prepoznaju nativne antigene mikroorganizama, neutraliziraju njihovu infektivnost i označavaju ih za uklanjanje. Limfociti T sazrijevaju u timusu, cirkuliraju krvlju, naseljavaju sekundarna limfna tkiva te bivaju privučeni na periferna mjesta gdje se izlažu antigenima na antigen prezentirajućim stanicama. Za razliku od limfocita B, limfociti T prepoznaju peptidne dijelove proteinskih antigena prikazane na drugim stanicama te pomažu fagocitima uništiti mikroorganizme ili neposredno ubijaju inficiranu stanicu. Razlikujemo nekoliko vrsta limfocita T; pomagačke (CD4+), citotoksične (CD8+) i regulatorne (CD4+FOXP3+). Pomagački limfociti T prepoznaju antigene na površini antigen prezentirajućih stanica i izlučuju citokine koji stimuliraju proliferaciju i diferencijaciju

limfocita T te aktiviraju druge stanice (primjerice B-stanice i makrofage). Citotoksični limfociti T prepoznaju antigene na inficiranim stanicama te ih ubijaju, a ubijaju i tumorske stanice, dok regulatorni limfociti T zaustavljaju imunološki odgovor. NK stanice prepoznaju ograničeniji broj antigena te ubijaju inficirane kao i tumorske stanice.

Citokini posreduju u prirođenoj i stečenoj imunosti. Obuhvaćaju veliku heterogenu skupinu proteina koji su proizvedeni u različitim stanicama. Jedan citokin može djelovati na više stanica i na različite načine (pleiotropnost). Osim toga, više citokina može djelovati na isti način (redundancija). Citokini mogu djelovati antagonistički ili sinergistički. Većina citokina ima autokrino ili parakrino djelovanje. Ukoliko su proizvedene velike količine citokina, mogu ući u krvotok te djelovati i endokrino (1).

1.1.1. Uloga imunološkog sustava u upalnom procesu

U slučaju tkivne ozljede ili zaraze, razvija se akutna upala koja uključuje nakupljanje leukocita, plazmatskih proteina (proteini komplementa, protutijela i proteini akutne faze) i tekućine u izvanžilnom tkivu na mjestu ozljede. Proupalni citokini i mali molekularni posrednici stvoreni na podražaj molekularnim obrascima povezanima s patogenima, PAMP-ovima (od engl. *pathogen associated molecular patterns*) ili molekularnim obrascima oštećenja, DAMP-ovima (od engl. *damage associated molecular patterns*) potiču povećanje dotoka krvi u tkivo (uslijed dilatacije arteriola), propusnosti kapilara i venula za plazmatske proteine i tekućinu te adhezivnosti cirkulirajućih leukocita za endotelnu površinu venula. Na mjesto upale najprije se novače neutrofili, a potom slijede monociti koji u tkivu prelaze u tkivne makrofage. Makrofagi i ostale tkivne stanice u području ozljede luče citokine koji aktiviraju endotelne stanice te se na njima povećava izražaj adhezijskih molekula i kemokina.

Kemokini su kemotaktični citokini te su ključni za privlačenje cirkulirajućih leukocita iz krvnih žila u izvanžilne prostore. Radi se o polipeptidima mase 8-10 kDa s dvije unutarnje disulfidne petlje koji su podijeljeni u četiri porodice na temelju broja i smještaja N- terminalnih cisteinskih ostataka. Kod porodice CC, dva cisteinska ostatka smještena su jedan do drugoga, dok su kod CXC porodice, dva cisteinska ostatka razdvojena jednom aminokiselinom. Kemokini C porodice sadrže samo jedan cistein dok kemokini CX_3C porodice sadrže dva cisteina razdvojena trima aminokiselinama. Novačenje neutrofila posredovano je uglavnom CXC kemokinima, novačenje monocita CC kemokinima, a novačenje limfocita CXC i CC kemokinima (2).

Neutrofili su najbrojniji leukociti. Njihova se jezgra sastoji od 3-5 međusobno povezanih režnjeva. Stanice imaju brojne membranske izdanke, a u citoplazmi sadrže specifične i azurofilne granule. Specifične granule ispunjene su enzimima lizozimom, kolagenazom i elastazom, dok su azurofilne granule lizosomi ispunjeni dodatnim hidrolitičkim enzimima i tvarima (defenzini i katelicidini) koje služe za ubijanje mikroorganizama (2). Dolaskom na mjesto ozljede, neutrofili razgrađuju izvanstanični matriks, fagocitiraju nekrotično tkivo „čisteći" mjesto ozljede, proizvode reaktivne kisikove oblike, ROS (od engl. *reactive oxygen species*) te otpuštaju kemotaktične čimbenike za monocite (3).

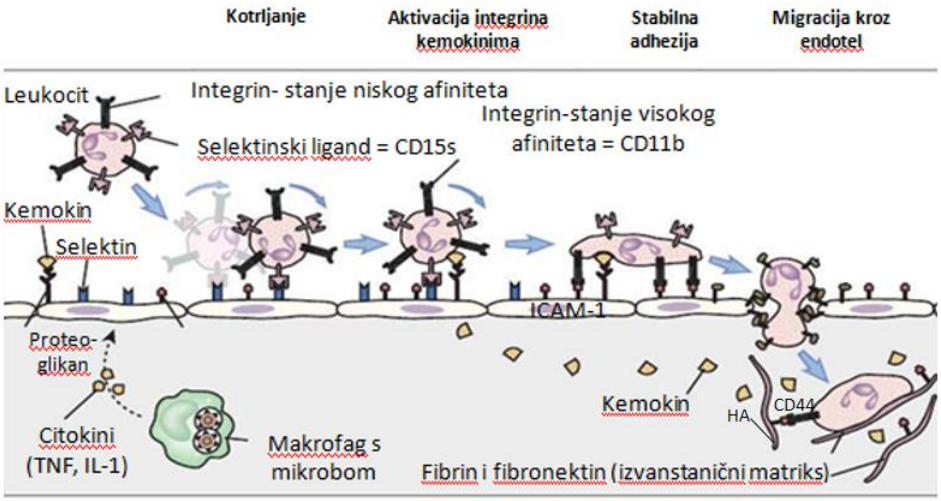
Monociti imaju graholiku jezgru i fino zrnatu citoplazmu s lizosomima, fagocitnim vakuolama i citoskeletnim filamentima. Razlikuju se prema površinskim staničnim biljezima i funkciji. Klasični monociti su proupalni te ih kod ljudi karakterizira jak izražaj biljega CD14 i neizražaj CD16, odnosno jak izražaj Ly6c kod miševa. Neklasični monociti pridonose popravku tkiva nakon ozljede, a karakterizira ih $CD14^{+}CD16^{++}$ fenotip kod ljudi, odnosno slab izražaj Ly6c kod miševa. Kod ljudi postoji i prijelazna populacija ($CD14^{++}CD16^{+}$).

Makrofagi imaju različite uloge, a ovisno o vrsti aktivirajućeg podražaja, mogu poprimiti različita funkcijska obilježja. Fagocitiraju i ubijaju mikroorganizme reaktivnim oblicima kisika i dušika te proteolitičkom razgradnjom. Osim toga, fagocitiraju i mrtve stanice tkiva i neutrofile te izlučuju citokine koji djeluju na endotelne stanice krvnih žila potičući dolazak još većeg broja monocita i drugih leukocita na mjesto ozljede. Protuupalni makrofagi potpomažu cijeljenje oštećenog tkiva potičući angiogenezu i fibrozu (2).

1.1.2. Ekstravazacija leukocita do mjesta upale

Na mjestima infekcije, makrofagi i dendritične stanice koje su naišle na mikrobe proizvode proupalne citokine, čimbenik tumorske nekroze, TNF (od engl. *tumor necrosis factor*) i interleukin-1, IL-1, potičući aktivaciju endotelnih stanica koje oblažu postkapilarne venule. Krvne žile se šire, usporava se protok krvi što potiče marginaciju leukocita odnosno njihovo približavanje žilnoj stijenci. Aktivirane endotelne stanice izražavaju selektine za koje se prvo adherira leukocitni CD15s. Budući da su početna međudjelovanja stanica i endotela slabog afiniteta, a protjecanje krvi se nastavlja, leukociti se ponavljano razdvajaju i ponovno vežu za endotel te se tako kotrljaju po njemu (Slika 1). Istovremeno međudjelovanje leukocita s kemokinom vezanim za proteoglikan endotelne membrane, potiče snažnije vezanje leukocitnih integrina za ligande na endotelnoj površini. Povećan izražaj tih liganada (VCAM-

1, ICAM-1) prethodno je bio potaknut citokinima jednako kao i izražaj leukocitnih integrina (VLA-4, LFA-1 i Mac-1). Čvršće vezanje za endotel uzrokuje reorganizaciju leukocitnog citoskeleta, leukocit se proširuje po endotelnoj površini te u konačnici izlazi iz krvne žile paracelularnom transmigracijom. Transmigraciji prethodi aktivacija kinaza (potaknuta vezanjem integrina za endotel) koje fosforiliraju citoplazmatski rep VE-kadherina čime se reverzibilno prekida adhezijski kompleks tj. veza između dviju endotelnih stanica. Pri tome se kratkotrajno i reverzibilno raskidaju adhezijski spojni proteini (od engl. *adherent junction proteins*) prije svega proteini krvožilnog endotela tj. VE (od engl. *vascular endothelial*)-kadherinski kompleksi. Leukocit se provlači između rubova endotelnih stanica. Rjeđe se može zapaziti transcelularna migracija tj. prolazak leukocita kroz endotelne stanice (2).

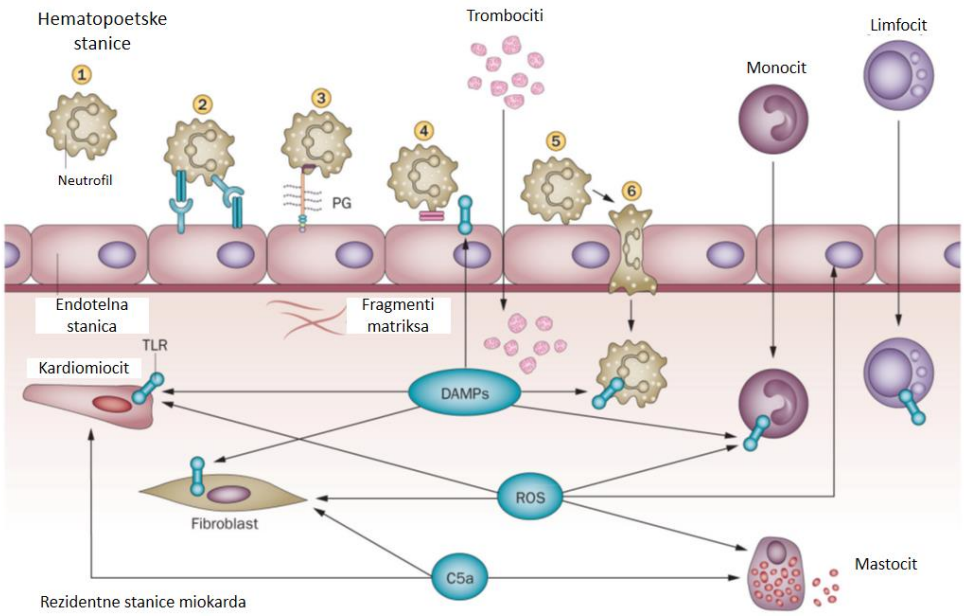


Slika 1. Slijed događaja u migraciji leukocita do mjesta upale. Na mjestima infekcije, makrofagi i dendritične stanice koje su naišle na mikrobe proizvode citokine koji aktiviraju endotelne stanice obližnjih venula te ove stanice proizvode selektine. Selektini posreduju u slabom prianjanju i kotrljanju leukocita po endotelu, integrini posreduju njihovu čvrstu adheziju, a kemokini aktiviraju leukocitne integrine te potiču njihovu migraciju kroz endotel na mjesto infekcije. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Abbas; Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System (2).

1.1.3. Ekstravazacija trombocita u infarcirano srčano tkivo

Upalna reakcija razvija se i u miokardu zahvaćenom infarktom jer dolazi do otpuštanja DAMP-ova i ROS-a te aktivacije receptora sličnih Toll-u,TLR, (od engl. *Toll like receptor*) i komplementa. DAMP-ovi aktiviraju endotelne stanice kao i neutrofile, monocite, kardiomiocite

i fibroblaste (Slika 2). U upali mogu sudjelovati umirući i preživjeli kardiomiociti, endotelne stanice, rezidentni srčani fibroblasti, mastociti srčanog tkiva te unovačeni neutrofili, monociti i trombociti. P-selektin je, osim u Weibel–Paladeovim tjelešcima endotelnih stanica, pohranjen i u membranama granula trombocita. Medijatori kao što su trombin i histamin potiču brzo raspoređivanje P-selektina na plazma membrani trombocita koji potom međudjeluju s neutrofilima tijekom adhezije na endotel, vezivanjem svojeg P-selektina za neutrofilni selektinski ligand PSGL-1 (4,5).



Slika 2. Upalni odgovor nakon infarkta miokarda. 1-hvatanje leukocita; 2-kotrljanje leukocita; 3-aktivacija kemokinima; 4- adhezija u kojoj sudjeluju i trombociti; 5- stabilna adhezija; 6- transmigracija (provlačenje između rubova endotelnih stanica).

Kratice: DAMPs (od engl. *damage associated molecular patterns*); TLR- receptor sličan Toll-u (od engl. *Toll-like receptor*); ROS- reaktivni kisikovi oblici (od engl. *reactive oxygen species*); PG – proteoglikan; C5a komponenta komplementa.
Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Nikolaos G. Frangogiannis, The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling (5).

Nadalje, trombociti se nakupljaju u miokardu zahvaćenom infarktom te mogu biti važni za upalnu reakciju otpuštanjem citokina i kemokina (MCP-1, IL-8, TGF-β) te moduliranjem fenotipa drugih stanica (5,6). Osim toga, trombin potiče trombocite i na lučenje tromboksana koji dodatno pojačavaju upalnu reakciju (7).

Doprinos optimalne upalne reakcije cijeljenju srčanog tkiva, nakon infarkta miokarda, opisan je detaljno u poglavlju A.1.4.1. Cijeljenje srca zahvaćenog infarktom.

1.2. Građa i funkcija adhezijskih molekula

Adhezijske molekule su površinski proteini, glikoproteini i glikolipidi koji posreduju međudjelovanje stanica i izvanstaničnog matriksa. Većina adhezijskih molekula su transmembranski proteini koji imaju citoplazmatsku, transmembransku i izvanstaničnu domenu (8,9). Ovisno o razlikama u građi te ligandima za koje se vežu, mogu se podijeliti u različite obitelji: adhezijske molekule slične imunoglobulinima, selektini, integrini te kadherini (10).

Imunoglobulinska superobitelj sadrži barem jednu imunoglobulinsku ili imunoglobulinu sličnu domenu, a većina članova su transmembranski proteini tipa I s izvanstaničnom (sadrži Ig domenu ili domene) i transmembranskom domenom te citoplazmatskim repom. U ovu skupinu spadaju primjerice molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, MHC I i II (od engl. *major histocompatibility complex*), proteini kompleksa receptora T-stanica, TCR (od engl. *T-cell receptor*), te međustanična adhezijska molekula, ICAM (od engl. *intercellular adhesion molecule*) i vaskularna adhezijska stanična molekula,VCAM (od engl. *vascular cell adhesion molecule*) (8,11).

Selektini vežu ugljikohidratne ostatke te su odgovorni za početni korak u slabo–afinitetnoj adheziji cirkulirajućih leukocita na endotelni sloj postkapilarnih venula. Endotelne stanice izražavaju P-selektin (CD62P; CD (razlikovna skupina; od engl. *cluster of differentiation*) i E-selektin (CD62E). L-selektin (CD62L) je izražen na leukocitima, ali ne i na endotelnim stanicama. Ligandi koji se vežu za E-selektin i P-selektin su sijalizirane ugljikohidratne skupine srodne obitelji Lewis X ili Lewis A. Ligandi L-selektina su sijalomucini na endotelnim stanicama (9).

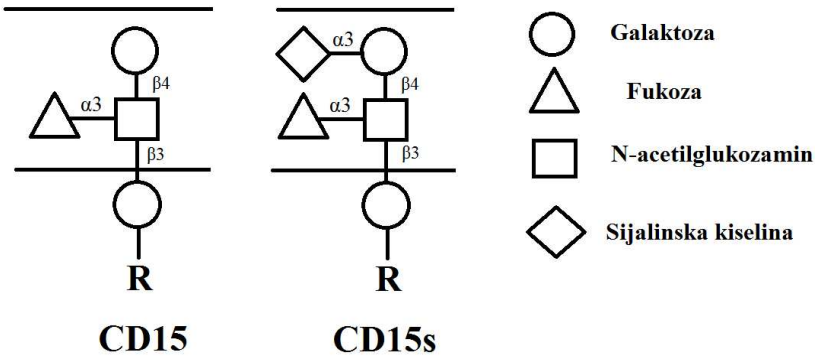
Integrini su heterodimerni proteini na staničnoj površini građeni od dvaju nekovalentno povezanih polipeptidnih lanaca. Imaju sposobnost odgovora na unutarstanične signale tako što ubrzano povećavaju svoj afinitet za vlastite ligande. Kemokini izazivaju stvaranje nakupina integrina na staničnoj membrani. Integrin CD11aCD18 ili leukocitni funkcijski antigen 1, LFA-1 (od engl. *leukocyte function-associated antigen-1*) vezuje se za ICAM-1 endotelnih stanica. Integrin Mac-1 (CD11bCD18) na cirkulirajućim leukocitima također se veže za ICAM-1 i posreduje prianjanju na endotel (9).

Kadherini su glavne molekule uključene u adheziju stanica-stanica te imaju važnu ulogu u diferencijaciji tkiva. Za vrijeme diferencijacije te u nekim bolestima, količina ili priroda kadherina se mijenja što utječe na različite aspekte adhezije stanice na stanicu te na staničnu

migraciju. Primjerice, metastaziranje je povezano s gubitkom kadherina na staničnoj površini (8).

1.2.1. Građa leukocitnog liganda endotelnog selektina CD15s

CD15s je glikokonjugatni selektinski ligand odgovoran za početno slabo vezanje leukocita za aktivirane endotelne stanice (1). Neaktivirani neutrofili i monociti imaju jak izražaj biljega CD15, dok aktiviranje upalnog odgovora povećava izražaj njihova biljega CD15s, kao i izražaj E-selektina na plazma membranama endotelnih stanica (12). Moguće je zapaziti i povećanje veličine monocita (13), jer su prepunjeni sekretornim mješinicama koje dovode CD15s na njihovu površinu (14). Građa glikokonjugata CD15s razlikuje se u odnosu na CD15 u samo jednom šećernom ostatku – sijalinskoj kiselini (Slika 3) (12) .



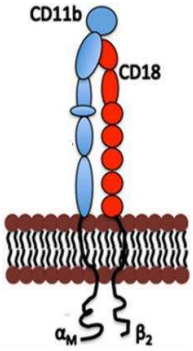
Slika 3. Građa CD15 i CD15s glikokonjugatnih liganada. R predstavlja N- ili O-glikan vezan za integralni membranski protein, a kod glikolipidnih liganada R je ceramid vanjskog jednosloja plazma membrane. Prema: Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors (12).

1.2.2. Građa leukocitnog liganda međustanične adhezijske molekule CD11b

CD11b se nekovalentno veže s CD18 stvarajući funkcionalni integrinski heterodimer CD11b/CD18 poznat i kao Mac-1 (1,15) (Slika 4). Integrin CD11b primarno je izražen na neutrofilima, monocitima, makrofagima, dendritičkim stanicama, NK stanicama te subpopulacijama B i T stanica (16–20). Veže se za različite ligande uključujući obitelj

međustanične adhezijske molekule te je važan u posredovanju adhezije leukocita, migraciji i novačenju u tkiva (21).

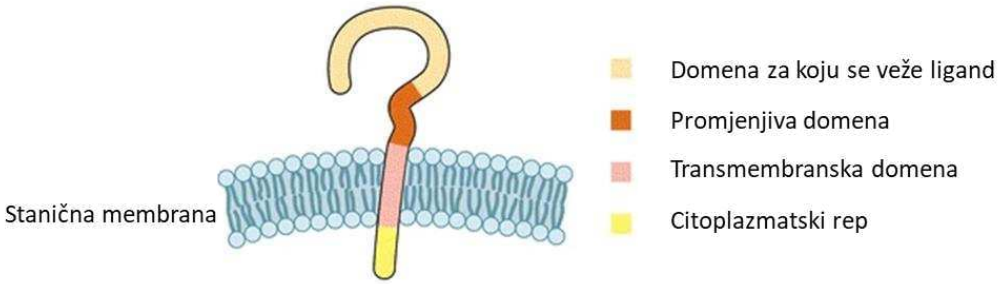
Većina kompleksa CD11b/CD18 je kod mirujućih ljudskih neutrofila pohranjena i uklopljena u membrane specifičnih granula i sekretornih vezikula. Nakon stimulacije neutrofila, dolazi do pojačanog spajanja vezikula s plazma membranom i time povećanja izražaja CD11b na njihovoj površini (22).



Slika 4. Integrin CD11b u sklopu Mac-1. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Khan i sur. CD11b Activity Modulates Pathogenesis of Lupus Nephritis (20).

1.2.3. Građa leukocitnog receptora za hijaluronat izvanstaničnog matriksa CD44

CD44 je transmembranski glikoprotein (23) (Slika 5). Glavni ligand za CD44 receptor je hijaluronska kiselina ili hijaluronan, HA (od engl. *hyaluronic acid*), odnosno pri fiziološkom pH hijaluronat. Osim toga, CD44 se veže i za osteoponin, kolagen te metaloproteinaze matriksa (od engl. *matrix metalloproteinases* (MMPs) (23,24).



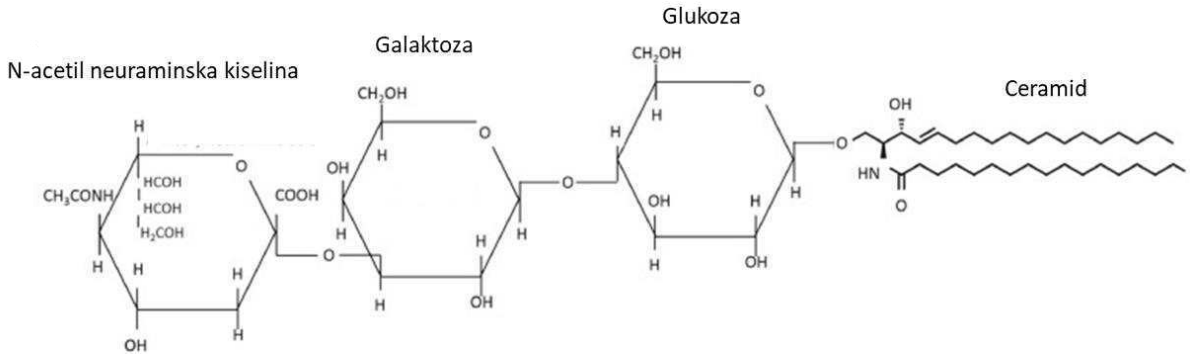
Slika 5. Građa CD44. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Chen i sur. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications (25).

HA je visokomolekularni glikozaminoglikan sastavljen od ponavljajućeg disaharida (N-acetilglukozamina i glukuronske kiseline), a sastavni je dio izvanstaničnog matriksa (26). Međudjelovanje HA i CD44 modulira stanični rast, razvoj, adheziju i migraciju.

CD44 igra važnu ulogu u progresiji raka, upravo zbog učinkovite infiltracije metastatskih stanica u izvanstanični matriks nakon prijelaza iz krvotoka u subendotelni sloj različitih tkiva (25,27). Izražaj CD44, uz istovremeni manjak CD24, definira identitet matičnih stanica raka, CSC (od engl. *cancer stem cells*, CD44+CD24-). Smatra se da CSC doprinose otpornosti na terapiju koju pokazuju različiti tipovi raka, uključujući trostruko negativni rak dojke te rak prostate (28–31).

1.3. Građa i uloga gangliozida GM3 u plazma membranama

Gangliozid GM3 se sastoji od lipida ceramida i šećernih ostataka. Ceramid sadrži nezasićeni dugolančani dvovalentni aminoalkohol sfingozin s amidno vezanom masnom kiselinom. Za sintezu samog sfingozina također je potrebna masna kiselina te aminokiselina serin. Upravo zbog kiselog šećera unutar ukupne molekule, GM3 pripada skupini gangliozida tj. kiselih glikosfingolipida (32). Kiseli šećer koji se pojavljuje u tkivima kralježnjaka je N-acetil neuraminat (NeuAc) ili N-acetil sijalinska kiselina, stoga je preciznija skraćenica GM3(NeuAc) (Slika 6). N-glikolil sijalinska kiselina opisana je kod čovjeka samo u tumorskim stanicama (33).



Slika 6. Građa GM3(NeuAc). Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Labrada i sur. GM3(Neu5Gc) ganglioside: an evolution fixed neoantigen for cancer immunotherapy (33).

GM3 je amfipatska komponenta stanične membrane koja se hidrofobnim lipidnim dijelom sidri u vanjski jednosloj plazma membrane, a hidrofilni dio pruža prema izvanstaničnom prostoru. Sinteza započinje na endoplazmatskoj mrežici te se nastavlja u Golgijevom aparatu dodatkom monosaharidnih ostataka na lipidnu molekulu ceramida. Ove reakcije kataliziraju glikozil transferaze. GM3 sintaza (zvana ST I kao i ST3Gal V, preciznije CMP-NeuAc:laktozilceramid-α2,3-sijalil transferaza) katalizira prijenos NeuAc s CMP-NeuAc na terminalni ostatak galaktoze laktozilceramida (12).

GM3(NeuAc) inhibira tirozin kinaznu aktivnost receptora za čimbenike rasta. Stoga može posredovati inhibiciju proliferacije malignih stanica djelovanjem na čimbenike za epidermalni čimbenik rasta te čimbenik rasta fibroblasta (32).

A.1.4. Infarkt miokarda

Akutni infarkt miokarda, MI (od engl. *myocardial infarction*) jedan je od vodećih uzroka smrtnosti (34,35). Posljednjih nekoliko desetljeća značajno se poboljšala stopa preživljenja pacijenata s akutnim MI, što je rezultiralo većim brojem pacijenata koji imaju rizik od zastoja srca (36,37). Zatajenje srca povezano je s remodeliranjem miokarda. Srčano remodeliranje definirano je kao skupina molekularnih, staničnih i intersticijskih promjena koje se klinički manifestiraju kao promjene u veličini, obliku i funkciji srca uslijed srčane ozljede (38,39).

Akutni infarkt miokarda induciran je iznenadnom blokadom ili okluzijom glavnog ogranka koronarne arterije što dovodi do ishemije i time smrti kardiomiocita (40). Uslijed ishemije mijenja se metabolizam miokarda, smanjuje se stvaranje adenozin trifosfata, ATP-a (od engl. *adenosine triphosphate*) oksidacijskom fosforilacijom te se ubrzava glikoliza. Većinu energije (50-70%) miokard dobiva oksidacijom masnih kiselina pri čemu nastaje velika količina acetil-CoA, inače i prvog produkta aerobnog puta oksidacije piruvata uz enzim piruvat dehidrogenazu. Budući da acetil-CoA inhibira piruvat dehidrogenazu, piruvat se neće oksidacijski dekarboksilirati u acetil-CoA nego će se reducirati u laktat uz laktat dehidrogenazu. Pri tome je reducens NADH, koji se dakle ovom anaerobnom reakcijom oksidira u NAD^+, nužno potrebni koenzim za oksidaciju masnih kiselina, a koji zbog ishemije nije moguće dobiti aerobnom oksidacijom NADH. Dio laktata prelazi u mliječnu kiselinu, a laktat koji preostaje praćen je ekvimolarnim povećanjem protona koje zakiseljuje tkivo (41,42).

Za održavanje strukture i funkcije srca nakon ishemije uzrokovane infarktom, važan je proces autofagije. Izvedena iz grčke riječi αυτός (*„autos“*) i φαγειν (*„phagei“*), autofagija znači „samoproždiranje“, tj. razgradnju nefunkcionalnih, nepotrebnih i oštećenih organela i proteina u lizosomima. Time se dobivaju potrebne stanične molekule i energija za sinteze u uvjetima nedostatka nutrijenata ili drugih oblika staničnog stresa. U fiziološkim uvjetima, autofagija je ključna tijekom razvoja i diferencijacije pojedinih stanica, uključujući i stanice imunološkog sustava (43). Presudna je i u prevenciji različitih bolesti, primjerice neurodegenerativnih bolesti i tumora, čija patogeneza uključuje nakupljanje oštećenih organela ili molekula (44).

Međutim, pretjerana autofagija nakon MI dovodi do nepoželjnog razaranja stanica srčanog tkiva (40). Ljudsko srce sadrži 4 do 5 milijardi kardiomiocita, a uslijed pretjerane autofagije, apoptoze i nekroze može ih izgubiti oko 1 milijardu (36,40,45–47). Budući da srce ima ograničenu moć obnavljanja stanica, unutar područja odumiranja kardiomiocita stvara se fibrozni ožiljak (5).

Cijeljenje srca zahvaćenog infarktom može se podijeliti u tri preklapajuće faze: upalnu, proliferirajuću i fazu zrenja (5). Cijeljenje uvelike ovisi o prodiranju (infiltraciji) neutrofila i monocita u miokard te uklanjanju mrtvih stanica i ostataka matriksa oštećenog tkiva (48).

A.1.4.1. Cijeljenje srca zahvaćenog infarktom

Nekrotične stanice stvaranju DAMP-ove koji potiču prirođeni upalni odgovor djelujući na puteve ovisne o TLR-u i receptoru za glikacijske produkte, RAGE (od engl. *receptor for advanced glycation end products*) (36,49,50). TLR i RAGE putevi pokreću transkripciju proupalnih citokina i kemokina u leukocitima, krvožilnim stanicama i fibroblastima (51–53).

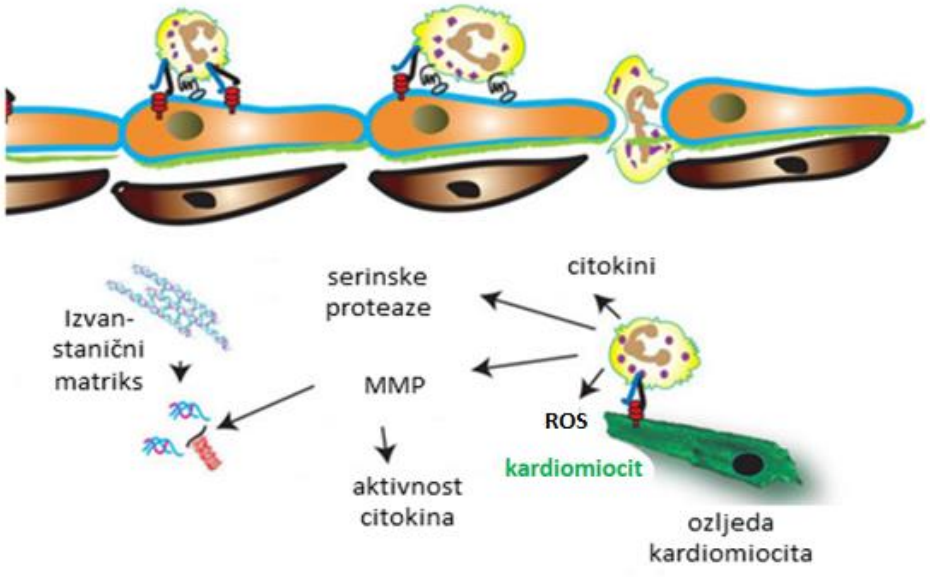
Protein visoke pokretljivosti skupine 1, HMGB1 protein (od engl. *high mobility group box 1*) ključni je inicijator upale kojeg otpuštaju nekrotične stanice kao i aktivirane imunološke stanice (54,55), a veže se za TLR-ove te za RAGE (56). HMGB-1 ima pozitivan učinak na cijeljenje tkiva koordinirajući prelazak makrofaga u fenotip koji djeluje zacjeljujuće, aktivaciju i proliferaciju matičnih stanica te neoangiogenezu (54). Kod miševa s izbačenim genom za TLR9, pokazano je da je TLR9 ključan za HMGB-1 posredovano cijeljenje nakon infarkta miokarda (57). Nekrotične stanice otpuštaju i proteine toplinskog šoka, HSP (od engl. *heat shock protein*) i ATP koji mogu aktivirati imunološki odgovor nakon infarkta miokarda (5,51,58,59).

Na štakorskom modelu infarkta miokarda, prvi put je pokazano da ishemijska ozljeda miokarda može inducirati aktivaciju komplementa (60). Testiranja na zečjem srcu pokazala su da je u području miokarda zahvaćenog infarktom izražaj mRNA i proteina komplementa veći u odnosu na druga područja (61). Aktivacija komplementa može imati važnu posredničku ulogu u regrutiranju neutrofila i monocita u oštećeni miokard (48).

Na mjestu ozljede visoke su koncentracije kemokina, vezanih za glikozaminoglikane endotelne površine i izvanstaničnog matriksa (62,63). Od glikozaminoglikana, koji dolaze vezani u proteoglikanskim molekulama, najznačajniji su hijaluronat i heparan-sulfat (64,65).

Neutrofili su prvi leukociti koji se infiltriraju na mjesto upale (66,67) (Slika 7) gdje fagocitiraju stanične ostatke, stvaraju ROS, razgrađuju izvanstanični matriks otpuštajući metaloproteinaze iz granula te otpuštaju kemotaktične čimbenike za monocite (3). Ma i suradnici predlažu postojanje dviju subpopulacija infiltrirajućih neutrofila: proupalnih i protuupalnih. Dan nakon akutnog infarkta miokarda neutrofili imaju visok izražaj proupalnih biljega dok su neutrofili od 5. do 7. dana protuupalni (68).

ROS, proizvedeni najvećim dijelom u neutrofilima, aktiviraju upalne signale u miokardu. Mogu izravno oštetiti kardiomiocite i vaskularne stanice, a doprinose i infiltraciji leukocita (5). Izazivaju kaskadu izlučivanja kemokina i citokina, koja započinje s TNF-α , poboljšavajući aktivaciju leukocitnih integrina i inducirajući sintezu adhezijskih molekula na endotelnim stanicama (69).



Slika 7. Pobude remodeliranja miokarda. Nakon aktivacije adhezijskih međudjelovanja leukocita i endotelnih stanica, leukociti transmigriraju u miokard zahvaćen infarktom. Neutrofili oslobađaju

serinske proteaze i metaloproteinaze matriksa (MMP) te reaktivne kisikove oblike doprinoseći čišćenju rane. Mogu modulirati upalne odgovore lučenjem citokina te reguliranjem njihove aktivnosti oslobađanjem proteaza. Pretjerano ili dugotrajno djelovanje neutrofila može povećati razgradnju matriksa. Budući da su neutrofili pretežno lokalizirani u infarktnoj graničnoj zoni, pretpostavlja se da se mogu adherirati na žive kardiomiocite djelujući citotoksično. Međutim, o značaju oštećenja kardiomiocita posredovanih leukocitima i dalje se raspravlja. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Prabhu SD i Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis (70).

Signali povezani s oštećenjem (od engl. *damage-associated signals*) kod MI potiču aktivaciju platforme inflamasoma unutar kojeg se aktivira kaspaza-1 koja proteolizom pro-IL-1β aktivira IL-1β u kardiomiocitima, imunološkim stanicama i fibroblastima, što rezultira oslobađanjem aktivnog IL-1β, ključnog posrednika u regulaciji upale i popravka (52,71,72). IL-1 signaliziranje potiče sintezu kemokina te posljedično infiltraciju leukocita (73). Također djeluje i na srčane fibroblaste koji poprimaju proupalni fenotip te luče citokine, kemokine i metaloproteinaze matriksa. Osim toga, IL-1 suprimira sintezu α-aktina glatkih mišića, α-SMA (od engl. *α-smooth muscle actin*) (52). Nakon infarkta miokarda, porast IL-1β praćen je porastom IL-6, što ukazuje da IL-1β inducira IL-6 (74) koji ima proupalne i protuupalne uloge (3). Razina IL-6 raste u akutnom odgovoru na ozljedu te može aktivirati imunološke stanice, upravljati njihovom migracijom, te poticati zacjeljivanje rane potičući transformaciju fibroblasta u miofibroblaste. Akutno, kombinirani učinci proizvodnje IL-6 i signalizacije miocita čuvaju srčano tkivo te se šteta ograničava snižavanjem oksidacijskog stresa i kontraktilnosti stanica i izazivanjem antiapoptotskog programa. Kratkotrajni upalni odgovor je zaštitan, ograničava ozljedu tkiva, dok kronična izloženost IL-6 djeluje štetno budući da IL-6 produljeno snižava kontraktilnost kardiomiocita potičući hipertrofiju srčanog mišića što djeluje nepovoljno te može dovesti do zatajenja srca (75).

Monociti, koji se novače na mjesto upale, nastaju u koštanoj srži i slezeni te mogu biti proupalni i protuupalni tj. reparativni (76). U prvoj fazi prevladavaju proupalni, a u drugoj reparativni monociti (77). Mišji Ly-6c^{visok} proupalni monociti imaju visok izražaj CCL2 receptora za monocitni kemotaktični protein 1, MCP-1 (od engl. *monocyte chemoattractant protein 1*) koji se oslobađa tijekom prve faze nakon infarkta miokarda. Iz Ly-6c^{visok} monocita, u tkivu zahvaćenom infarktom, nastaju proupalni makrofagi M1 koji sudjeluju u razgradnji izvanstaničnog matriksa, uklanjanju odumrlog tkiva te čišćenju mjesta ozljede od staničnih ostataka kao i od apoptotičnih neutrofila (3,76). Apoptotični neutrofili proizvode signale

pronalaženja („*find me*“ signale, npr. lipidne medijatore i nukleotide) te na svojoj površini izražavaju signale za fagocitozu („*eat me*” signale, npr. lizofosfatidilkolin, dakle fosfolipid narušene građe, bez jedne od dviju masnih kiselina koje ga inače sidre u vanjski jednosloj plazma membrane) čime potiču vlastito uklanjanje. Nadalje, aktiviraju protuupalni program u makrofagima M1 poticanjem sinteze i oslobađanja IL-10 i transformirajućeg čimbenika rasta, TGF-β (od engl. *transforming growth factor β*) (78). Ly-6c^{visok} monociti diferenciraju se u Ly-6c^{nizak} makrofage u kasnijim fazama cijeljenja (3,70,79), izražavajući povećano protuupalne, profibrotične i angiogenetske čimbenike (IL-10, TGF-β i čimbenik rasta vaskularnog endotela, VEGF (od engl. *vascular endothelial growth factor*)).

U organizaciji izvanstaničnog matriksa sudjeluje hijaluronat te je njegova koncentracija povećana za vrijeme upale i remodeliranja tkiva (80). Nisko molekularni hijaluronat i fragmenti fibronektina ključni su čimbenici proupalnog signaliziranja (81,82). Nakon što monociti prođu endotelnu barijeru, CD44 se vezuje za svoj ligand, fragmentirani hijaluronat izvanstaničnog matriksa oštećenog miokarda (83). Monociti su time potaknuti na izlučivanje citokina koji stimuliraju proliferaciju fibroblasta i njihovu transformaciju u miofibroblaste. Produljeni upalni odgovor te širenje upale mogu izazvati nepovoljno remodeliranje i disfunkciju miokarda nakon infarkta (36).

U fazi proliferacije miofibroblasti proizvode komponente izvanstaničnog matriksa. čime se postiže remodeliranje srčanog tkiva (5). Fibrin i fibronektin su posebno važne sastavnice izvanstaničnog matriksa jer služe kao skela za migrirajuće i proliferirajuće stanice (70). Za heparan-sulfat izvanstaničnog matriksa vezan je VEGF. Različite vrste stanica unutar infarkta miokarda (makrofagi, fibroblasti i endotelne stanice) izlučuju izvanstanične sulfataze koje oslobađaju VEGF. Nakon vezanja za VEGF receptor endotelnih stanica, pobuđuje se stvaranje novih krvnih žila (65).

U fazi zrenja izvanstanični matriks se umrežava. Zreli fibroblasti imaju sposobnost sinteze enzima lizil oksidaze, LOX (od engl. *lysyl-oxidase*), neophodnog za pravilno slaganje kolagenskih monomera u kolagenska vlakna. Faza zrenja završava deaktivacijom reparativnih stanica kojom ulaze u apoptozu (82,84).

A.1.4.2. Vino i infarkt miokarda

Poznato je da sastav vina ovisi o grožđu iz kojeg je proizvedeno, a do danas je zabilježeno preko deset tisuća različitih sorti. Kemija biljnog tkiva grožđa vrlo je složena s

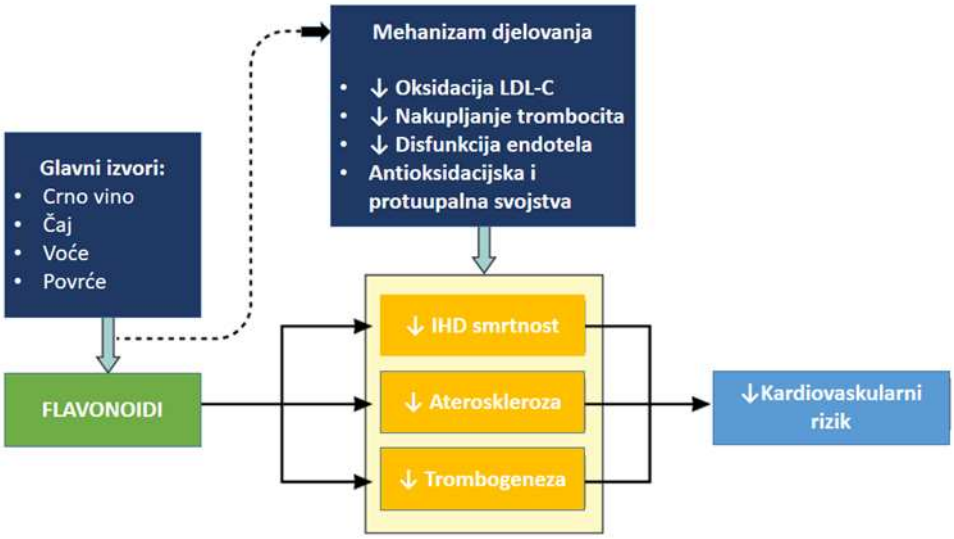
obzirom na broj i strukturu spojeva, pa kvalitativni i kvantitativni sastav biljnog materijala značajno ovisi o vrsti i sorti grožđa kao i o klimi i tipu tla na kojem se uzgaja. Osim o vrsti grožđa, sastav vina ovisi i o primijenjenim tehnologijskim postupcima tijekom vinifikacijskog procesa, načinu pohrane i starosti vina (85–88).

Vino je kompleksna vodena otopina mnogih spojeva. Glavne sastavnice su voda, etanol, organske kiseline (vinska, jabučna i mliječna), hlapljivi esteri, aldehidi te ketoni, odgovorni za aromu, ostatni saharidi, fenoli, lipidi, minerali i vitamini.

Fenolni spojevi u vinu predstavljaju veliku skupinu od nekoliko stotina različitih spojeva. Jednostavni fenoli imaju jednu ili više hidroksilnih skupina i osnova su građe polifenola. Polifenoli vina dijele se na flavonoidne i neflavonoidne spojeve. Flavonoidni sadrže jezgru sastavljenu od tri aromatska prstena. Flavanoli, flavonoli i antocijanidini spadaju u glavne skupine vinskih flavonoida. Antocijanidini su obojeni spojevi grožđa, a u vinu se nalaze kao glikozidi te se tada nazivaju antocijani. Neflavonoidi prisutni u crnim i bijelim vinima su fenolne kiseline koje mogu biti slobodne i/ili glikozidno vezane i stilbeni, primjerice resveratrol, čiji su biološki učinci istraživani u različitim eksperimentalnim sustavima (89). Fenolne kiseline vina su derivati hidroksibenzojeve (galna, vanilinska, siringinska, protokatehinska i p-hidroksibenzojeva) te hidroksicimetne kiseline (p-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska) (90,91).

Za razliku od crnog vina, kod standardne proizvodnje bijelog vina grožđani se sok neposredno nakon muljanja i gnječenja grožđa odvaja od biljnog materijala te fermentira bez sjemenki i pokožice, koji su najbogatiji izvor fenolnih spojeva, što rezultira smanjenom ukupnom količinom fenola. Stoga se biološki potencijal bijelih vina može značajno razlikovati od crnih.

Mnoge studije pokazuju da umjerena konzumacija vina djeluje blagotvorno, posebno na kardiovaskularno zdravlje (92–94). Blagotvorno djelovanje se, osim alkoholu, pripisuje i fenolnim spojevima, za koje je, unatoč ograničene biodostupnosti, pokazan antioksidacijski, antimikrobni, protuupalni, vazodilatacijski, antiagregacijski i antikancerogeni učinak, iako njihov točan mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen (95,96) (Slika 8). Također, etanol i polifenoli iz vina mogu djelovati sinergistički (97).

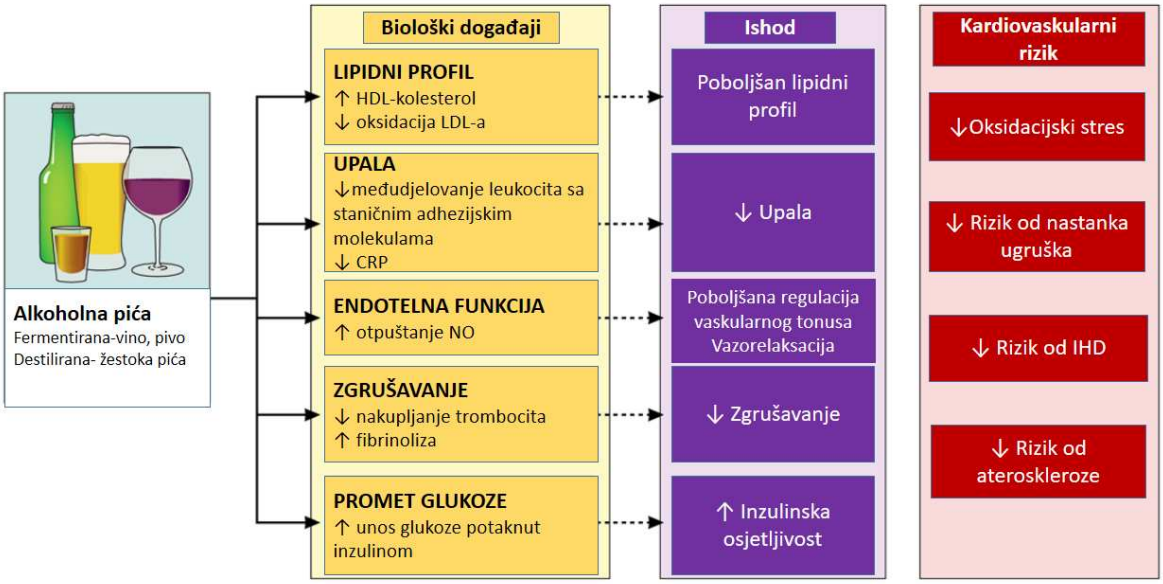


Slika 8. Kardioprotektivni učinci flavonoida i mehanizmi uključeni u smanjenje kardiovaskularnog rizika.

LDL-C, kolesterol iz lipoproteina niske gustoće (od engl. *low-density lipoprotein cholesterol*)

Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Hasseb i sur. Wine and Cardiovascular Health (97).

Umjerena konzumacija alkoholnih pića, osobito uz obrok, (100-200 ml vina dnevno za žene što odgovara količini od 10-20 g etanola, i 200-300 ml vina dnevno za muškarce, odnosno 20-30 g etanola) povezana je sa smanjenjem rizika od ishemijske bolesti srca, jer značajno povećava razinu kolesterola unutar lipoproteina visoke gustoće, HDL-a (od engl. *high-density lipoprotein*), a snižava unutar lipoproteina niske gustoće, LDL lipoproteina (od engl. *low-density lipoprotein*) (Slika 9) (97). Antioksidacijsko djelovanje vina snižava razinu iznimno aterogenih, oksidiranih LDL-ova u krvi (Slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz mehanizama bioloških učinaka konzumacije alkoholnih pića.

IHD, ishemijska bolest srca (od engl. *ischemic-heart disease*); HDL-C, kolesterol iz lipoproteina visoke gustoće (od engl. *high -density lipoprotein cholesterol*); LDL-C, kolesterol iz lipoproteina niske gustoće (od engl. *low-density lipoprotein cholesterol*)

Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Hasseb i sur. Wine and Cardiovascular Health (97).

Zbog peroksidiranih lipida unutar lipidnog jednosloja oksidiranog LDL-a i preinaka njegovih apolipoproteina djelovanjem ROS-a, snižava se afinitet vezanja apolipoproteinskog liganda Apo-B100 za LDL receptore u svim tkivima čime se smanjuje receptorom posredovana endocitoza LDL-a u stanice. Oksidirani LDL-ovi mogu tada ulaziti jedino u makrofage putem njihovih receptora čistača, koji potom zbog prepunjenosti unesenim kolesterolom prelaze u tzv. pjenaste stanice. Makrofagi posjeduju adhezijske molekule za transmigraciju kroz endotelni sloj, posebice u upalnom stanju. Zato se aterogeneza ubraja i u upalne bolesti. Upala potiče prijelaz makrofaga u subendotelno područje krvnih žila. Nakon smrti pjenaste stanice, nastale transformacijom makrofaga, oslobađaju se goleme količine kolosterola i talože u subendotelnom sloju krvne žile (42). Konzumacija vina prevenira aterogenezu jer smanjuje međudjelovanje leukocita sa staničnim adhezijskim molekulama kao i razinu C-reaktivnog proteina, CRP-a, dakle snižavajaći upalu. Umjerena konzumacija alkoholnih pića djeluje i na endotelnu funkciju snižavanjem izražaja enodotelnog selektina i vazokonstriktora endotelina te povećanjem oslobađanja dušikova (II) oksida (NO) koji je vazodilatator (97).

Povećanom fibrinolizom i smanjenim nakupljanjem trombocita, smanjuje se i rizik zgrušavanja (97). Povećava se i osjetljivost na inzulin tako da nisu potrebne visoke koncentracije inzulina da bi se povećao izražaj lipoprotein lipaze na endotelnim stanicama kapilara mišićnog tkiva (97). Lipoprotein lipaza katabolizira lipoproteine vrlo niske gustoće, VLDL (od engl. *very-low density lipoproteins*) i time ubrzava daljni liproteinski metabolizam pridonoseći posredno i bržem uklanjanju LDL-a iz krvotoka što u konačnici priječi aterogenezu (42).

Bijelo vino čiji su učinci općenito manje istraživani naspram crnog vina, sadrži između ostalog i jednostavne monofenole koji su posrednici korisnih bioloških učinaka. Primjerice, tirozol, 2-hidroksietil fenol, poznat po zastupljenosti u vinu, ali i u maslinovom ulju, pokazuje protuupalni, antiapoptotski i antioksidacijski učinak (98–100). Kardioprotektivni učinak umjerene konzumacije bijelog vina povezuje se i sa sadržajem kafeinske kiseline i hidroksitirozola (101,102), kao i s prekondicioniranjem etanolom (103,104). Riječ je o fenomenu u kojem su zbog prethodnog izlaganja etanolu tkiva različitim mehanizmima zaštićena od štetnih učinaka ishemije i reperfuzije. Prvenstveno je istraživan učinak umjerene konzumacije alkoholnih pića na ishemijsko/reperfuzijsko oštećenje moždanog i srčanog tkiva budući da je ova vrsta oštećenja uobičajeni patofiziološki mehanizam tijekom moždanog udara i srčanog infarkta (105,106). Pokazano je također i da izlaganje nekim lijekovima, osobito fluoriranim inhalacijskim anesteticima kao što je sevofluran, dodatno pojačava kardioprotektivni učinak prekondicioniranja etanolom (107).

Crno vino sadrži i do 10 puta višu koncentraciju polifenola od bijelog vina (103), dok je razlika u sadržaju tirozola još značajnija, 3,12±1.71 mg/100 mL za crno u odnosu na 0,21±0,10 mg/100 mL za bijelo vino (108). Međutim, još uvijek nema čvrstih epidemioloških podataka koji bi pokazali nadmoć crnih naspram bijelih vina. Naime, rijetke su *in vivo* studije koje istražuju biološke utjecaje bijelih vina u odnosu na crna vina (109–112). Sacanella i suradnici su uočili smanjenje CD11b i CD15s na monocitima zdravih žena nakon umjerene konzumacije bijelog vina (109). U studiji Williamsa i suradnika pokazano je kako je porast koncentracije IL-6 nakon akutne konzumacije bijeloga vina čak i veći (63%) u odnosu na porast nakon konzumacije crnog vina (56%) (113). Nedavno je također pokazano da konzumacija bijelog vina smanjuje vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog tlaka u muškaraca s visokim kardiovaskularnim rizikom (114).

Bijelo vino predstavlja važnu prehrambenu namirnicu, a u nekim zemljama kao i u Hrvatskoj, njegova konzumacija je i veća nego konzumacija crnog vina (115). Stoga smo željeli istražiti utjecaj konzumacije bijelog vina na izražaj upalnih adhezijskih molekula nakon infarkta

miokarda. Istraživanje u ovoj disertaciji provedeno je u sklopu znanstvenog projekta „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“, čiji je primarni cilj bio upravo usporediti učinke bijelih vina, od kojih su neka bila proizvedena uobičajenim vinifikacijskim postupkom (klasično bijelo vino Graševina), a ostala uz produljeno vrijeme kontakta biljnog materijala i grožđanog soka (tzv. macerirana vina Graševina) s učincima rosè vina proizvedenog od crnog grožđa (Plavac mali), ali istim tehnologijskim postupkom kao i klasično bijelo vino (bez kontakta grožđanog soka i biljnog materijala) i konačno s učincima crnih vina (produljeno vrijeme kontakta grožđanog soka i biljnog materijala, Plavac mali).

Ishemijska i ishemijsko-reperfuzijska ozljeda nastaje kada se nakon kritičnog vremena nedostatnog dotoka krvi organu (ishemija) ponovno donekle obnovi opskrba krvlju, perfuzija i reoksigenacija. Pri tom se aktivira niz patofizioloških mehanizama i oslobađanje reaktivnih kisikovih spojeva i proupalnih medijatora. Uobičajeni protuupalni pristupi koji ciljaju molekule uključene u aktivaciju, adheziju i ekstravazaciju leukocita, poput integrina, selektina i komponenata kaskade komplementa, pokazali su se uspješnima u smanjenju ishemijske ozljede na životinjskim modelima (116–118). Nažalost, kliničke studije nisu nedvojbeno potvrdile uspješnost tih pristupa (119). Umjereni upalni proces, kojeg Cheng i suradnici navode kao preduvjet fine modulacije upalnog mikrookoliša pogodnog za cijeljenje srčanog tkiva nakon infarkta (120), mogao bi biti potaknut upravo konzumacijom bijelog vina.

B.1.4. Tumori

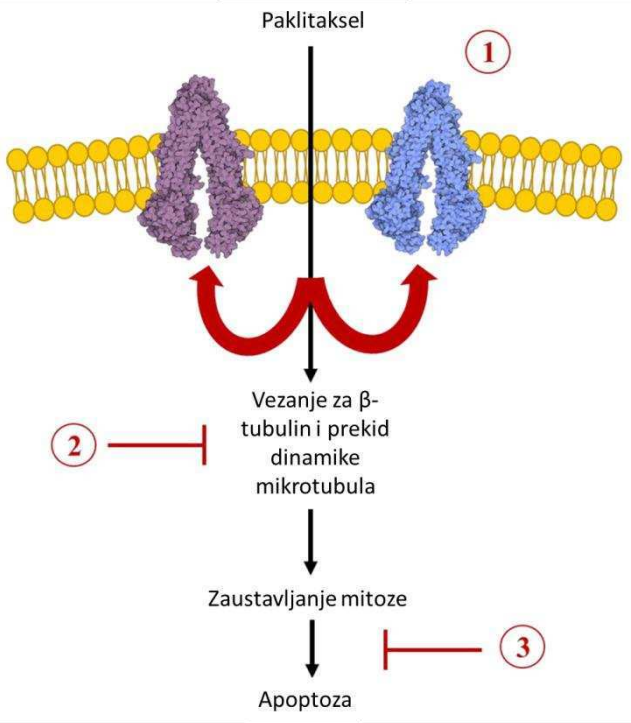
B.1.4.1. Trostruko negativni rak dojke i njegova stanična linija

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, rak dojke je vodeći uzrok smrti kod žena oboljelih od raka. Godine 2018. dijagnosticirano je 2 088 849 novih slučajeva te 626 679 smrtnih slučajeva u cijelome svijetu. U Hrvatskoj je incidencija iste godine bila 2 856, a smrtnost 1 108 (121).

Rizični čimbenici za nastanak raka dojke su: dob, obiteljska anamneza, reproduktivni čimbenici (rana menstruacija, kasna menopauza, starija prvorotkinja, nerotkinja, korištenje oralnih kontraceptiva i nadomjesnih hormonskih terapija, nedojenje), životni stil (smanjena tjelesna aktivnost, pretilost, loša prehrana i pretjerana konzumacija alkohola), zračenje te dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke (122,123).

Pojam trostruko negativnog raka dojke, TNBC (od engl. *triple negative breast cancer*) uveden je 2005. godine te se odnosi na genomski heterogenu skupinu karcinoma dojke koji čine

12-17% svih karcinoma dojke te su definirani nedostatkom izražaja estrogenskog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR) i receptora 2 ljudskog epidermalnog čimbenika rasta, HER2 (od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) (124,125).



Slika 10. Glavni mehanizmi rezistencije na paklitaksel. Crnim strelicama označeni su stanični mehanizmi djelovanja paklitaksela. Paklitaksel ulazi u stanicu, veže se za β-tubulin na unutrašnjoj površini mikrotubula stabilizirajući mrežu mikrotubula te zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi uzrokujući apoptozu. Stanice raka pronašle su uspješan način izbjegavanja osjetljivosti na paklitaksel. putem pretjeranog izražaja transmembranskih izbacivačkih transportera, posebno ABCB1 i ABCC10 (1), mutacijama tubulina (α i β) ili promjenama stabilnosti mreže mikrotubula (2) te smanjenjem funkcije važnih apoptotičnih proteina kao što su Bcl-2 i p53 (3). Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Barbuti i Chen. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy (126).

U liječenju trostruko negativnog raka dojke koriste se različiti terapijski pristupi: kirurgija i zračenje, kemoterapija, ciljana terapija, imunoterapija te cjepiva, dok su mnogi potencijalni terapeutici u fazi istraživanja. Iako je terapija taksanima, posebice paklitakselom, standardna terapija kod trostruko negativnog karcinoma dojke, visoka učestalost recidiva i progresije kod liječenih pacijentica ukazuje da metastatski karcinom dojke može steći otpornost na ovaj lijek (127) .

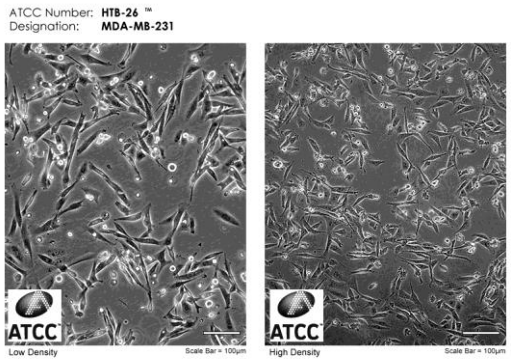
Paklitaksel je član obitelji taksana s protutumorskim djelovanjem. Veže se za mikrotubule te onemogućava njihovo razdvajanje (Slika 10). Osim glavnog načina izazivanja

apoptoze ciljanjem tubulina, nađeno je da paklitaksel cilja mitohondrij i inhibira funkciju apoptotičnog inhibitorskog proteina Bcl-2 (od engl. *B-cell Leukemia 2*) (126).

Aktivne kliničke studije ciljaju angiogenezu, polimerazu za homologni popravak, serin/treonin protein kinaze, PI3K/mTOR, receptore čimbenika rasta, hormonske receptore, Ras/MAPK te Notch/γ-sekretazu. Nadalje, u studijama se istražuje i novija terapija anti-PD-1 (od engl. *anti-programmed cell death 1*), anti-PD-L1 (od engl. *anti-programmed cell death 1 ligand 1*) te anti-CTLA 4 (od engl. *anti-cytotoxic T-lymphocyte protein 4*) monoklonskim protutijelima (128).

Najnovija istraživanja pokazuju da konvencionalna terapija paklitakselom u kombinaciji s nintedanibom može biti uspješna u tretiranju primarnog trostruko negativnog raka dojke. Isti pristup može pospješiti i anti-PD-L1 terapiju metastatskog trostruko negativnog raka dojke (129).

Za potrebe *in vitro* istraživanja**,** uspostavljeno je nekoliko staničnih linija trostruko negativnog raka dojke, primjerice, MDA-MB-231 stanična linija (Slika 11).



Slika 11. MDA-MB-231 stanice u staničnoj kulturi. Lijevo-niska gustoća; desno-visoka gustoća Preuzeto s: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo_country=hr (130).

MDA-MB-231 stanična linija izolirana je u M D Anderson centru za rak (Texas, SAD) iz pleuralnog izljeva pedesetjednogodišnje bjelkinje s metastatskim adenokarcinomom dojke (131). Radi se o visoko agresivnoj, invazivnoj i slabo diferenciranoj trostruko negativnoj staničnoj liniji. Invazivnost se postiže proteolitičkim djelovanjem na izvanstanični matriks (132).

Iako je u početku MDA-MB-231 stanična linija bila klasificirana kao bazalna stanična linija raka dojke, ipak pripada klaudin niskomolekularnom podtipu kojeg karakterizira slab ili odsutan izražaj biljega luminalne diferencijacije, visoko obogaćivanje biljezima epitelno-mezenhimalne tranzicije i značajke slične CSC. Pokazuje smanjen izražaj klaudina-3, klaudina-

4 i klaudina-7, niski izražaj biljega proliferacije Ki-67, nizak E-kadherin, obogaćenje biljezima povezanim s epitelno-mezenhimalnim prijelazom te izražaj osobina povezanih s matičnim stanicama karcinoma (npr. $CD44^{+}/CD24^{-}$ fenotip) (133). Infiltraciji metastatskih stanica pogoduje međudjelovanje biljega CD44 s proteoglikanima izvanstaničnog matriksa.

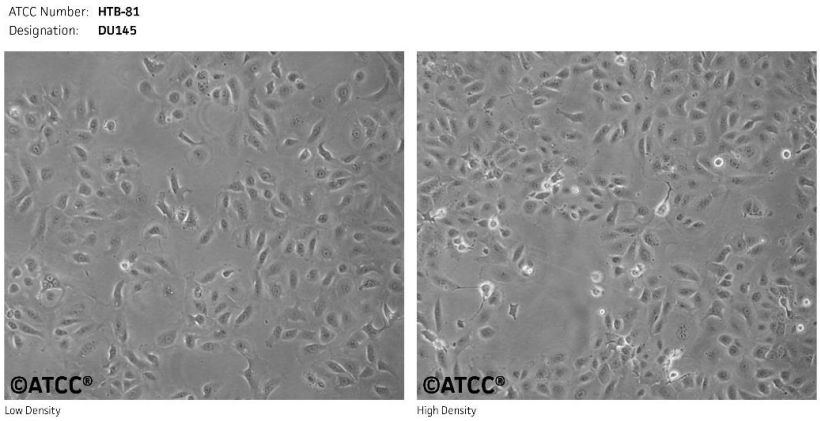
B.1.4.2. Rak prostate neovisan o androgenima i njegova stanična linija

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, rak prostate je drugi najčešće dijagnosticiran rak kod muškaraca u cijelome svijetu. Prema podacima iz 2018. godine, procijenjeno je 1 276 106 novih slučajeva te 358 989 smrtnih slučajeva u cijelome svijetu. U Hrvatskoj je incidencija iste godine bila 2 346 (vodeći rak) te je 857 muškaraca umrlo uslijed raka prostate (121).

Rizični čimbenici za nastanak raka prostate su: obiteljska anamneza, dob, rasa i životni stil (prehrana, pušenje i pretilost) (122,134,135). Napredovanje raka prostate djelomično ovisi o složenom međudjelovanju testosterona, njegovog potpuno aktivnog metabolita dihidrotestosterona i staničnog receptora za androgene. Kod metastatskog raka prostate, prva linija liječenja je uklanjanje testosterona. Međutim, takve intervencije ne dovode do izlječenja jer stanice raka preko višestrukih mehanizama razvijaju neovisnost o androgenima, što za posljedicu ima daljnje napredovanje bolesti i smrt (136).

Rak prostate pokazuje visoku intrinzičnu otpornost na terapiju, odnosno osjetljiv je na samo nekoliko kemoterapeutika nakon što razvije neovisnost o androgenima (28). Kemoterapeutik prve linije koji se koristi za metastatski rak prostate je docetaksel (137). Docetaksel je vodotopljivi, polusintetski analog paklitaksela, sintetiziran iz iglica europske tise *(Taxus baccata)*, a koristi se u terapiji raka prostate. Ima veći afinitet za vezanje na tubulin, nakuplja se u tumorskim stanicama te ostaje duže u stanici u odnosu na paklitaksel (138). Indikacijsko područje docetaksela i paklitaksela se u mnogim sijelima raka poklapa. U liječenju raka prostate se može, iako ne kao prvi izbor, primijeniti i paklitaksel. Terapija docetakselom svaka tri tjedna standard je za metastatski rak neovisan o androgenima, no jedna studija terapije paclitakselom (po 6 tjedana terapije i 2 tjedna odmora) pokazuju dobre rezultate. Kod jedanaest od 26 pacijenata koji su pokazivali simptome povezane s rakom zapaženo je poboljšanje. Medijan preživljenja bio je 12,8 mjeseci. Terapija je bila povezana s prihvatljivom hematološkom toksičnošću (stupnjem anemije i trombocitopenije) te umjerenim nehematološkim toksičnim djelovanjem (tromboza/embolija i umor) (139).

Često korištena stanična linija kod *in vitro* istraživanja novih lijekova za rak prostate je Du-145 stanična linija (Slika 12).



Slika 12. Du-145 stanice u staničnoj kulturi. Lijevo-niska gustoća; desno-visoka gustoća. Preuzeto s: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-81.aspx?geo_country=hr (140).

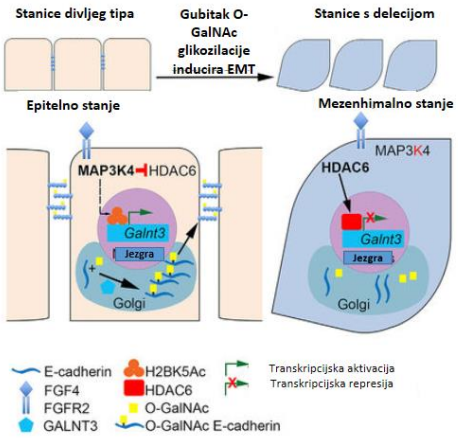
Izolirana je iz mozga šezdesetdevetogodišnjeg bijelca s metastatskim rakom prostate. Du-145 stanice nisu osjetljive na androgene i ne izražavaju PSA (antigen specifičan za prostatu) (140).

B.1.4.3. Matične stanice raka

Po važećoj paradigmi smatra se da napredovanje tumora omogućava njihova subpopulacija matičnih stanica raka, CSC (od engl. *cancer stem cells*). CSC su pluripotentne stanice raka, a uključene su u procese stvaranja tumora i metastaziranja. Predstavljaju relativno mali postotak stanica raka koje imaju sposobnost samoobnavljanja i stvaranja heterogenosti primarnog tumora (141).

Stanice raka mogu zadobiti CSC fenotip djelovanjem mikrookoliša (citokina, faktori rasta, hipoksije, itd.) (141–143). Ovaj prijelaz se ostvaruje epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (EMT) kojom CSC zadobivaju fenotip koji im olakšava migraciju i invazivnost (141). Do tranzicije može doći zbog narušavanja procesa glikozilacije. Glikozilacija O-GalNAc kritična je za održavanje epitelnog stanja kod epitelnih stanica dojke. Gubitak GALNT3 u transfeciranim ljudskim epitelnim stanicama dojke snižava glikozilaciju E-kadherina i zadržava ga u Golgijevu tjelešcu, inducirajući time EMT (Slika 13) (144). Malignost nije određena samo specifičnim tumorskim molekulama ili njihovim genima, već može biti određena i poremećenom građom stanične membrane (145). Glikosfingolipidi su važne komponente

stanične membrane te mogu utjecati na krajnje ponašanje stanice. Glikosfingolipid Gb3Cer ima ključnu ulogu u održavanju epitelnih svojstava stanica raka. Nedostatak Gb3Cer izazvan delecijom gena laktozilceramid 4-alfa-galaktoziltransferaze (A4GALT), koji kodira sintezu Gb3Cer, inducira EMT, povećava otpornost na kemoterapeutike i broj CSC ($CD44^+/CD24^-$) (146). Nadalje, Gb3Cer je receptor za toksin kolere pa toksin može izazvati EMT nakon vezanja, što se događa samo u stanicama s funkcionalnim enzimom A4GALT (147). Razina Gb3Cer u matičnim stanicama raka dojke značajno je smanjena u odnosu na stanice raka dojke koje nisu matične (148).



Slika 13. Gubitak O-GalNAc glikozilacije inducira EMT. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Raghu i sur. GALNT3 Maintains the Epithelial State in Trophoblast Stem Cells (144).

CSC su uključene u rast tumora, bilo da se jedna CSC namnoži proliferiracijom i diferencira u tumor ili se više CSC nakupina razvijaju u nezavisne tumore. Aktivacija CSC, koje do tada nisu bile aktivne, može dovesti do povratka bolesti. Kada dođu na udaljeno mjesto, događa se obrnut proces te stanice poprimaju epitelni fenotip koji je potreban za proliferaciju stanica i stvaranje metastaza (141,149). Nove CSC mogu nastati mutacijom ili epigenetskom modifikacijom, primjerice metilacijom DNA.

CSC karakterizira različit izražaj staničnih biljega. Yang i suradnici pronašli su $CD44^+/CD24^-$ i/ili ALDH1A1 (član A1 obitelji aldehid dehidrogenaze; od engl. *aldehyde dehydrogenase family 1 member A1*) i/ili CD133 biljeg kod 31 pacijentice od njih 88 s primarnim trostruko negativnim rakom dojke. U 8 slučajeva uzorak je bio pozitivan na $CD44^+/CD24^-$ i ALDH1A1, u 10 slučajeva uzorak je bio pozitivan na $CD44^+/CD24^-$ i CD133, u 9 slučajeva uzorak je bio pozitivan na ALDH1A1 i CD133, dok je samo u 4 slučaja postojala prisutnost svih triju CSC biljega. Korelacija između biljega CSC bila je slaba, što znači da

većina stanica karcinoma dojke ne izražava ove biljege istovremeno. Uzimajući u obzir da CD133 fenotip nije značajno povezan s kraćim preživljenjem i progresijom bolesti, može se pretpostaviti da je CD133 klinički manje pouzdan CSC biljeg u usporedbi s $CD44^+/CD24^-$ (150).

CSC su otporne na kemoterapiju i radioterapiju, a sama terapija može čak potaknuti stvaranje CSC. Stoga CSC imaju važnu ulogu u povratku bolesti i time predstavljaju važnu terapijsku metu (151,152).

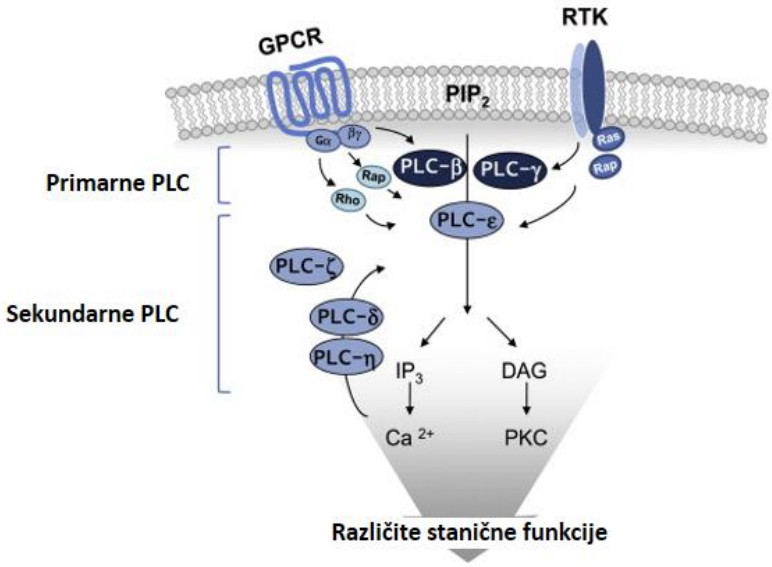
B.1.4.4. Fosfolipaza C kao ciljna molekula u terapiji tumora

Fosfolipaza C, PLC (od engl. *phospholipase C*) regulira mnoge stanične funkcije (pokretljivost stanica, transformaciju, diferencijaciju i rast) predstavljajući dobru ciljnu molekulu za terapiju tumora (153). Supstrat PLC je fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (PIP_2), fosfolipid koji se nalazi unutar plazma membrane. Potrebna je određena količina PIP_2, kao zaliha supstrata za enzim PLC, raspoloživa za slučaj aktivacije signalne kaskade koja uključuje PLC. PIP_2 nastaje fosforilacijom dviju hidroksilnih skupina na inozitolnom dijelu fosfatidil inozitolnog fosfolipida (42) na poticaj hormona i signalnih molekula koje djeluju putem tirozin kinaznih receptora uključujući i inzulin (42).

Izoenzimi fosfolipaze C sudjeluju u unutarstaničnom prijenosu signala katalizom hidrolitičkog cijepanja fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP_2) na dva druga glasnika: diacilglicerol (DAG) i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP_3). DAG djelomično aktivira inače neaktivni citosolni enzim protein kinazu C (PKC), sidreći je za unutarnji jednosloj plazma membrane. IP_3 je ligand za otvaranje Ca^{2+} kanala (kontroliranog ligandom, od engl. *ligand-gated*) na endoplazmatskoj mrežici. Stoga vezanje IP_3 za kanal rezultira izlazom velike količine Ca^{2+} iz endoplazmatske mrežice u citosol. Ca^{2+} zajedno s DAG-om, uzrokuje potpunu aktivaciju protein kinaze C (154) koja provodi fosforilaciju unutarstaničnih proteina, uključujući i MAP kinaze (mitogenom aktivirane protein kinaze), odgovorne za proliferaciju stanica.

Kod sisavaca postoji 13 izoenzima PLC koji se mogu svrstati u 6 vrsta. Iako svi izoenzimi kataliziraju istu reakciju, svaki od njih ima jedinstvenu fiziološku funkciju te različitu raspodjelu po tkivima (155).

Primarne fosfolipaze C, PLC-β i PLC-γ aktiviraju se djelovanjem receptora za razliku od sekundarnih PLC (PLC-ε, PLC-δ PLC-ζ i PLC-η), kako je prikazano na slici 14 (156).



Slika 14. Djelovanje fosfolipaze C. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Yang i sur. The physiological roles of primary phospholipase C (156).
GPCR- receptor povezan s G proteinom (engl. *G protein coupled receptor*)
RTK- receptorske tirozin kinaze

PLC-β aktivira se prijenosom signala preko receptora tipa GPCR membranskih proteina koji 7 puta prolaze kroz membranu dok se PLC-γ aktivira prijenosom signala preko RTK receptora. PLC-ε se može aktivirati putem obaju receptora (156,157). Porast Ca^{2+} u citosolu, posljedičnom aktivacijom PLC-δ produljuje djelovanje započeto drugim PLC. Odatle proizlazi ključna uloga PLC-δ. Odziv PLC-δ na primarni ligand vezan za izvanstanične domene receptora sporiji je u odnosu na izoenzime PLC-β i PLC-γ, no produljeni stanični odgovor PLC-δ pojačava konačni učinak primarne signalne molekule vezane za izvanstaničnu domenu receptora (155,158). Struktura PLC-η slična je strukturi PLC-δ, a studije upućuju da je aktivirana porastom Ca^{2+}iona (155). Izražaj PLC-ζ ograničen je na muške spolne stanice te se aktivira niskim koncentracijama Ca^{2+} iona (155).

Poznato je da ciljanje populacije CSC predstavlja obećavajući pristup kojim bi se onemogućio relaps. S obzirom na to da su PLC enzimi uključeni u aktivaciju proliferacije stanica, fosfolipaza C predstavlja dobru ciljnu molekulu za potencijalnu terapiju tumora. Stoga bi inhibitor fosfolipaze C iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina koji ima dokazanu antitumorsku aktivnost, mogao doprinijeti i smanjenju udjela CSC unutar tumora, kao i promjeni izražaja glikokonjugata CD15s i GM3(NeuAc) na CSC plazma membrani, koji bi snizio metastatski potencijal.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

A.2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA NA MODELU INFARKTA MIOKARDA

1. Odrediti izražaj CD15s, CD11b i CD44 na granulocitima i monocitima te postotak njihovih CD15s+, CD11b+, CD44+ i CD11b+CD44+ subpopulacija u perifernoj krvi nakon infarkta miokarda štakora koji su četiri tjedna konzumirali bijelo vino (W, od engl. *wine*) ili samo vodu (C, od engl. *control*), te analizom rezultata donijeti zaključak o utjecaju konzumacije vina.
2. Odrediti izražaj CD15s, CD11b i CD44 na granulocitima i monocitima te postotak njihovih CD15s+, CD11b+, CD44+ i CD11b+CD44+ subpopulacija u perifernoj krvi kod neoperiranih (BL, od engl. *baseline*) i prividno operiranih (SH, od engl. *sham*) štakora, te analizom rezultata donijeti zaključak o invazivnosti ovog modela infarkta miokarda.

A.2.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA NA MODELU INFARKTA MIOKARDA

1. Četverotjedna konzumacija bijelog vina smanjit će izražaj granulocitnih i monocitnih upalnih biljega (CD15s i CD11b) te povećati izražaj CD44, 24 sata nakon infarkta miokarda.
2. Izražaj upalnih biljega (CD15s, CD11b i CD44) kod prividno operiranih štakora neće biti povećan u odnosu na izražaj upalnih biljega kod neoperiranih štakora.

B.2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA NA STANIČNIM MODELIMA RAKA

Nakon primjene inhibitora fosfolipaze C, samog ili u kombinaciji s paklitakselom, na staničnim linijama MDA-MB-231 i Du-145 odrediti:

1. postotak metabolički aktivnih stanica raka
2. postotak apoptotičnih stanica
3. postotak matičnih stanica raka (CSC)
4. izražaj biljega GM3(NeuAc) i CD15s na CSC
5. postotak CSC pozitivnih na GM3(NeuAc) i CD15s

B.2.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA NA STANIČNIM MODELIMA RAKA

Primjena inhibitora fosfolipaze C samog ili u kombinaciji s paklitakselom:

1. povećat će apoptozu i izražaj GM3(NeuAc) na matičnim stanicama raka
2. smanjit će postotak matičnih stanica raka i izražaj metastatskog biljega CD15s na njima

3. MATERIJALI I METODE

A.3.1. Pokusne životinje za model infarkta miokarda

Eksperimentalni postupak odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (dokument br. 2181-198-03-04-13-0042). Istraživanje je odobrila i Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede (dokument br. 525-10/0255-16-7). Održavanje životinja bilo je u skladu s „Vodičem za njegu i upotrebu laboratorijskih životinja" (NIH, Bethesda, SAD, 1985.).

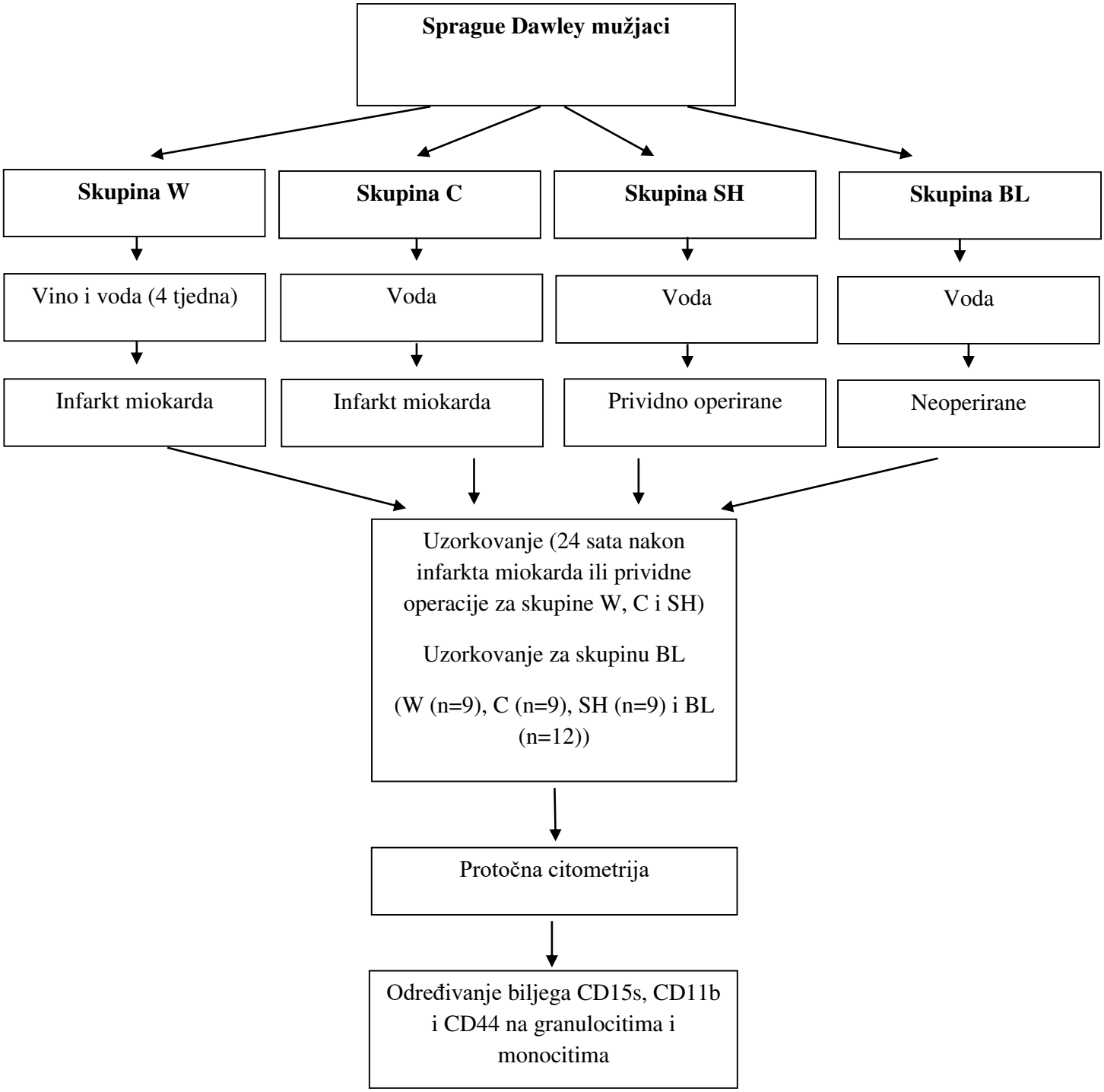
Svi su se štakori uzgajali u kontroliranim uvjetima u Nastambi za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu. Životinje su hranjene standardnom hranom za štakore s.r.t. Mucedola 3.9 kcal/g *ad libitum* (Settimo Milanese, Milano, Italija).

Sprague Dawley mužjaci bili su randomizirani u četiri skupine: životinje koje piju vino i vodu odvojeno 4 tjedna pred operaciju (ispitna skupina, W), životinje koje piju samo vodu pred operaciju (kontrolna skupina, C), prividno operirane (SH) te neoperirane životinje (BL).

Skupina W imala je pristup vinu tijekom 24 sata, a pristup vodi tijekom 6 sati. Svježa voda (50 mL) stavljala se na kaveze svakog jutra u 9:00 sati u specijalnim pojilicama. U 15:00 sati mjerili su se volumeni popijene vode i vina te bi se voda uklonila do sljedećeg jutra, a u pojilicu bi se dodalo 30 mL bijelog vina („Graševina Krauthaker vintage 2015." koja sadrži 13% alkohola). Ovoj skupini se svakog dana mjerio volumen popijenog vina i vode. Mjerenja su se obavljala u 15:00 sati. Prosječni dnevni unos vina bio je 5 mL/100 g tjelesne mase. Konačni uzorak prije žrtvovanja činile su: ispitna skupina (n=9), kontrolna skupina (n=9), prividno operirane (n=9) te neoperirane životinje (n=12).

A.3.2. Postupci pri istraživanju na modelu infarkta miokarda

Hodogram istraživanja na modelu infarkta miokarda prikazan je na Slici 15.



Slika 15. Hodogram istraživanja na štakorskom modelu infarkta miokarda.

A.3.2.1. Priprema životinja za operaciju

Životinje su izvagane kako bi se izračunala optimalna doza anestetika prema tablici koja se koristi u Laboratoriju za neurokardiologiju. Štakori su bili anestezirani injektiranjem mješavine anestetika Ketaminola (Ketaminol 10, 1,2 ml/kg, Intervet International, Nizozemska) i Ksilazina (Xylapan, 0,4 ml/kg, Vetoquintol, Švicarska) u desni stražnji mišićni odjeljak natkoljenice. Operacijsko područje pripremljeno je brijaćim aparatom i britvicom.

Endotrahealna intubacija provedena je pomoću arterijskih katetera 16 G i 17 G.

A.3.2.2. Izazivanje infarkta miokarda

Kirurški postupak se proveo koristeći „abdominalni pristup" srcu. Ukratko, nakon gornje medijalne laparotomije, nadzirane kirurškim mikroskopom (Leica, M520 MC1, Švicarska), napravio se središnji rez prednje polovice dijafragme dok je životinja bila priključena na respirator (SAR 830, CWE Inc, SAD) namješten na 59 udisaja/min. Na prednjoj površini srca, identificirana je lijeva prednja silazna koronarna arterija te podvezana (sa 7,0 neresorbirajućim koncem) oko 2 mm od ruba uške lijeve pretkomore. Kod prividno operirane skupine, igla je prošla ispod arterije, ali nije izvedeno podvezivanje. Znak uspješnog podvezivanja koronarne arterije bila je trenutna promjena boje površine lijeve komore (bljedilo) koja se širila do vrha srca.

Nakon šivanja kirurškog reza na dijafragmi te isisavanja iz prsne šupljine,, životinje su bile skinute s respiratora te su nastavile spontano disati nakon čega su zašiveni trbušni zid i koža. Nakon provjere šava, životinje su prebačene u novi kavez te su postoperativno praćene. Preživjele životinje žrtvovane su nakon 24 sata.

A.3.2.3. Protočna citometrija

Uzorak krvi potreban za protočnu citometriju uzet je iz srca u epruvetu s EDTA antikoagulansom. Analizirano je 100 mikrolitara pune krvi, prethodno obrađene reagensom koji se vezuje za Fc receptore kako bi se spriječila nespecifična vezanja protutijela (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka). Nakon 20 minutne inkubacije s protutijelima na CD15s (konjugirano s kromogenom Alexa Fluor 647; BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD), CD11b (konjugirano s kromogenom PE; BD Pharmingen) i CD44 (konjugirano s kromogenom FITC; BD Pharmingen) u mraku, na sobnoj temperaturi te lize eritrocita pomoću otopine za lizu

(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), fluorescencija obojenih uzoraka izmjerena je pomoću BD Accuri C6 (BD Biosciences, Belgija) protočnog citometra (159). Kao negativne kontrole za postavljanje odgovarajućih pozitivnih područja korišteni su neobojeni uzorci, uzorci obojeni samo jednim od tri protutijela te FMO kontrole (od engl. *fluorescence minus one;* uzorci obojeni svim protutijelima osim jednoga). Propuštanje uzorka kroz protočni citometar zaustavljalo se kada bi se prikupilo 10^6 stanica. Podaci dobiveni protočnom citometrijom obrađeni su u Flow Logic programu (Inivai, Mentone, Victoria, Australija). Određeni su postotci i medijani intenziteta fluorescencije za biljege CD15s, CD11b i CD44.

A.3.3. Statistička analiza rezultata pokusa na modelu infarkta miokarda

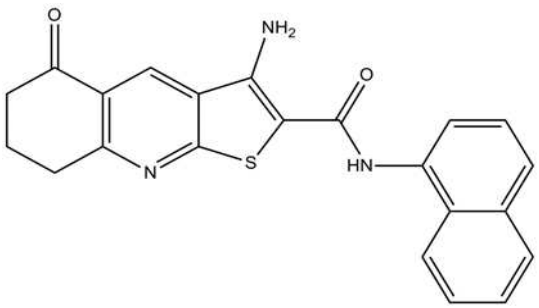
Za međusobno uspoređivanje skupina, korišten je Mann Whitney test. Postojanje trendova između grupa potvrđeno je korištenjem testa za linearni trend. Sve statističke analize su napravljene koristeći Past 3.X softver (Hammer, Harper and Ryan, University of Oslo, Norveška) (160) sa značajnošću postavljenom na $P<0,05$. Veličina uzorka izračunata je na temelju Meadove jednadžbe resursa.

B.3.1. Stanične linije i novosintetizirani inhibitor

Stanične linije MDA-MB-231 i Du-145 uzgajane su u inkubatoru na 37° C uz 5% CO_2 u mediju DMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) i RPMI-1640 (EuroClone, Milano, Italija), slijedom. Mediju je dodan 10% fetalni goveđi serum, FBS (od engl. *fetal bovine serum*) (EuroClone, Milano, Italija) i 1% antibiotik (EuroClone, Milano, Italija).

Potencijalni lijek za terapiju tumora, iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina (Slika 16), koji bi ciljao fosfolipazu C (PLC), otkriven je probirom na osnovu računalnog modeliranja metodom vHTS (engl. *virtual high throughput screen*) (153). Dodatak tieno [2,3-*b*] piridina izaziva ograničen rast MDA-MB-231 stanica, zaokruživanje i stvaranje mjehurića plazma membrane, povećava populaciju u G2/M fazi, smanjuje pokretljivost i proliferaciju. Ovi učinci na MDA-MB-231 stanice u skladu su s inhibicijom PLC-δ1 i δ2 izoformi što ih čini najuvjerljivijom metom ovog razreda spojeva (161). Međutim, moguće je i da su pogođeni i drugi biomolekularni ciljevi, doprinoseći sveukupnoj djelotvornosti tieno [2,3-*b*] piridina (162).

Inhibitor je bio otopljen u dimetil sulfoksidu, DMSO-u (od engl. *dimethyl sulfoxide*), a kasnije razrijeđen PBS-om kako bi se dobile niže koncentracije čije se djelovanje određivalo.



Slika 16. Inbibitor fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid.

Inhibicija rasta polovine populacije stanica,GI50 (od engl. *the 50% growth inhibition*) postiže se 298 nM koncentracijom inhibitora za MDA-MB-231 stanice te 327 nM za Du-145 stanice, a potpuna inhibicija rasta, TGI (od engl. *total growth inhibition*), određena sulforhodamin B testom, iznosi 4.1 μM za MDA-MB-231 te 6.7 μM za Du-145 stanice (163). Koncentracija koja smanjuje preživljenje stanica za 50%, IC50 (od engl. *the half maximal*

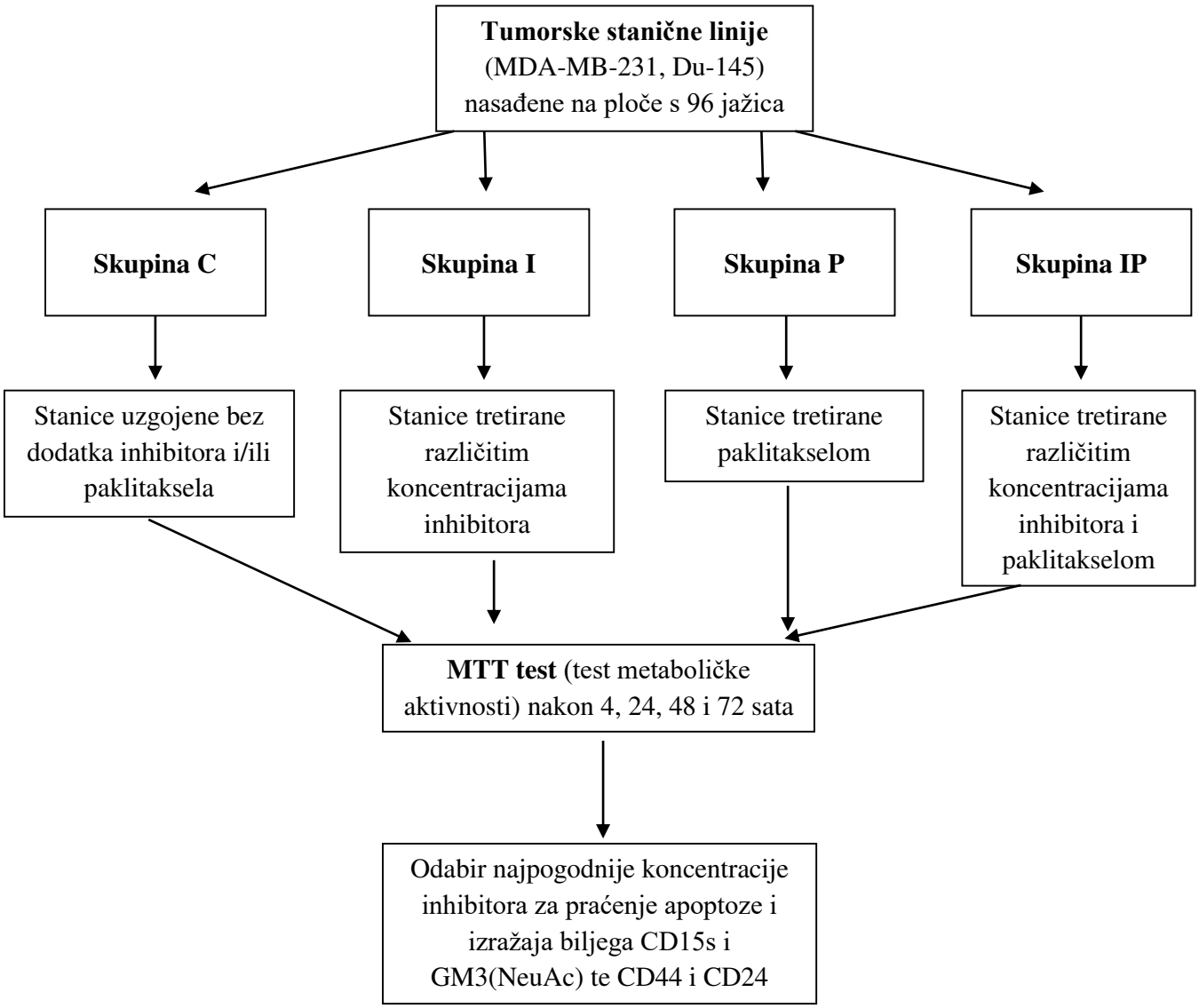
inhibitory concentration) vrijednost dobivena testom ugradnje timidina iznosila je 690 nM za MDA-MB-231 stanice (161).

B.3.2. Određivanje metaboličke aktivnosti stanica MTT testom

Postotak preživjelih stanica određen je mjerenjem njihove metaboličke aktivnosti pomoću MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid) testa. Podjednak broj stanica nasađen je u jažice (na pločama od 96 jažica) u triplikatima za pojedine koncentracije i vremena tretiranja te ostavljen da adherira preko noći. Stanicama je dodan medij ili otopina određene koncentracije novosintetiziranog inhibitora fosfolipaze C u mediju (0.5, 1, 5, 10 i 25 μM) te su inkubirane tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Iste koncentracije inhibitora testirane su i u kombinaciji s paklitakselom (40 nM za MDA-MB-231 te 12 nM za Du-145 stanice). Paklitaksel je testiran i samostalno, bez inhibitora.

Po isteku različitih vremena od 4-72h, stanice su inkubirane sa 100 μL 0,5 mg/mL MTT (Merck, Darmstadt, Njemačka) dodanog u medij tijekom 1 sata. Potom je uklonjen medij, dodan je DMSO te je nakon 10 minuta izmjerena apsorbancija na 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Biosan, Schaffhausen, Switzerland).

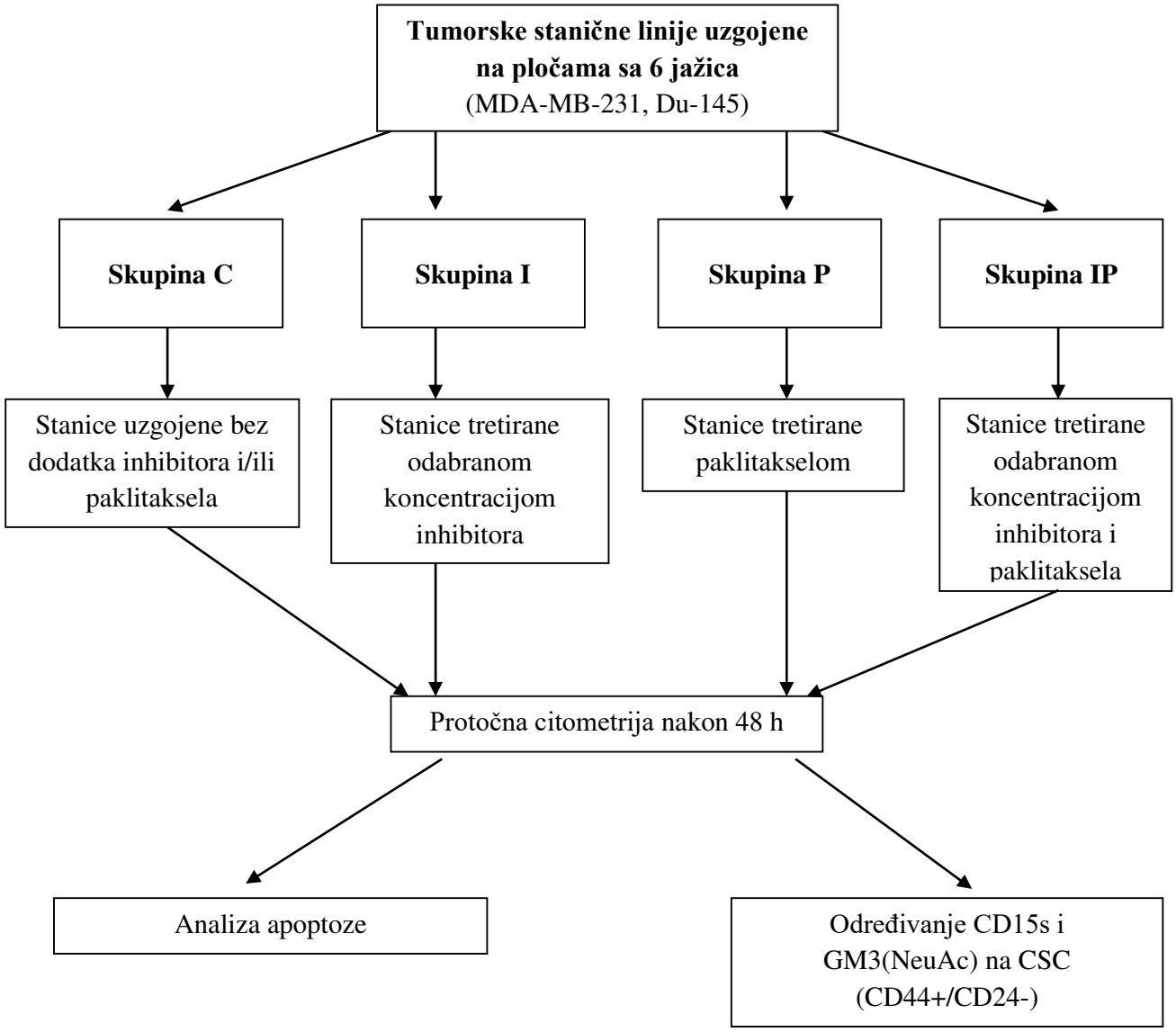
Hodogram istraživanja metaboličke aktivnosti staničnih linija nakon različitih tretmana prikazan je na Slici 17.



Slika 17. Hodogram istraživanja metaboličke aktivnosti staničnih linija nakon različitih tretmana.

B.3.3. Istraživanje biokemijskog mehanizma djelovanja inhibitora

Hodogram istraživanja udjela apoptotskih stanica te izražaja CD15s i GM3(NeuAc) na CSC, koji bi mogli ukazati na mogući biokemijski mehanizam djelovanja inhibitora, prikazan je na slici 18.



Slika 18. Hodogram istraživanja apoptoze u ukupnoj populacijii te izražaja CD15s i GM3(NeuAc) na CSC subpopulaciji.

B.3.3.1. Određivanje postotka apoptotskih stanica

Podjednak broj stanica nasađen je na ploče sa šest jažica. Nakon adheriranja, stanice su tretirane inhibitorom i/ili paklitakselom tijekom 48 sati. Koncentracija inhibitora odabrana je na osnovu prethodnih rezultata MTT testa. Kontrolama je samo zamijenjen medij. Nakon uklanjanja medija, odvajanja stanica djelovanjem tripsina (Lonza, Basel, Švicarska) i ispiranja PBS-om, provedeno je bojenje pomoću PI (propidijeva jodida) i FITC obilježenim protutijelom na Annexin-V, iz seta za određivanje apoptoze (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Mjerenja su provedena na protočnom citometru, a rezultati su analizirani u FlowLogic programu.

B.3.3.2. Određivanje matičnih stanica i staničnog izražaja CD15s i GM3(NeuAc)

Podjednak broj stanica nasađen je na ploče sa šest jažica. Nakon adheriranja, stanice su tretirane inhibitorom i/ili paklitakselom tijekom 48 sati. Koncentracija inhibitora odabrana je na osnovu prethodnog rezultata MTT testa. Kontrolama je samo zamijenjen medij. Nakon uklanjanja medija, tripsinizacije i ispiranja PBS-om, uzorak je predtretiran s Fc receptorom (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) te inkubiran s primarnim protutijelom na CD15s (BD Biosciences), potom sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s kromogenom eFluor 660 (eBioscience, Inc., San Diego, CA, SAD), protutijelom na CD44 konjugiranim s kromogenom FITC (BD Biosciences) i protutijelom na CD24 konjugiranim s kromogenom PE (eBioscience) (159) .

Fluorescencije obojenih uzoraka izmjerene su pomoću protočnog citometra. Podaci su analizirani korištenjem FlowLogic programa.

Određivanje GM3(NeuAc) na CSC provedeno je na isti način kao i prethodno opisano određivanje CD15s, samo što je umjesto protutijela na CD15s dodano primarno protutijelo na GM3 (NeuAc)(Cosmo Bio Co, Tokyo, Japan) nakon čega je uzorak inkubiran sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s kromogenom eFluor 660 (eBioscience, Inc., San Diego, CA, SAD) i već prethodno opisanim protutijelima na CD44 i CD24.

B.3.4. Statistička analiza rezultata pokusa na staničnim linijama raka

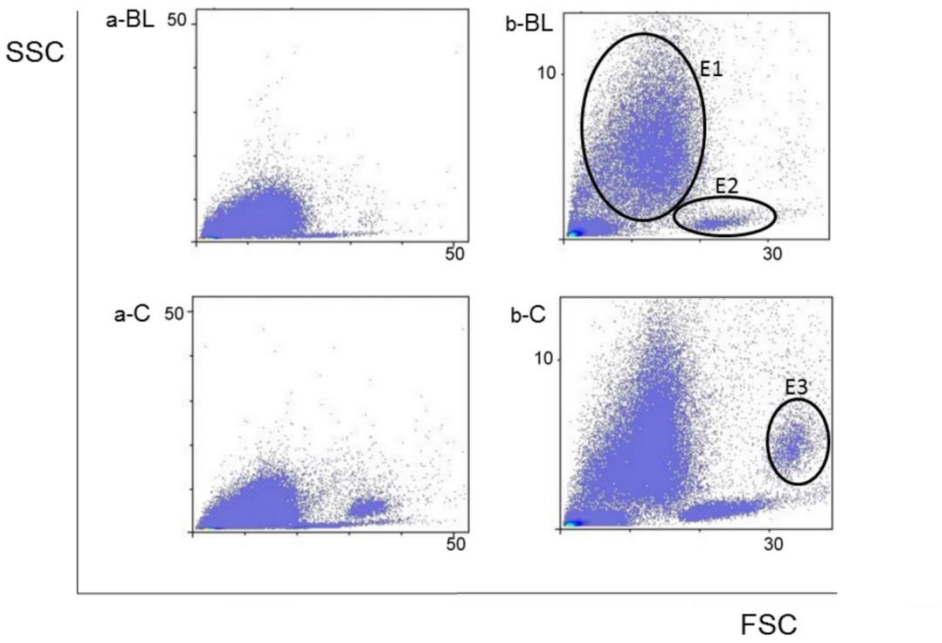
Apsorbancije dobivene MTT testom podijeljene su sa srednjom vrijednošću apsorbancije netretiranih stanica kako bi se dobio postotak preživljenja. Podaci dobiveni protočnom citometrijom analizirani su u FlowLogic programu. Podaci su obrađeni ANOVA testom te *post-hoc* Tukey testom u Statistica programu (for Windows version 7.0; Stat Soft, Tulsa, USA). Statistička značajnost postavljena je na P=0,05.

4. REZULTATI

A.4. Štakorski model infarkta miokarda

A.4.1. Odabir pojedinih leukocitnih subpopulacija u citogramu

Podaci dobiveni protočnom citometrijom analizirani su pomoću FlowLogic programa. Fluorescencija pojedinačnih leukocita prikazana je u citogramima s koordinatnim osima prednje raspršenje, FSC(od engl. *forward scatter*)/ postranično raspršenje, SSC (od engl. *side scatter*) (Slika 19). FSC parametar približno je proporcionalan promjeru, a SSC parametar ukazuje na granuliranost stanice. Citogrami na slici 19 prikazuju sve leukocitne subpopulacije reprezentativnih uzoraka neoperirane i kontrolne skupine (a-BL i a-C), no nije ih moguće razlikovati u navedenom mjerilu. Bolja rezolucija leukocitnih subpopulacija postignuta je selektivnim povećavanjem po pojedinim osima (b-BL i b-C).



Slika 19. Reprezentativna područja granulocita (E1), monocita (E2) i velikih monocita (E3) neoperirane (BL) i kontrolne (C) skupine. Subpopulacija velikih monocita pojavljuje se u kontrolnoj skupini životinja, dok se u neoperiranoj skupini može uočiti tek poneki veliki monocit.

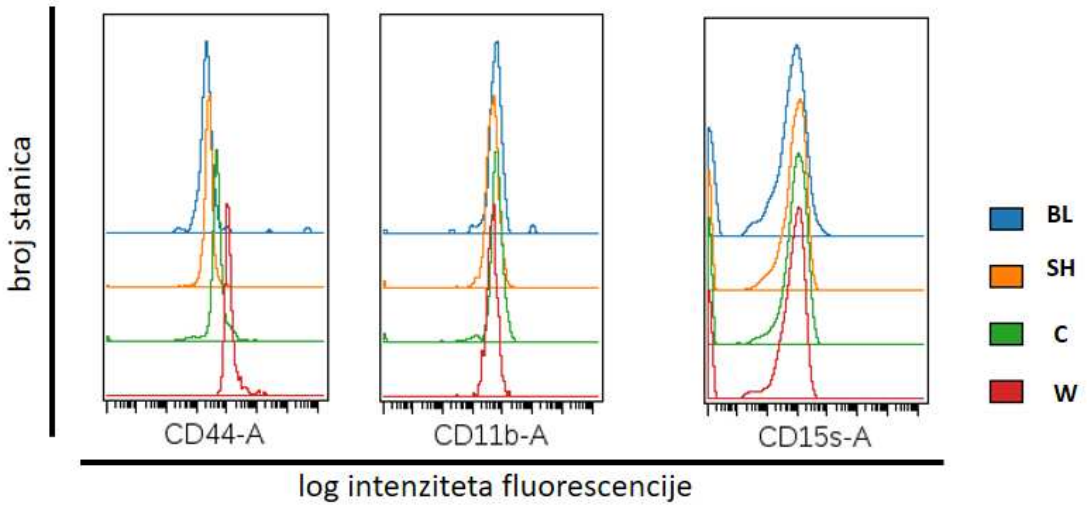
Granulocitna subpopulacija označena je elipsom E1 dok su dvije monocitne subpopulacije s nižim i višim FSC/SSC vrijednostima označene elipsama E2 i E3, slijedom. Aktivirani monociti mogu biti povećani budući da su prepunjeni sekretornim mješinicama koje dovode CD15s na njihovu površinu (13,14,26). Limfociti nisu istraživani ovom studijom zbog

njihova slabijeg izražaja biljega CD15s. Smatra se da je njihovo vezivanje za endotelne stanice krvnih žila posredovano nekim drugim ligandom (164).

Položaj limfocita na citogramima slike je u lijevim uglovima, dolje lijevo od granulocita. Limfociti su priljubljeni uz ostatke eritrocita koji se nalaze uz samo ishodište citograma. Ovakav raspored štakorskih limfocita i ostataka eritrocita unutar citograma pojavljuje se kad se nakon lize eritrocita ne provodi njihovo odvajanje centrifugiranjem (165).

A.4.2. Veliki monociti

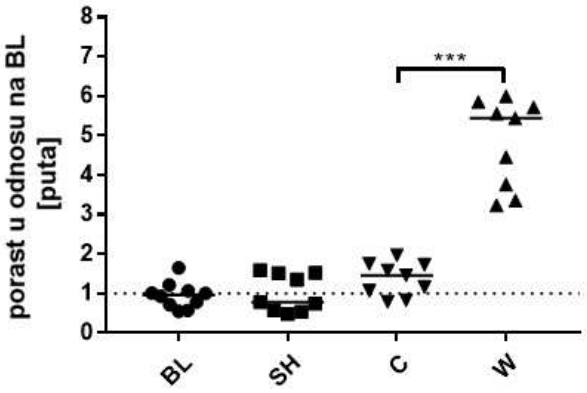
Izražaji biljega CD44, CD11b i CD15s na velikim monocitima određeni su metodom protočne citometrije te prikazani histogramima fluorescencije (Slika 20).



Slika 20. Histogrami fluorescencije biljega CD44, CD11b i CD15s na velikim monocitima. Prikazani su izlazni podaci dobiveni protočnom citometrijom iz kojih su nakon statističke obrade dobiveni omjeri promjena izražaja u odnosu na BL skupinu (prikazani na slikama 21 i 22).

Iz ovih izlaznih podataka dobiveni su omjeri promjena izražaja u odnosu na BL skupinu (prikazani na slikama 21 i 22).

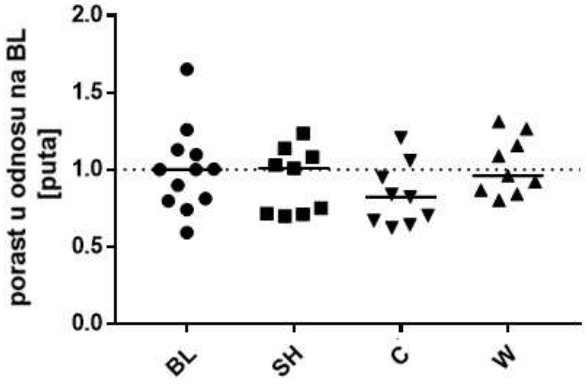
Izražaj CD44 na velikim monocitima štakora koji su pili vino (W) bio je povećan 3,9 puta ($P<0,001$) u odnosu na skupinu koja je pila samo vodu (C). 95% interval pouzdanosti, CI (od engl. *confidence interval*) bio je od 2,28 do 4,82. Izražaj CD44 kod kontrolne skupine (C) nije se razlikovao u odnosu na životinje iz SH ili BL skupina (Slika 21). Nadalje, usporedba BL i SH skupina nije otkrila razliku u izražaju CD44 na velikim monocitima.



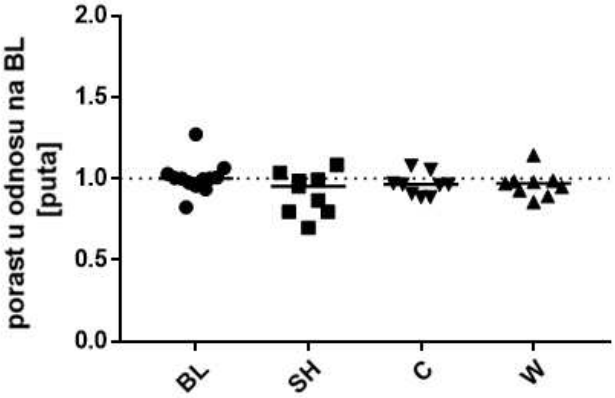
Slika 21. Izražaj CD44 na velikim monocitima u odnosu na BL skupinu. Medijan intenziteta fluorescencije (MFI) svake skupine normaliziran je i predstavljen kao omjer promjena u odnosu na BL. Podaci za svaku subpopulaciju predstavljeni su u dijagramu s označenim medijanima.
*P<0,05; ***P<0,001.

Za razliku od CD44, na razinu izražaja CD11b i CD15s nisu utjecali ni konzumacija vina, kao ni infarkt miokarda (Slika 22).

A



B



Slika 22. Izražaj CD11b (A) i CD15s (B) na velikim monocitima u odnosu na BL skupinu. Medijan intenziteta fluorescencije (MFI) svake skupine normaliziran je i predstavljen kao omjer promjena u odnosu na BL. Podaci za svaku subpopulaciju predstavljeni su u dijagramima s označenim medijanima.
*P<0,05;***P<0,001.

Nisu pronađene razlike u postotku pojedinih subpopulacija velikih monocita (CD44+, CD11b+, CD15s+ i CD44+CD11b+) između pokusnih skupina (Tablica 1).

Tablica 1. Subpopulacije leukocita

Pokusne skupine								
	Neoperirani		Prividno operirani		Kontrola		Vino	
Veliki monociti	Medijan	IQR	Medijan	IQR	Medijan	IQR	Medijan	IQR
CD44+ (%)	98,6	96,93-99,89	99,2	98,01-99,23	97,5	95-99,55	99,4	96,75-99,7
CD15s+ (%)	20,5	16,15-35,15	16,77	13,88-35	30,4	25,8-36,05	31,4	23,65-36,05
CD11b+ (%)	98,23	97,23-99,57	99,04	98,3-99,6	98	96,75-99,45	99,4	95,95-99,45
CD44+CD11b+ (%)	95,98	93,55-98,23	98,16	95,74-98,83	97,7	97,17-98,84	95,54	92,63-97,4
Monociti								
CD44+ (%)	64*b*	21,7-67,7	45,83*b*	27,5-54,66	35,2*a, b*	18,85-43	66,7*a*	61,25-71,1
CD15s+ (%)	21,92	17,22-36,53	14,17	12,29-38,9	32,9	29,6-39,8	30,9	27,3-34,05
CD11b+ (%)	50,1	28,36-54,03	27,11	20,18-54,6	40,5	33,7-58,8	49,9	46,5-57,45
CD44+CD11b+ (%)	12,4	9,31-13,1	8,9	7,6-13,26	11,22	9,88-15,74	11,13	9,4-17,73
Granulociti								
CD44+ (%)	4,61	1,49-14,97	3,72	2,17-6,22	2,51 *a*	1,91-4,97	13,29 *a*	5,66-15
CD15s+ (%)	24,21	23,15-29,08	24,86	16,7-32,96	27,35	25,12-29,3	27,57	26,4-29,39
CD11b+ (%)	12,94	10,78-15,97	13,53	5,51-18,37	12,72	7,45-15,27	10,24	8,35-10,98
CD44+CD11b+ (%)	0,46	0,19-1,04	0,24	0,15-0,58	0,48	0,30-0,62	0,48	0,30-0,62

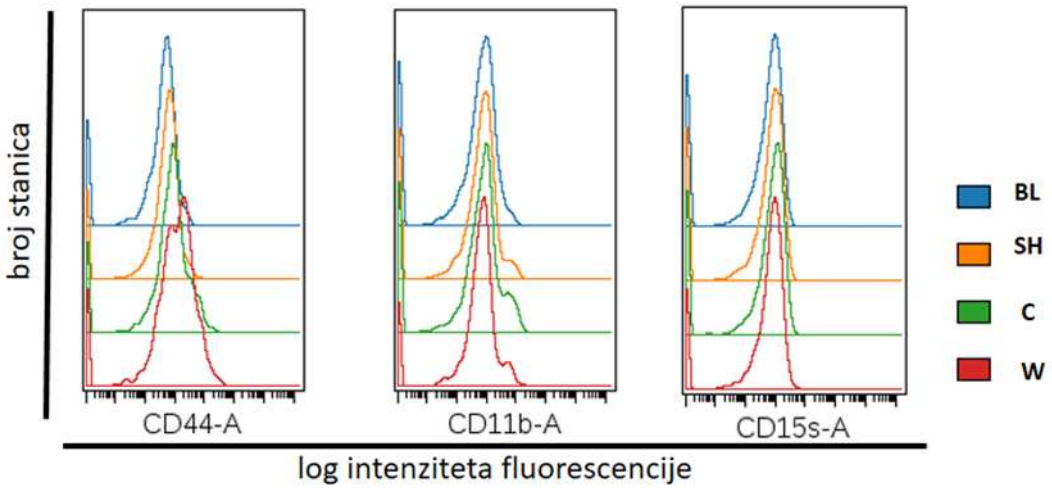
IQR- interkvartilni raspon (od engl. *Interquartile Range*)

a- P<0,05 za vino vs. kontrolna skupina

b- P<0,05 za trend između BL, SH i C skupina

A.4.3. Monociti

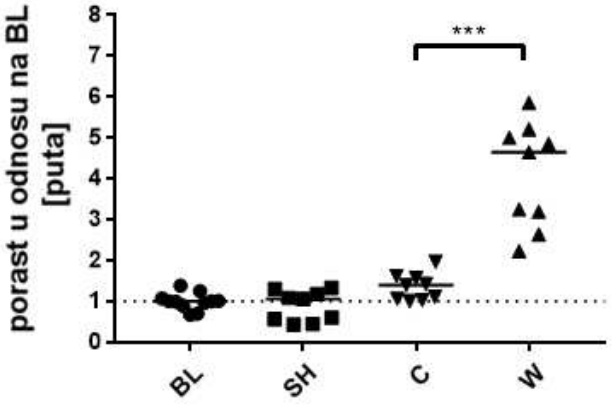
Izražaji biljega CD44, CD11b i CD15s na monocitima određeni su metodom protočne citometrije te prikazani histogramima fluorescencije (Slika 23).



Slika 23. Histogrami fluorescencije biljega CD44, CD11b i CD15s na monocitima. Prikazani su izlazni podaci dobiveni protočnom citometrijom iz kojih su nakon statističke obrade dobiveni omjeri promjena izražaja u odnosu na BL skupinu (prikazani na slikama 24 i 25).

Iz ovih izlaznih podataka dobiveni su omjeri promjena izražaja u odnosu na BL skupinu (prikazani na slikama 24 i 25).

Konzumacija bijelog vina uzrokovalo je 3,2 puta veći izražaj CD44 na monocitima (95% CI 1,569 do 3,86, P<0,0001) u odnosu na kontrolnu skupinu koja je konzumirala samo vodu (Slika 24).



Slika 24. Izražaj CD44 na monocitima u odnosu na BL skupinu. Medijan intenziteta fluorescencije (MFI) svake skupine normaliziran je i predstavljen kao omjer promjena u odnosu na BL. Podaci za svaku subpopulaciju predstavljeni su u dijagramu s označenim medijanima.
*P<0,05; ***P<0,001.

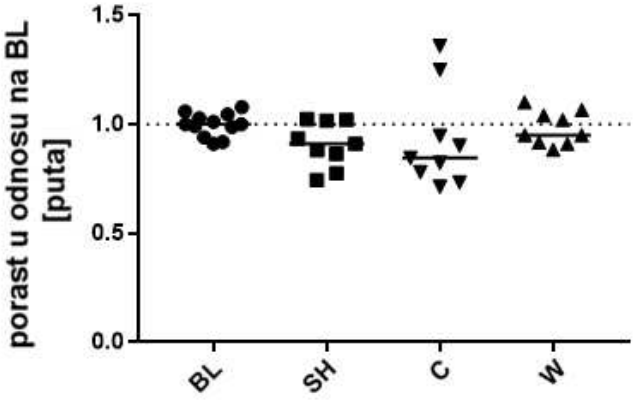
Životinje iz BL i SH skupina imale su razinu izražaja CD44 sličnu kontrolnoj skupini (Slika 24).

Izražaj CD11b na monocitima bio je sličan kod svih pokusnih skupina (Slika 25).

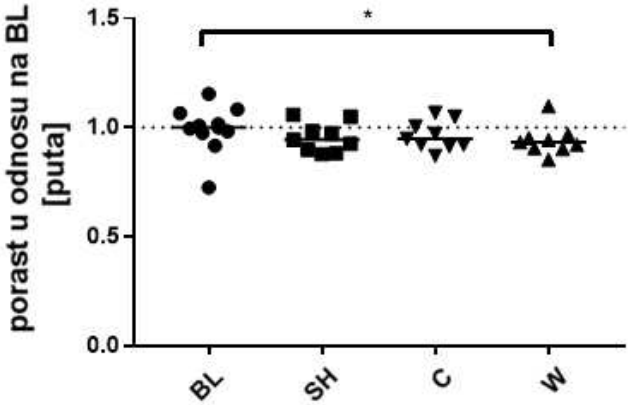
Izražaj CD15s bio je smanjen 0,06 puta (95% CI 0,12 do 0,01, P<0,05) kod životinja koje su pile vino (W) u odnosu na BL skupinu. SH i C skupine su pokazale sličan trend, ali razlike nisu bile statistički značajne (Slika 25).

Postotak CD44+ monocita postepeno se snižavao, ovisno o težini zahvata i ozbiljnosti ozljede, polazeći od BL preko SH do C skupine (prosječni pad=8,75%, 95% CI -17,59 do -0,24, p<0,05) (Tablica 1). Kod W skupine nije primijećeno smanjenje, vrijednosti su ostale praktički identične vrijednostima BL skupine.

A



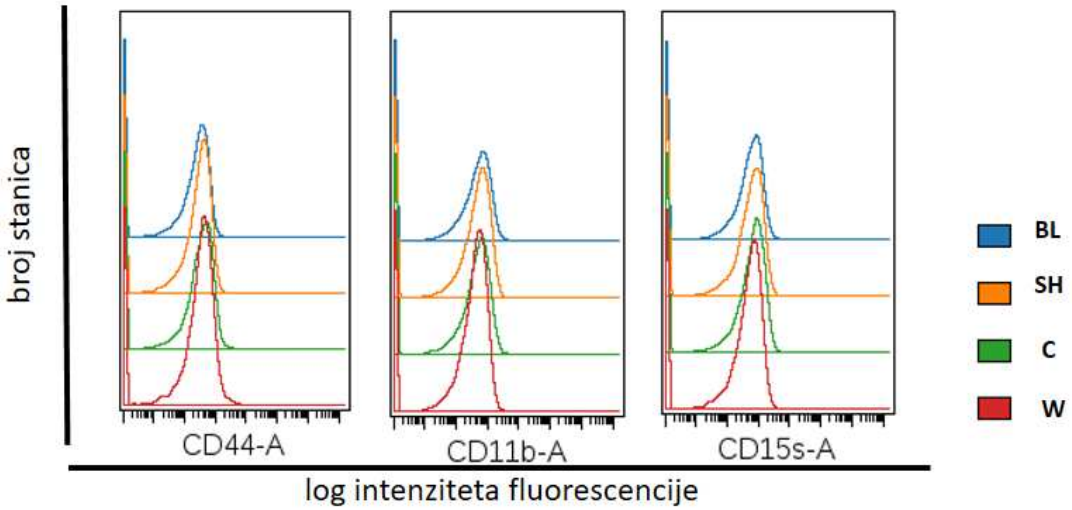
B



Slika 25. Izražaj CD11b (A) i CD15s (B) na monocitima u odnosu na BL skupinu. Medijan intenziteta fluorescencije (MFI) svake skupine normaliziran je i predstavljen kao omjer promjena u odnosu na BL. Podaci za svaku subpopulaciju predstavljeni su u dijagramima s označenim medijanima.
*P<0,05; ***P<0,001.

A.4.4. Granulociti

Izražaji biljega CD44, CD11b i CD15s na granulocitima određeni su metodom protočne citometrije te prikazani histogramima fluorescencije (Slika 26).

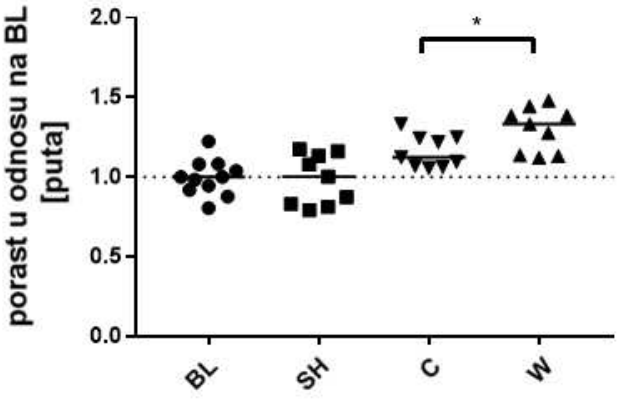


Slika 26. Histogrami fluorescencije biljega CD44, CD11b i CD15s na granulocitima. Prikazani su izlazni podaci dobiveni protočnom citometrijom iz kojih su nakon statističke obrade dobiveni omjeri promjena izražaja u odnosu na BL skupinu (prikazani na Slikama 27 i 28).

Iz ovih izlaznih podataka dobiveni su omjeri promjena izražaja u odnosu na BL skupinu (prikazani na slikama 27 i 28).

Izražaj CD44 na granulocitima u W skupini bio je neznatno povišen (0,2 puta, 95% CI 0,29 do 0,02, P<0,05) u usporedbi sa skupinom koja je konzumirala samo vodu (Slika 27).

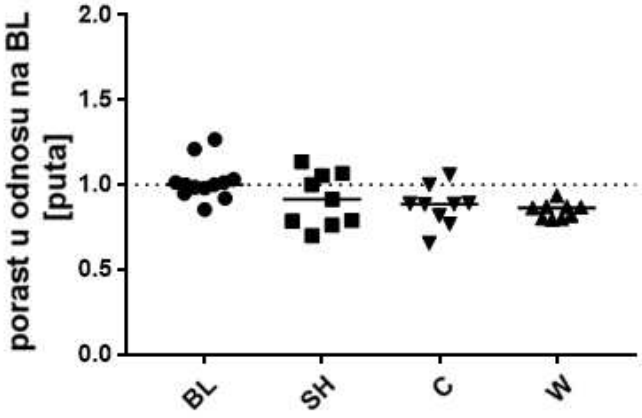
Postotak CD44+ granulocita bio je najveći u W skupini i značajno se razlikovao od postotka u skupini koja je konzumirala samo vodu (Tablica 1).



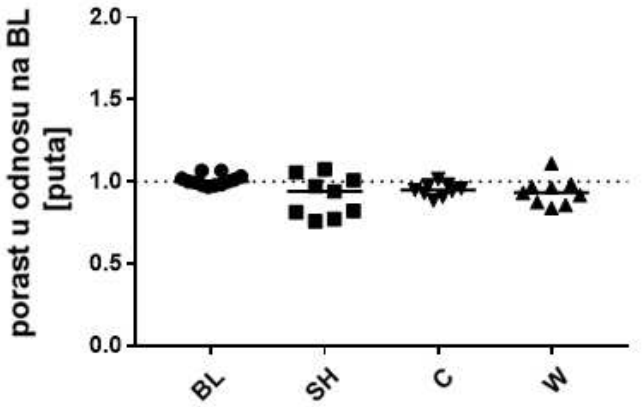
Slika 27. Izražaj CD44 na granulocitima u odnosu na BL skupinu. Medijan intenziteta fluorescencije (MFI) svake skupine normaliziran je i predstavljen kao omjer promjena u odnosu na BL. Podaci za svaku subpopulaciju predstavljeni su u dijagramu s označenim medijanima.
*P<0,05; ***P<0,001.

Nisu primijećene razlike u granulocitnom izražaju CD11b i CD15s između pokusnih skupina (Slika 28).

A



B



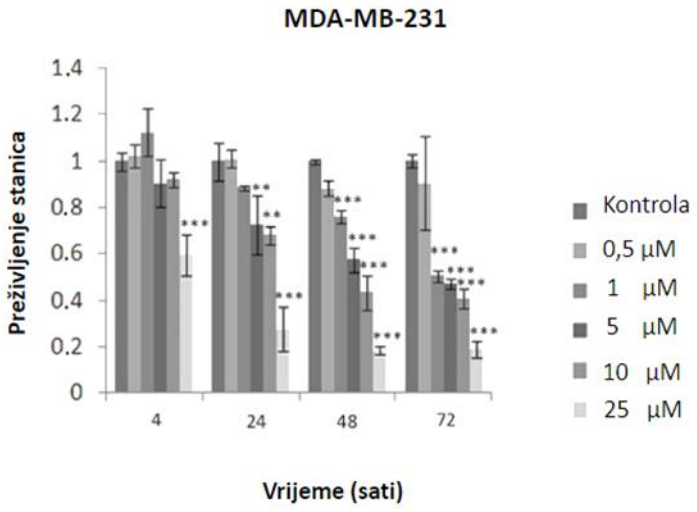
Slika 28. Izražaj CD11b (A) i CD15s (B) na granulocitima u odnosu na BL skupinu. Medijan intenziteta fluorescencije (MFI) svake skupine normaliziran je i predstavljen kao omjer promjena u odnosu na BL. Podaci za svaku subpopulaciju predstavljeni su u dijagramima s označenim medijanima.
*P<0,05;***P<0,001.

B.4. Stanični modeli raka

B.4.1. Citotoksično djelovanje inhibitora ovisno o vremenu i koncentraciji

Preživljenje stanica nakon 4, 24, 48 i 72 sata usporedili smo korištenjem MTT testa (Slike 25-28). Iz rezultata dobivenih MTT testom izračunata je koncentracija inhibitora kojom se postiže 50%-tna inhibicija rasta (IC_{50}). Kod MDA-MB-231 stanica, djelovanje inhibitora u trajanju od 24, 48 i 72 sata rezultiralo je vrijednostima IC_{50} 10,9, 9,5 i 6,7 µM, slijedom. IC_{50} vrijednost za Du-145 stanice bila je 5,1 µM nakon tretmana od 72 sata. Nisu izračunate IC_{50} vrijednosti za druga vremena budući da su rezultati smanjenja preživljenja za svih 5 korištenih koncentracija bili niži ili viši od 50%. Tako da nije postojao značajan raspon u razlici preživljenja između najniže i najviše koncentracije inhibitora koji je nužan za provođenje izračuna.

Na slici 29, uočljivo je da je usporavanje rasta MDA-MB-231 stanica bilo ovisno o koncentraciji inhibitora i vremenu izloženosti istome. Nakon četverosatnog tretmana, samo je 25 µM koncentracija inhibitora pokazala značajan utjecaj na smanjenje staničnog preživljenja u usporedbi s netretiranim stanicama. Nakon 24 satnog tretmana 5 µM koncentracijom, uočeno je značajno smanjenje preživljenja, kao i nakon 48 satnog tretmana 1 µM koncentracijom (Slika 29).

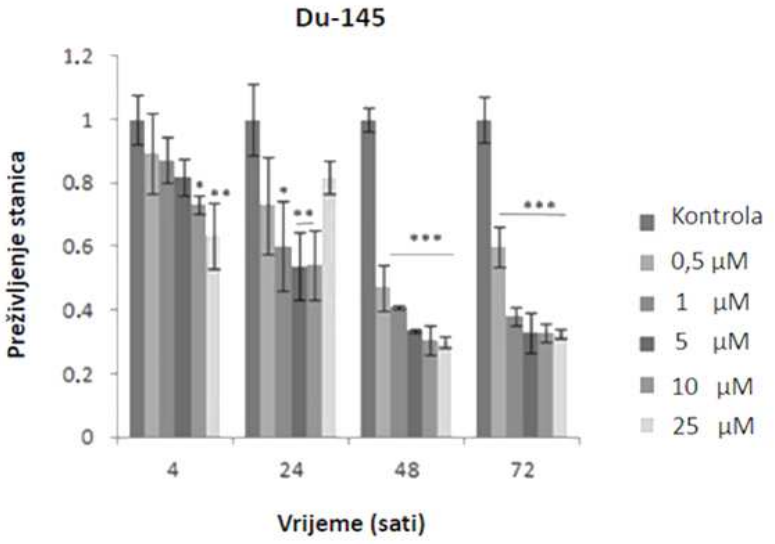


Slika 29. Rezultati preživljenja MDA-MB-231stanica nakon MTT testa**.** 100% preživljenje stanica =1.

* P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001.

Nakon četverosatnog tretmana, inhibitor je u koncentracijama 10 µM i 25 µM pokazao značajan utjecaj na smanjenje staničnog preživljenja Du-145 stanica u usporedbi s netretiranim stanicama (Slika 30). Du-145 stanice pokazale su slično preživljenje nakon 24 sata kao i MDA-MB-

231 stanice, uz iznimku 25 µM koncentracije kod koje je zamijećeno veće preživljenje u odnosu na primjenu inhibitora u nižim koncentracijama. Razlog tomu može biti slabija topljivost inhibitora pri višim koncentracijama, kada može doći do stvaranja suspenzije koja smanjuje aktivnu koncentraciju spoja u otopini. Nakon 48 i 72 sata, niže koncentracije inhibitora bile su citotoksičnije za Du-145 stanice negoli za MDA-MB-231 stanice (Slika 30).

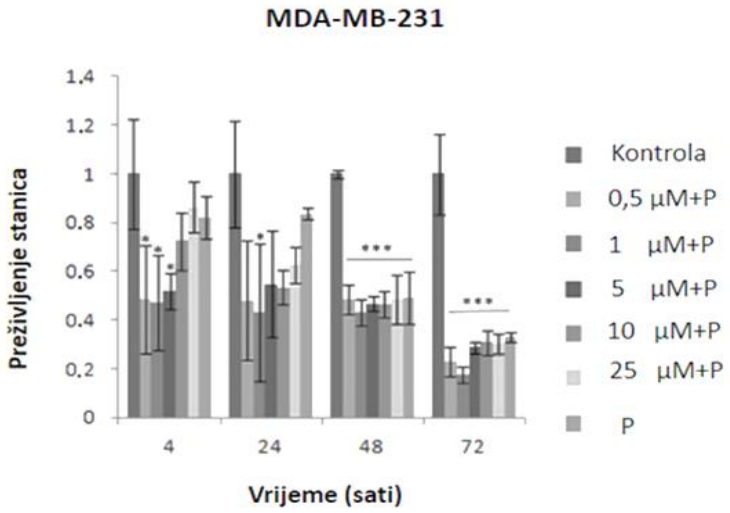


Slika 30. Rezultati preživljenja Du-145 stanica nakon MTT testa. 100% preživljenje stanica =1.

* P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001.

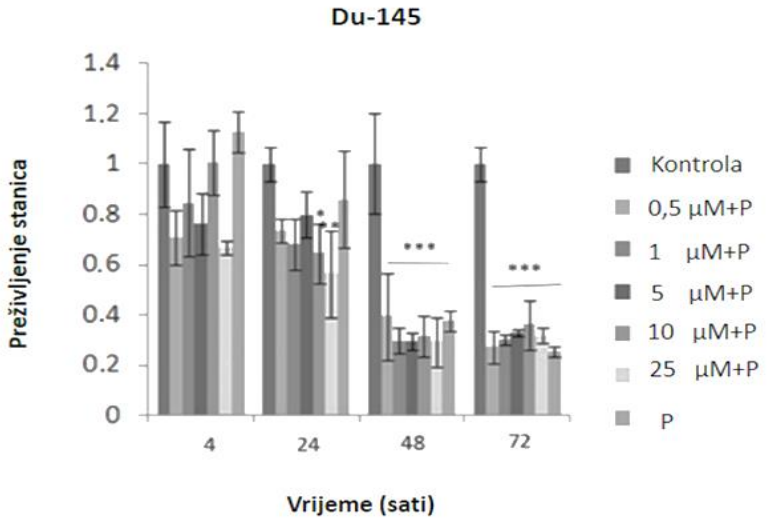
MTT test je proveden i nakon tretmana paklitakselom te nakon tretmana kombinacijom paklitaksela i različitih koncentracija inhibitora. Četverosatni tretman kombinacijom 40 nM paklitaksela i inhibitora koncentracija 0,5, 1 i 5 µM, smanjio je preživljenje MDA-MB-231 stanica. Nakon 24 sata, smanjeno preživljenje primijećeno je primjenom 1 µM inhibitora i paklitaksela, dok je kod Du-145 stanica isti učinak zapažen primjenom viših koncentracija inhibitora (10 i 25 µM) u kombinaciji s 12 nM paklitakselom. Kod MDA-MB-231 stanica, paklitaksel je u kombinaciji s višim koncentracijama inhibitora pokazao antagonistički utjecaj tj. povećano preživljenje stanica.

Značajno smanjeno preživljenje stanica utvrđeno je kod obiju staničnih linija nakon tretmana tijekom 48 i 72 sata za sve koncentracije inhibitora u kombinaciji s paklitakselom. Kod svih kombiniranih tretmana, izgubljena je pravilnost ovisnosti citotoksičnosti o koncentraciji inhibitora kod obiju staničnih linija. Niže koncentracije inhibitora (0,5 i 1 µM) bile su djelotvornije kod kombiniranog tretmana stanica (slike 31 i 32).



Slika 31. Rezultati preživljenja MDA-MB-231 stanica nakon MTT testa. 100% preživljenje stanica =1, P=paklitaksel.

* P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001.



Slika 32. Rezultati preživljenja Du-145 stanica nakon MTT testa. 100% preživljenje stanica =1, P= paklitaksel.

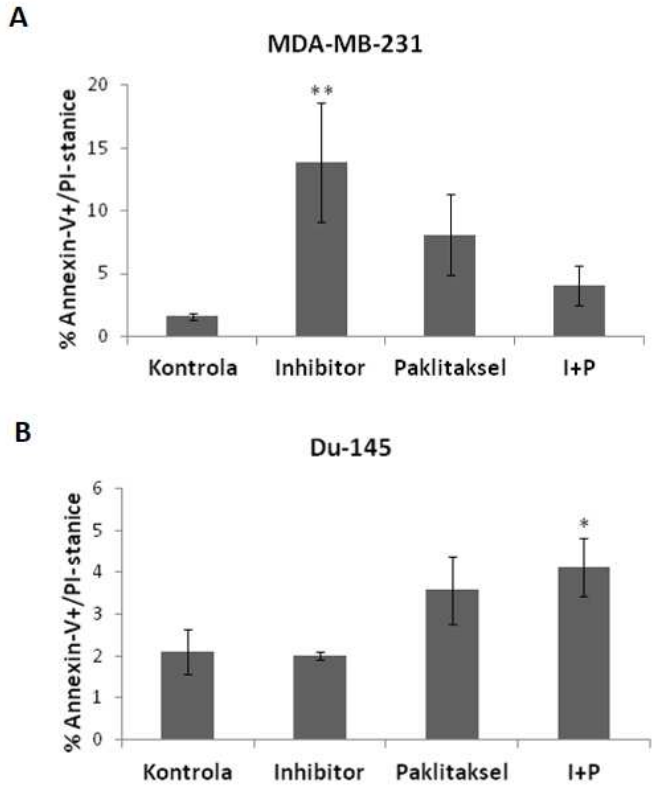
* P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001.

Nakon provedbe MTT testova, odlučili smo primijeniti 2 µM koncentraciju inhibitora PLC za analizu apoptoze i glikofenotipa CSC stanica. Pri tome smo se rukovodili rezultatima preživljenja stanica nakon tretmana 1 µM koncentracijom inhibitora tijekom 48 sati. Srednja vrijednost preživljenja za MDA-MB-231 stanice bila je 75,96 % a za Du-145 40,7%. Prema Yang i sur. (166),

željeli smo primjenom što niže koncentracije postići značajne promjene u svim nadalje ispitivanim parametrima (apoptozi, postocima CSC unutar ukupnih populacija te postocima subpopulacija CSC pozitivnih na biljege CD15s i GM3(NeuAc)) uz istovremeno preživljenje dovoljnog broja stanica za provođenje svih analiza.

B.4.2. Karakterizacija apoptotskih stanica

Postotak apototičnih stanica (aneksin-V+/ PI-) određivan je nakon 48 satnog tretmana 2 μM inhibitorom i/ili paklitakselom (40 nM za rak dojke i 12 nM za rak prostate). U usporedbi s kontrolom, značajno se povećao postotak MDA-MB-231 apoptotičnih stanica (Slika 33A). Postotak Du-145 apoptotskih stanica nije bio promijenjen nakon tretmana istim inhibitorom. Bio je statistički neznačajno povećan nakon tretmana paklitakselom te statistički značajno povećan nakon tretmana kombinacijom inhibitora i paklitaksela (Slika 33B).



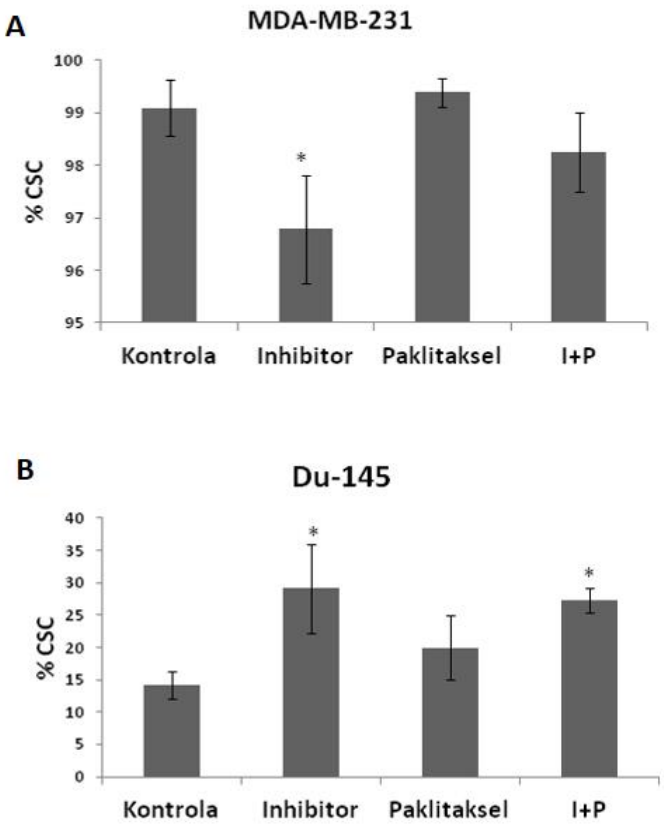
Slika 33. Postotak apoptotskih stanica (aneksin-V+/PI-) u MDA-MB-231 (A) i Du-145 (B) tumorskim linijama. Apoptoza nakon tretmana 48 sati samim inhibitorom, paklitakselom ili kombinacijom inhibitora i paklitaksela (I+P).

* P<0,05; ** P<0,01.

B.4.3. Djelovanje inhibitora na postotak matičnih stanica raka

Nakon tretmana inhibitorom, kod MDA-MB-231 stanica došlo je do blagog, ali statistički značajnog smanjenja CSC (99,09±0,53 do 96,78±1.03). Paklitaksel je izazvao statistički neznačajno povećanje postotka CSC u objema staničnim linijama. Kombinirani tretman poništio je učinak inhibitora na sniženje CSC kod MDA-MB-231 stanica. Paklitaksel je očito više povećao postotak CSC nego što je inhibitor smanjio (Slika 34A).

Inhibitor je, primijenjen samostalno ili u kombinaciji, značajno povećao postotak CSC subpopulacije kod Du-145 stanica u usporedbi s kontrolom (Slika 34B).

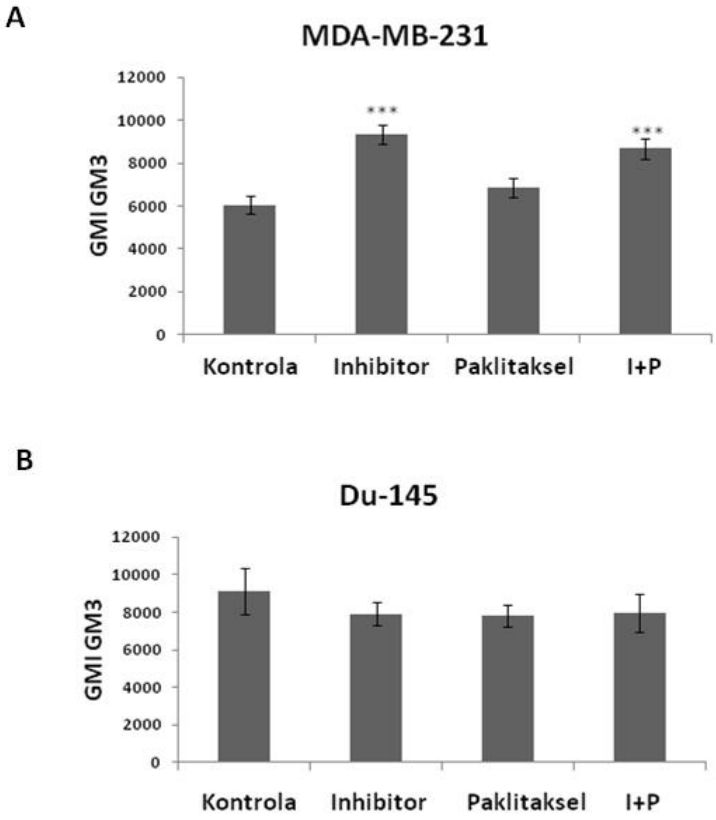


Slika 34. Postotak matičnih stanica raka (CSC) u MDA-MB-231 (A) i Du-145 (B) tumorskim linijama nakon tretmana 48 sati samim inhibitorom, paklitakselom ili njihovom kombinacijom (I+P).

* P<0,05.

B.4.4. Djelovanje inhibitora na izražaj GM3(NeuAc) na matičnim stanicama raka i na postotak GM3(NeuAc)+ subpopulacije matičnih stanica raka

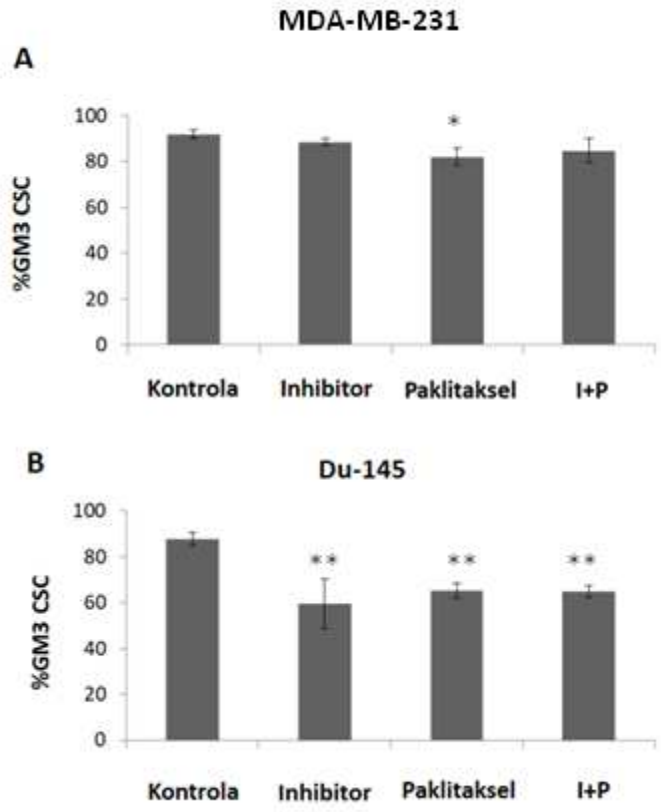
Istražili smo izražaj gangliozida GM3(NeuAc) kako bismo utvrdili utječe li inhibitor na sadržaj GM3(NeuAc), poznatog inhibitora receptora čimbenika rasta u plazma membranama. Izražaj GM3(NeuAc) po jednoj stanici, izražen parametrom GMI, bio je povećan kod CSC subpopulacije MDA-MB-231 stanica nakon tretmana inhibitorom dok je kod Du-145 stanica bio nepromijenjen (Slika 35).



Slika 35. Izražaj (GMI) za GM3(NeuAc) na matičnim stanicama MDA-MB-231 (A) i Du-145 (B) tumorskih linija nakon tretmana 48 sati samim inhibitorom, paklitakselom ili njihovom kombinacijom (I+P).

*** P<0,001.

Međutim, inhibitor nije utjecao na postotak GM3(NeuAc)+CSC unutar ukupne CSC subpopulacije MDA-MB-231 stanica (Slika 36A), ali je sam ili u kombinaciji s paklitakselom , smanjio postotak GM3(NeuAc)+CSC unutar ukupne CSC subpopulacije Du-145 stanica (Slika 36B).

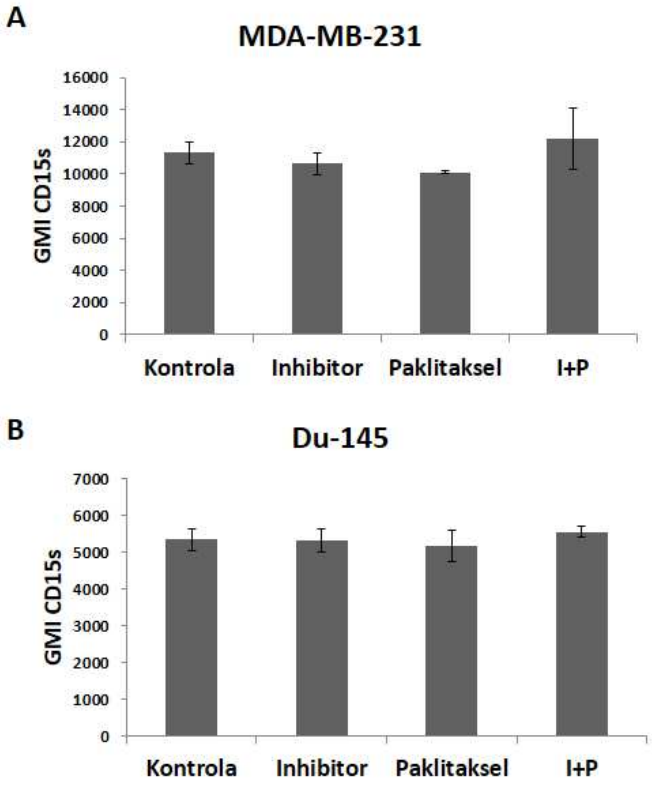


Slika 36. Postotak GM3(NeuAc)+CSC u MDA-MB-231 (A) i Du-145 (B) tumorskim linijama nakon tretmana 48 sati samim inhibitorom, paklitakselom ili njihovom kombinacijom (I+P).

* P<0,05; ** P<0,01.

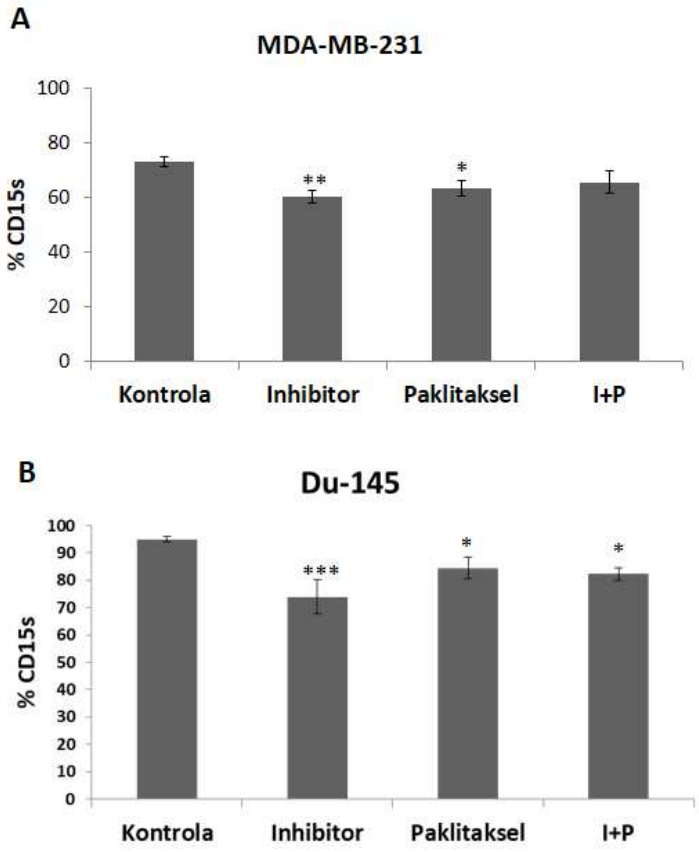
B.4.5. Djelovanje inhibitora na izražaj CD15s i na postotak CD15s+ subpopulacije matičnih stanica raka

Metastatski biljeg tumorskih stanica CD15s omogućava njihovu infiltraciju u različita tkiva. Tretman inhibitorom nije utjecao na izražaj CD15s na CSC obiju staničnih linija (Slika 37).



Slika 37. Izražaj (GMI) za CD15s na matičnim stanicama MDA-MB-231 (A) i Du-145 (B) tumorskih linija nakon tretmana 48 sati samim inhibitorom, paklitakselom ili njihovom kombinacijom (I+P).

Inhibitor je snizio postotak CD15s+CSC unutar ukupne CSC subpopulacije obiju staničnih kultura. Kombinirani tretman paklitakselom snizio je postotak CD15s+CSC unutar ukupne CSC subpopulacije samo u kulturi Du-145 stanica (Slika 38).



Slika 38. Postotak CD15s+CSC u MDA-MB-231 (A) i Du-145 (B) tumorskim linijama nakon tretmana 48 sati samim inhibitorom, paklitakselom ili njihovom kombinacijom (I+P).

* P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001.

5. RASPRAVA

A. Štakorski model infarkta miokarda

Cilj ove studije bio je procijeniti utjecaj četverotjedne konzumacije bijelog vina na izražaj granulocitnih i monocitnih upalnih markera (CD15s, CD11b i CD44), 24 sata nakon kirurški izazvanog infarkta miokarda.

Humoralni upalni parametri mogu poslužiti za procjenu efikasnosti akutne faze zacjeljivanja infarkta. Kako bi se utvrdilo utječe li novoprimijenjeni kirurški pristup na izražaj upalnih biljega, u istraživanje je bila uključena i prividno operirana skupina životinja (SH) te su rezultati uspoređeni s neoperiranim životinjama (BL). Nije bilo razlika ni u postotku pojedinih subpopulacija niti u medijanu intenziteta fluorescencije (MFI) između skupina. Stoga je ovo ohrabrujući dokaz da je novoprimijenjeni transdijafragmalni pristup štakorskom srcu minimalno invazivan kirurški model infarkta miokarda. Ne samo da omogućava pristup u medijastinum skoro bez krvarenja, već i sprječava izazivanje značajnih promjena u neutrofilnim i monocitnim upalnim biljezima u cirkulaciji.

Životinjski modeli ukazuju da monocitne subpopulacije koordiniraju započinjanje i zaključenje upale kao i proces zacjeljivanja nakon infarkta miokarda (77). Odmah nakon nastupanja ishemije, može se otkriti brza infiltracija leukocita u oštećeni mišji miokard (167,168). Da bi se zaključila upala koja slijedi nakon infarkta miokarda, potrebno je koordinirano međudjelovanje izvanstaničnog matriksa, neutrofila i monocita (36). Intravitalnom mikroskopijom kucajućeg mišjeg srca, uočena je prisutnost monocita unutar 30 minuta nakon infarkta miokarda. Monociti se najprije regrutiraju iz vaskularnog rezervoara, a kasnije iz slezene (167). U kliničkom modelu akutnog infarkta miokarda, analize krvi pacijenata s transkoronarnom ablacijom septalne hipertrofije pokazale su povišen broj polimorfonuklearnih neutrofila nakon 15 minuta, sa značajnim porastom od 2. sata, dok se broj monocita najprije smanjuje, a nakon 8 sati počinje rasti sa značajnom monocitozom nakon 24 sata (169). U skladu s opisanom dinamikom regrutiranja leukocita, u ovom istraživanju leukocitnih adhezijskih molekula izabran je vremenski okvir od 24 sata nakon infarkta miokarda.

Početno vezanje neutrofilnih i monocitnih CD15s glikoantigena za površinu endotelnih stanica je slabo jer se vezanje postiže samo putem endotelnog selektina (48). Nakon toga slijedi čvrsta adhezija uslijed vezanja CD11b za endotelni ICAM-1 (170). U ovoj je studiji uočeno smanjenje izražaja CD15s na monocitima povezano s konzumacijom vina. Nalaz je u skladu s rezultatima Sacanella i suradnici koji su uočili smanjenje CD11b i CD15s na monocitima kod zdravih žena nakon umjerene konzumacije bijelog vina (109) .

Uloga neutrofilnog i monocitnog CD44 receptora ključna je nakon što te stanice prođu endotelnu barijeru, kada CD44 međudjeluje s hijaluronatom izvanstaničnog matriksa. Izražaj CD44 je izrazito induciran u miokardu koji je doživio infarkt i to na infiltrirajućim leukocitima,

miofibroblastima te krvožilnim stanicama. Nedostatak CD44 kod miševa s izbačenim genom za CD44 korelira s produljenom infiltracijom neutrofila i makrofaga i povećanim izražajem proupalnih citokina u infarktom zahvaćenom miokardu (171). Osim uloge u regulaciji upalnog odgovora nakon infarkta, međudjelovanje hijaluronata i CD44 ima ulogu u stvaranju fibroznog tkiva i srčanom remodeliranju (171). Dobro je poznato da infarkt miokarda izaziva poremećaj hijaluronatne mreže miokarda (172). Hijaluronat je ključan za strukturno održavanje tkiva i regulaciju upale (80). Tijekom prvih 1-2 tjedna nakon MI, važan je proces razgradnje izvanstaničnog matriksa, uključujući infarktom pokidane lance hijaluronata (79). Nakon vezanja monocitnog CD44 i hijaluronata izvanstaničnog matriksa, monociti su potaknuti na izlučivanje citokina koji stimuliraju proliferaciju fibroblasta i njihovu transformaciju u miofibroblaste. Miofibroblasti sintetiziraju kolagen i hijaluronat koji se izlučuju u izvanstanični matriks te se time postiže remodeliranje srčanog tkiva. Uloga CD44 dokazana je i pokusima s anti-CD44. Protutijelo blokira migraciju fibroblasta po privremenim proteinima matriksa (fibronektinu i fibrinogenu) kao i hijaluronatu te izaziva apoptozu fibroblasta (173,174). Međudjelovanja CD44-hijaluronat izazivaju apoptozu neutrofila te skraćuju upalu što može poboljšati funkciju lijevog ventrikula (175). Nedostatak CD44 povećava dilataciju infarciranog srca koja uzrokuje smanjeno odlaganje kolagena pa je zacjeljivanje manjkavo (171). Kolagenska vlakna i potpuni hijaluronatni lanci unutar proteoglikana inače formiraju vrlo uređene strukture izvanstaničnog matriksa, držeći se ionskim interakcijama. Hijaluronatni i ostali glikozaminoglikanski lanci proteoglikana su polianioni. Njihov negativni naboj potječe od ponavljajućih glukuronatnih ili uronatnih ostataka te sulfatiranih monosaharidnih ostataka, dok su kolagenska vlakna polikationi s ponavljajućim pozitivno nabijenim bočnim ograncima lizilnih ostataka (42). Upravo zbog svih navedenih učinaka CD44 kod oporavka miokarda nakon MI, posebna pozornost u ovom istraživanju bila je usmjerena na analizu CD44+ granulocitnih i monocitnih subpopulacija. Konzumacija vina izazvala je upečatljivo povećanje izražaja CD44 kod obiju analiziranih subpopulacija monocita (uobičajene veličine i velikih). Skoro su svi (96%) veliki monociti iz W skupine bili CD11b+CD44+, dakle zahvaljujući izražaju CD11b, sposobni ući u srčano tkivo. Izražaj CD44 po pojedinačnom velikom monocitu, bio je otprilike četiri puta veći u odnosu na kontrolu koja je pila vodu. Osim toga, izražaj CD44 bio je otprilike tri puta veći i kod običnih monocita u skupini W u odnosu na skupinu C. Ovo je vrlo specifičan nalaz uzrokovan konzumacijom vina. Neutrofili i monociti stvaraju upalni mikrookoliš koji je ključan za novačenje progenitornih srčanih stanica i popravak ozlijeđenog miokarda (36,120).

Koristeći identični model infarkta miokarda i pijenja bijelog vina pred infarkt, Ključević i suradnici procjenjivali su ranu fazu (upalnu) cijeljenja. Kvantitativno su i kvalitativno analizirali infarcirani i rubno ishemični, kao i neinfarcirani dio miokarda. Rezultati izražaja upalnih biljega MMP-2, MMP-9, NFκB i TGFβ1 te broj upalnih stanica (neutrofila i monocita/makrofaga) 24 sata

nakon izazivanja infarkta miokarda ukazuju da umjerena konzumacija bijelog vina posreduje protuupalno djelovanje unutar srčanog tkiva (176,177).

U patofiziologiji ishemijske ozljede miokarda vrlo je važan utjecaj medijatora na tonus koronarnih krvnih žila. Učinci vina i vinskih polifenola na endotel su od potencijalno velikog značaja s obzirom na važnost disfunkcije endotela u patogenezi vaskularnih bolesti, uključujući i ishemijsku bolest srca. U tom smislu većina studija opisuje značajan vazodilatacijski učinak crnog vina, uz *in vitro* potpuni nedostatak učinka etanola, a učinak bijelog vina siromašnijeg polifenolima, značajno je slabiji od crnog vina (178–180). Vazodilatacijski učinak crnih vina je izravan, ovisan o endotelu te različitim mehanizmima povezan s NO. U kratkoročne mehanizme spada povećana proizvodnja i biodostupnosti NO, a u dugoročne povećanje ekspresije endotelne NO sintetaze (eNOS) i smanjenje sinteze endotelina-1 (181). Ipak, studija Edera i suradnika opisuje štajerska bijela vina kao izravne potentne antagoniste vazokonstrikcijskog učinka histamina, serotonina, tromboksanskih antagonista i izoprostana. U ovoj su studiji korištene značajno veće koncentracije vina, a autori navode kako za vazodilatacijski učinak nisu odgovorne polifenolne tvari, niti etanol, već nefenolne vazoaktivne komponente vina (frakcionirane ispiranjem vodom tijekom kolonske kromatografije na poliamidu) (182). Tako da vazodilatacijski učinak crnog i bijelog vina može proizlaziti iz djelovanja njihovih različitih komponenti, bilo dosad dobro istraženih fenola zastupljenijih u crnom vinu, tako i nefenolnih, nedovoljno istraženih komponenti.

Usporedbom učinaka bijelih i crnih vina na aterogene mehanizme u koje je uključen čimbenik rasta porijeklom iz trombocita, PDGF (od engl. *platelet-derived growth factor*) pokazan je također dominantni protektivni učinak crnih vina i nedostatak ovog učinka od strane bijelih vina (183).

U *in vitro* modelima ishemijske ozljede srca mali je broj studija u kojima se istražuje učinak bijelih vina. Cui i suradnici pokazali su da od tri istraživana ekstrakta bijelih vina samo jedan ostvaruje protektivni učinak kojeg autori povezuju s antioksidacijskim mehanizmima (184).

Iako je poznato da crno vino sadrži i do 10 puta više polifenola od bijelog vina, u ovom radu smo željeli istražiti upravo utjecaj bijelog vina na izražaj adhezijskih molekula zbog njegove velike konzumacije diljem svijeta. Kontradiktorni rezultati postojećih studija dali su dodatni poticaj provedenom istraživanju.

Bijelo vino je relativno bogato neflavonoidnim spojevima koji djeluju protuupalno (185,186). S obzirom na to da nisu izolirani pojedini neflavonoidi iz korištenog vina te nije ispitan njihov pojedinačan utjecaj tijekom studije, nije moguće predložiti koji bi od njih bili odgovorni za zapažene učinke. Pojedine frakcije neflavonoida i ostalih polifenola vina moguće je analizirati tekućinskom kromatografijom, LC (od engl. *liquid chromatography*) te potom ispitati njihove biološke aktivnosti *in vivo*. Iz biološki najaktivnije frakcije potrebno je izolirati čiste spojeve kromatografijom visoke djelotvornosti, HPLC (od engl. *high performance liquid chromatography*) koji su odgovorni za

biološku aktivnost te odrediti njihovu strukturu masenom ili NMR spektroskopijom. Može se očekivati sinergističko i antagonističko međudjelovanje spojeva. Na ovakav način bi se moglo sa sigurnošću reći koji to točno spoj ili spojevi dovode do zapaženih rezultata. Osim toga, na istom modelu bilo bi korisno napraviti usporedbu djelovanja bijelog i crnog vina proizvedenog iz iste sorte crnog grožđa iz istog vinograda i iste godine berbe odnosno usporedbu djelovanja bijelog i maceriranog bijelog (bez uklanjanja kožica i koštica grožđa) vina proizvedenog iz iste sorte bijelog grožđa iz istog vinograda i iste godine berbe uz postupak kemijske analize. Ograničenje ove studije je i problem translacije na ljude jer su korišteni zdravi štakorski mužjaci, neposredno nakon spolne zrelosti, dok u ljudskoj populaciji infarkt miokarda pogađa većinom starije ljude s različitim drugim zdravstvenim problemima.

Pronađeni značajni utjecaj konzumacije vina prije MI na izražaj CD44 kod monocitnih subpopulacija poticajan je za nastavak ovog istraživanja. Kombinirani biokemijski, histološki i citološki pristup istraživanja, tijekom 1-2 tjedna nakon MI, bio bi koristan u daljnjem otkrivanju mehanizama posredovanja bijelog vina u genezi upalnog procesa, optimalnog za cijeljenje srčanog tkiva. U ovom istraživanju korištena je metoda protočne citometrije budući da se njome istovremeno može analizirati više parametara, u našem slučaju staničnih biljega na određenim subpopulacijama imunoloških stanica u krvi. U budućim istraživanjima bi bilo korisno usporediti i utjecaj različitih vremena uzorkovanja nakon infarkta miokarda kao i primijeniti neke druge metode. Moguće je određivanje staničnih biljega na subpopulacijama neutrofila i makrofaga prisutnih u štakorskom srčanom tkivu metodom protočne citometrije nakon razgradnje tkiva djelovanjem kolagenaze ili metodom imunohistokemije. Tako bismo dobili uvid koliko je leukocita uspjelo preći iz krvi u tkivo.

Kontroverzno ostaje pitanje može li se ljudsko srce regenerirati. Studije u kojima se egzogeno dodani DNA nukleozidi ugrađuju u novosintetiziranu DNA, pokazale su da je manje od 1% kardiomiocita ventrikula odraslog neoštećenog srca ugradilo dodane DNA nukleoizide. Problem ovog pristupa je mogućnost kardiomiocita da stvaraju poliploidne stanice. Stoga bi bolji pristup bio mjerenje citokineze tj. dijeljenje citoplazme. Iako se stvara konsenzus da je endogena obnova srca odraslih u velikoj mjeri posljedica proliferacije postojećih kardiomiocita, prisutna je i aktivnost niske razine obnove iz srčanih progenitornih stanica (187). Metode analize proliferacije su primjerice mjerenje ugradnje dodanih radioaktivnih analoga timidina. Osim toga, moguće je i određivanje biljega proliferacije Ki67 paralelno s biljegom za kardiomiocite (troponin T) metodom protočne citometrije, nakon razgradnje srčanog tkiva djelovanjem kolagenaze. Mogući nalaz korelacije između izražaja CD44+ monocita u krvi štakora i proliferacije kardiomiocita, potvrdio bi CD44+ monocite kao značajan parametar u budućim procjenama učinka novih supstanci na oporavak srca nakon infarkta miokarda.

B. Stanični modeli raka

Učinak novosintetiziranog inhibitora fosfolipaze C procjenjivali smo na staničnim linijama MDA-MB-231 i Du-145 određivanjem postotaka metabolički aktivnih stanica, apoptotičnih stanica te matičnih stanica raka (CSC). Dodatne rezultate, koji bi mogli ukazati na mehanizam djelovanja inhibitora, dobili smo određivanjem izražaj biljega GM3(NeuAc) i CD15s na CSC i postotaka CSC pozitivnih na pojedini biljeg.

Novosintetizirani inhibitor PLC bio je citotoksičan za obje tumorske stanične linije. Iznos IC_{50} za MDA-MB-231 staničnu liniju, izračunat iz podataka dobivenih MTT testom, bio je deseterostruko viši u odnosu na ranije dobiveni IC_{50} iz podataka pokusa ugradnje timidina (161). Dok se ugradnja timidina u DNA mjeri tijekom aktivne diobe stanica, MTT test mjeri metaboličku aktivnost živih stanica, neovisno dijele li se one aktivno ili ne. Budući da naš inhibitor može biti citotoksičan spoj koji zaustavlja stanice u G2/M fazi staničnog ciklusa, zabilježeno odstupanje u IC50 vrijednostima je najvjerojatnije posljedica zbog različitih metoda određivanja.

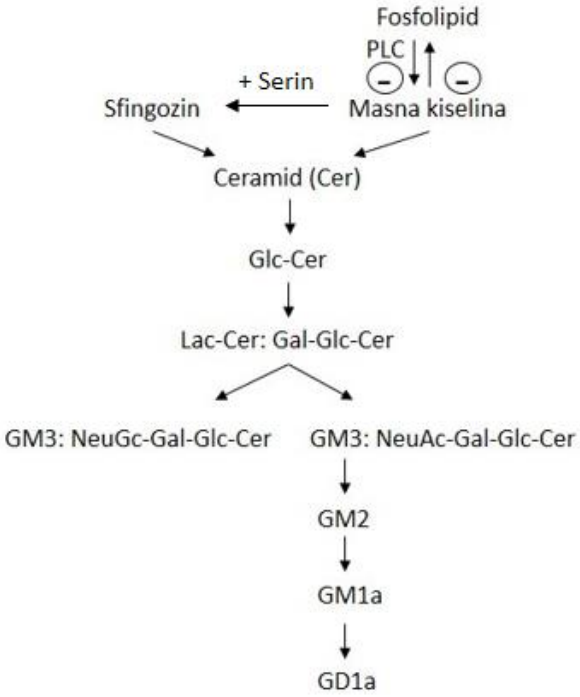
Određivanjem tipa stanične smrti, utvrđeno je da inhibitor izaziva smrt MDA-MB-231 stanica apoptozom. Smanjen je postotak CSC, nepromijenjen postotak GM3(NeuAc)+CSC subpopulacije, a izražaj GM3(NeuAc) na CSC značajno je povećan. Stoga možemo pretpostaviti da je došlo do povećanja apoptoze i smanjenja postotka CSC uslijed povećanog izražaja GM3(NeuAc) na MDA-MB-231 stanicama. Ova pretpostavka je u skladu s ranijim otkrićem da GM3(NeuAc) posreduje u apoptozi izazvanoj cisplatinom u stanicama ljudskog raka debelog crijeva (188). Međutim, kod Du-145 stanica, tretman inhibitorom nije značajno utjecao ni na postotak apoptotičnih stanica, kao ni na izražaj GM3(NeuAc) na CSC. Postotak Du-145 CSC subpopulacije bio je značajno povećan dok je postotak GM3(NeuAc)+CSC subpopulacije Du-145 stanica bio značajno smanjen. Moguće je da razlika djelovanja inhibitora proizlazi iz razlike u izražaju receptora za čimbenike rasta između dviju staničnih linija. Poznato je da GM3(NeuAc) inhibira tirozin kinaznu aktivnost receptora epidermalnog čimbenika rasta, EGF (od engl. *epidermal growth factor*) i fibroblastnog čimbenika rasta, FGF (od engl. *fibroblast growth factor*) (189–191). EGF receptor je funkcionalan kod Du-145 stanične linije (192), dok MDA-MB-231 stanice izražavaju EGF receptor, no nemaju proliferacijski odgovor na EGF (193). FGF receptori se nalaze na objema staničnim linijama. Adheriranjem ljudskih embrijskih fibroblasta u uvjetima bez dodatka seruma i FGF-a, dolazi do aktivacije FGF receptora fosforilacijom tirozina i poticanja proliferacije stanica (194). FGF može povećati aktivnost PLC-δ i proliferaciju stanica (195). Stanične linije korištene u ovoj studiji uzgojene su u mediju koji je sadržavao 10% seruma pa pretpostavljamo da je kod netretiranih kontrolnih stanica obiju tumorskih linija postojala FGF signalizacija putem PLC-δ. FGF je također mogao nakratko prolazno aktivirati PLC-γ. Ranija istraživanja tieno [2,3-*b*] piridina na MDA-MB-231 stanicama ukazuju na njegov

mogući inhibicijski učinak na PLC-δ1 i δ2 izoformi (161). Možemo pretpostaviti da je slabija proliferacija obiju staničnih linija u našem istraživanju, nastupila zbog inhibicije PLC-δ, ključnog izoenzima PLC koji pojačava i produljuje učinak primarnih PLC enzima.

Za razliku od MDA-MB-231 tumorskih stanica, kojima je inhibitor povećao apoptozu i smanjio postotak CSC, Du-145 stanice imale su nepromijenjenu apoptozu i povećan postotak CSC. S obzirom na to da Du-145 imaju funkcionalni EGF receptor, on može pojačano poticati aktivnost PLC. Wells i suradnici pretpostavljaju da agonist hormona oslobađanja luteinizirajućeg hormona, LHRH (od engl. *luteinizing hormone-releasing hormone*) potiče PLC u aktivaciji PKC, a aktivacija PKC ograničava tirozin kinaznu aktivnost EGF receptora fosforilirajući EGF receptor na treoninu 654 kod Du-145 stanica. Međutim, Wells i suradnici do svojih rezultata su došli inokuliranjem Du-145 stanica miševima uz primjenu LHRH agonista *in vivo* (192). Koncentracija LHRH inače je najveća u kapilarama koje povezuju hipotalamus i hipofizu. Mala je vjerojatnost da je postojala značajna koncentracija LHRH u serumu koji je dodavan u medij u kojem su rasle Du-145 stanice za naše istraživanje.

Povećan izražaj GM3(NeuAc) na CSC u MDA-MB-231 staničnoj liniji može inhibirati proliferaciju stanica blokirajući fosforilaciju FGF receptora. Anti-GM3 protutijelo korišteno u ovom istraživanju razvijeno je protiv GM3 supstituiranog s N-acetil neuraminskom kiselinom-GM3(NeuAc). Bojenje rezorcinolom nakon tankoslojne kromatografije ekstrakta gangliozida pokazuje da je GM3(NeuAc) glavna frakcija gangliozida kod MDA-MB-231 stanične linije (196). Autori nisu koristili GM3(NeuGc) standard, ali frakcija na kromatogramu ispod GM3(NeuAc) može biti GM3(NeuGc). Na tankoslojnom kromatogramu, GM3(NeuGc) se nalazi ispod GM3(NeuAc) zbog većeg afiniteta prema hidrofilnom stacionarnom silika gelu i manjeg afiniteta prema hidrofobnoj mobilnoj fazi (197). Važno je razlikovati ove dvije frakcije budući da je GM3(NeuGc) biljeg malignijeg fenotipa (198). U karcinomima dojke dolazi do pretjeranog izražaja postojećih ili pak izražaja novih gangliozida. GM3(NeuGc) je uočen u invazivnom duktalnom karcinomu (199). Zapazili su ga i Oliva i sur., kod svake od 14 pacijentica s dijagnosticiranim primarnim rakom dojke druge faze i to metodom radioimunoscintigrafije, detekcijom obilježenog protutijela na GM3(NeuGc) (198). Kiseli šećer Neu5Gc nije prisutan kod ljudi zato jer je gen koji kodira za CMP-Neu5Ac hidroksilazu ireverzibilno inaktiviran. Nedostatak enzima odgovornog za konverziju CMP-Neu5Ac u CMP-Neu5Gc dovodi do potpune odsutnosti Neu5Gc u zdravim ljudskim tkivima. Osim u ganglizidima, Neu5Gc je izražen i na glikoproteinima stanica karcinoma dojke (200). U oba slučaja, bilo da se radi o gangliozidu i glikoproteinu, može biti korisna imunoterapija protutijelima na GM3(Neu5Gc), koja selektivno prepoznaje upravo stanice karcinoma dojke. Naime, imunogenični epitop za nastanak protutijela je upravo Neu5Gc glikozidni ostatak, neovisno o lipidnom ili proteinskom dijelu cjelovitih molekula.

Poznato je da je izražaj GM3(NeuAc) kod Du-145 stanica vrlo nizak (201). Tretiranje inhibitorom nije promijenilo izražaj GM3(NeuAc) na CSC kod Du-145 stanica u našem pokusu. Moguća indukcija sinteze GM3(NeuAc) zbog inhibicije PLC, prema slici 39, može rezultirati povišenom pretvorbom u GD1a koji je glavna gangliozidna frakcija Du-145 stanica. Nasuprot tome, poznato je da je GM3(NeuAc) najzastupljeniji gangliozid u MDA-MB-231 stanicama na kojima je u našem pokusu inhibitor povećao njegov izražaj (196). Sve reakcije prikazane na slici katalizirane su specifičnim enzimima. Konačni izražaj gangliozidnih frakcija u pojedinim staničnim linijama ovisi o količini preteča u njihovoj sintezi te aktivnosti specifičnih glikozil transferaza, kao i glikozidaza, enzima koji kataliziraju ugradnju glikozidnih ostataka u glikosfingolipide odnosno njihovo hidrolitičko odcjepljivanje.



Slika 39. Shema sinteze glikosfingolipida plazma membrane i njihova povezanost s metabolizmom fosfolipida**.** Zbog inhibirane razgradnje fosfolipida putem PLC, niža je i endogena sinteza fosfolipida. Masne kiseline raspoložive su u višim koncentracijama za sintezu neutralnih glikosfingolipida i gangliozida.

Osim kiselog glikosfingolipida, gangliozida GM3(NeuAc), analizirali smo i glikokonjugat CD15s koji je glavni ligand za E-selektin, te je odgovoran za metastaziranje stanica raka. U slučaju CD15s glikosfingolipida, glikoantigen je vezan za ceramidno sidro u vanjskom jednosloju plazma membrane. U slučaju CD15s glikoproteina, isti glikoantigen je vezan za CD11b ili CD44

transmembranski glikoprotein (202). Varijanta CD44 izoforma 4 (CD44v4) glavni je metastatski MDA-MB-231 glikoprotein na koji je vezan CD15s te služi kao E-selektinski ligand te tako olakšava metastaziranje tumorskih stanica (203).

U ovoj studiji, izražaj CD15s po jednoj CSC nije bio promijenjen dok je postotak CD15s+ bio snižen kod obiju staničnih linija nakon tretmana inhibitorom. Sniženje izražajnosti CD15s na matičnim stanicama raka biljeg je njihovog sniženog metastatskog potencijala. Tretiranje paklitakselom snizilo je CD15s+CSC u objema staničnim linijama, ali je tretman djelovao slabije u odnosu na tretman samim inhibitorom.

Tretman kombinacijom inhibitora i paklitaksela povećao je izražaj GM3(NeuAc) na CSC u MDA-MB-231 staničnoj liniji. Ovo povećanje bilo je slabije u usporedbi s tretmanom samim inhibitorom. U MDA-MB-231 staničnoj liniji, paklitaksel je u kombinaciji s višim koncentracijama inhibitora djelovao antagonistično povećavajući preživljenje. Paklitaksel inducira prekomjerni izražaj GM3(NeuAc) sintaze što inhibira aktivaciju kaspaze-3 u stanicama raka jajnika. te tako snižava učinkovitost terapije (204).

Rezultati za stanice raka prostate nakon kombiniranog tretmana bili su povećana apoptoza ukupne populacije stanica te povećan postotak CSC subpopulacije u odnosu na kontrolu. Izražaj GM3(NeuAc) bio je blago snižen, bez statistike značajnosti. U odnosu na MDA-MB-231 stanice, moguće je da GM3(NeuAc) nije postigao dovoljnu koncentraciju koja bi mogla izazvati apoptozu.

Zaključno, najznačajniji nalazi djelovanja inhibitora su poticanje apoptoze i izražaja GM3(NeuAc) na CSC MDA-MB-231 stanicama raka dojke te snižavanje udjela njihove metastatske CD15s+CSC subpopulacije. Uzimajući u obzir da trostruko negativne karcinome dojke karakterizira povećanje postotka CSC i znajući njihovu povezanost s povećanim rizikom od metastaziranja i smrtnosti, naši rezultati su poticajni za nastavak istraživanja protutumorskih učinaka inhibitora fosfolipaze C (3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karbosamida) na *in vivo* modelima.

U budućim istraživanjima bismo mogli ispitati citotoksični učinak ovog inhibitora fosfolipaze C i na nekim drugim staničnim linijama primjerice na TNBC linijama MDA-MB-453 i MDA-MB-157. Za razliku od MDA-MB-157 linije koja nema izražaj receptora za TGF i FGF, MDA-MB-231 ima izražaj TGF receptora, dok MDA-MB-453 linija ima prekomjerni izražaj FGF receptora. Tako da bi za moguće razlike u rezultatima mogla biti odgovorna signalizacija putem TGF i FGF receptora (205). Uz glikokonjugate GM3(NeuAc) i CD15s, opisu glikofenotipa značajno bi doprinijeli još i gangliozidi GM3(NeuGc) (33) i GD2 koji su pojačano izražen u karcinomima dojke (206). Testom stvaranja mamosfera procijenili bismo potencijal ponašanja CSC svojstven matičnim stanicama u eksperimentalnim uvjetima te moguću inhibiciju njihova stvaranja inhibitorom (207).

Inhibitor cilja specifični receptor, a budući da je njegova molarna masa 386,37 g/mol, nalazi se u tzv. "slatkom području" (od engl. *sweet spot*) učinkovitosti potencijalnog razvijanja lijeka (208,209). Zato bi posebno bilo vrijedno nastaviti istraživanja *in vivo* koristeći *nude* miševe koji zbog manjkavog razvoja timusa ne odbacuju transplatirane tumore. U miševe bi se mogle transplantirati humane tumorske stanice korištene u ovom istraživanju (210). O učinku različitih doza potencijalnog lijeka bi se moglo zaključiti mjerenjem veličine tumora te određivanjem izražaja biljega matičnih stanica kao i metastatskog biljega CD15s te specifičnih tumorskih biljega GM3(NeuGc) i GD2 u transplantiranom tumoru, kao i u drugim organima, s ciljem procjene metastatskog potencijala CSC stanica.

6. ZAKLJUČCI

1. Konzumacija vina prije infarkta miokarda izazvala je višestruko povećanje izražaja CD44 kod monocita uobičajene veličine te velikih monocita. Ispitna skupina pokazala je također i povećani postotak CD44+ monocita i granulocita.
2. Postotak CD44+ monocita pokazao je trend snižavanja polazeći od neoperirane, preko prividno operirane do operirane kontrolne skupine. Kod ispitne skupine nije primijećeno smanjenje, vrijednosti su ostale praktički identične vrijednostima neoperirane skupine. Ovim je CD44 biljeg razotkriven kao najosjetljiviji na utjecaj bijelog vina, s mogućim poticajnim učincima na cijeljenje srčanog tkiva.
3. Nije bilo razlika ni u postotku pojedinih subpopulacija niti u izražaju pojedinih biljega između neoperirane i prividno operirane skupine čime se dokazuje neinvazivnost novoprimijenjenog modela infarkta miokarda.
4. Novosintetizirani inhibitor PLC bio je citotoksičan za stanične linije raka dojke i raka prostate.
5. Kod stanica trostruko negativnog karcinoma dojke inhibitor PLC je izazvao smrt apoptozom, blago smanjio postotak subpopulacije matičnih stanica u ukupnoj populaciji uz istovremeno značajno povećanje njihova izražaja GM3(NeuAc), važnog inhibitora prijenosa signala čimbenika rasta. Povećanje izražaja GM3(NeuAc) izazvano je i kombinacijom inhibitora PLC i paklitaksela.
6. Inhibitor PLC je značajno povećao postotak matičnih stanica u kulturi stanice karcinoma prostate neovisnog o androgenima te snizio postotak GM3(NeuAc)+ CSC subpopulacije. Samo u kombinaciji s paklitakselom, inhibitor je povećao apoptozu ukupne populacije stanica.
7. Inhibitor PLC je snizio postotak potencijalno metastatske subpopulacije matičnih stanica (CD15s+) kod obiju staničnih linija.

7. LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Preceded by: Abbas AK. Cellular and molecular immunology. 8th edition.Saunders. In: Saunders, editor. 2017 [cited 2020 Mar 7]. Available from: https://books.google.pt/books?id=L4FUDgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

2. Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H. and Pillai S. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, Fifth Edition. Elsevier Health Sciences. 2011.

3. Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. Pharmacology and Therapeutics. 2018.

4. McEver RP. Selectins: Initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. Cardiovasc Res. 2015;107(3):331–9.

5. Nikolaos G. Frangogiannis. The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling. Nat Rev Cardiol. 2014;11(5):255–65.

6. Von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: Bridging inflammation and cardiovascular disease. Circulation Research. 2007.

7. Schmidt RA, Morrell CN, Ling FS, Simlote P, Fernandez G, Rich DQ, et al. The platelet phenotype in patients with ST-segment elevation myocardial infarction is different from non–ST-segment elevation myocardial infarction. Transl Res. 2018;

8. Lodish H, Berk A, Zipursky S. Cell Biology. 4th edition. In: Section 221, Cell-Cell Adhesion and Communication. 2000.

9. Abul K. Abbas AHL and SP. Cellular and Molecular Immunology, Ninth Edition. Cellular and Molecular Immunology. 2018.

10. Harjunpää H, Asens ML, Guenther C, Fagerholm SC. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. Front Immunol. 2019;10(MAY).

11. Wai Wong C, Dye DE, Coombe DR. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. Int J Cell Biol. 2012;2012.

12. Varki ACRD. EJD. FHH. SP. BCR. HGW. EM, E. Essentials of Glycobiology, 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY). 2015.

13. Glavas D, Markotic A, Valic Z, Kovacic N, Palada I, Martinic R, et al. Expression of

endothelial selectin ligands on human leukocytes following dive. Exp Biol Med. 2008;

14. Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry Sixth Edition. Proceedings - International Conference on Research Challenges in Information Science. 2014.

15. Petty HR, Todd RF. Receptor-receptor interactions of complement receptor type 3 in neutrophil membranes. J Leukoc Biol. 1993;54(5):492–4.

16. Springer T, Galfré G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. Eur J Immunol. 1979;

17. Anderson DC, Miller LJ, Schmalstieg FC, Rothlein R, Springer TA. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. J Immunol. 1986;

18. Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. Cell. 1987.

19. McFarland HI, Nahill SR, Maciaszek JW, Welsh RM. CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. J Immunol. 1992;

20. Khan SQ, Khan I, Gupta V. CD11b activity modulates pathogenesis of lupus nephritis. Front Med. 2018;5(MAR):1–7.

21. Diamond MS, Staunton DE, De Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, et al. ICAM-1 (CD54): A counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). J Cell Biol. 1990;111(6 II):3129–39.

22. Sengeløv H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (αmβ2) in human neutrophils. J Clin Invest. 1993;92(3):1467–76.

23. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. Front Cell Dev Biol. 2017;5(MAR).

24. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology. 1999.

25. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. J Hematol Oncol. 2018;11(1):1–23.

26. Richard A Harvey , By (author) Denise R Ferrier B (author) SK. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry Fifth Edition. Lippincott Williams and Wilkins. 2011.

27. Lokeshwar BL, Lokeshwar VB, Block NL. Expression of CD44 in prostate cancer cells: Association with cell proliferation and invasive potential. Anticancer Res. 1995;

28. Corcoran C, Rani S, O'Brien K, O'Neill A, Prencipe M, Sheikh R, et al. Docetaxel-Resistance in Prostate Cancer: Evaluating Associated Phenotypic Changes and Potential for Resistance Transfer via Exosomes. PLoS One. 2012;

29. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: A dangerously dynamic duo in breast cancer progression. Breast Cancer Research. 2011.

30. Castillo V, Valenzuela R, Huidobro C, Contreras HR, Castellon EA. Functional characteristics of cancer stem cells and their role in drug resistance of prostate cancer. Int J Oncol. 2014;

31. Economopoulou P, Kaklamani VG, Siziopikou K. The Role of Cancer Stem Cells in Breast Cancer Initiation and Progression: Potential Cancer Stem Cell-Directed Therapies. Oncologist. 2012 Nov;17(11):1394–401.

32. Prokazova N V., Samovilova NN, Gracheva E V., Golovanova NK. Ganglioside GM3 and its biological functions. Biochem. 2009;74(3):235–49.

33. Labrada M, Dorvignit D, Hevia G, Rodríguez-Zhurbenko N, Hernández AM, Vázquez AM, et al. GM3(Neu5Gc) ganglioside: an evolution fixed neoantigen for cancer immunotherapy. Semin Oncol [Internet]. 2018;45(1–2):41–51. Available from: https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.04.003

34. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2019;

35. The top 10 causes of death [Internet]. [cited 2020 Apr 17]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death

36. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. Circulation Research. 2012.

37. Parikh NI, Gona P, Larson MG, Fox CS, Benjamin EJ, Murabito JM, et al. Long-term trends in myocardial infarction incidence and case fatality in the national heart, lung, and blood institute's Framingham heart study. Circulation. 2009;

38. Cohn JN, 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(3):569–82.

39. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. Arq Bras Cardiol. 2016;106(1):62–9.

40. Wu D, Zhang K, Hu P. The role of autophagy in acute myocardial infarction. Front Pharmacol. 2019;10(MAY).

41. STANLEY W. Changes in cardiac metabolism: a critical step from stable angina to ischaemic cardiomyopathy. Eur Hear J Suppl. 2001;3:O2–7.

42. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Illustrated Biochemistry (31st Edition). Biochemical Education. 2018.

43. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. Nature Cell Biology. 2010.

44. Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, Novak I. Autophagy modulation in cancer: Current knowledge on action and therapy. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018.

45. M. M, K. B, S. W, J. S, L.T. D, S.-Y. P, et al. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013.

46. Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of cell death in heart disease. Vol. 32, Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. NIH Public Access; 2012. p. 1552–62.

47. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. Vol. 473, Nature. NIH Public Access; 2011. p. 326–35.

48. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. Cardiovascular Research. 2002.

49. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. Nat Immunol. 2007;

50. Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, Funke B, Eichberger SN, Kaya Z, et al. High-mobility group

box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. Circulation. 2008;117(25):3216–26.

51. Arslan F, De Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. Nature Reviews Cardiology. 2011.

52. Huang S, Frangogiannis NG. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. Br J Pharmacol. 2018;175(9):1377–400.

53. Zhang W, Lavine KJ, Epelman S, Evans SA, Weinheimer CJ, Barger PM, et al. Necrotic myocardial cells release Damage-Associated Molecular Patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. J Am Heart Assoc. 2015;4(6):1–19.

54. Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, Mezzapelle R, Rovere Querini P, Venereau E. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. Immunol Rev. 2017;280(1):74–82.

55. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentinis B, Catalanotti F, Giazzon M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. EMBO Rep. 2004;5(8):825–30.

56. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. J Biol Chem. 2004;279(9):7370–7.

57. Liu FY, Fan D, Yang Z, Tang N, Guo Z, Ma SQ, et al. TLR9 is essential for HMGB1-mediated post-myocardial infarction tissue repair through affecting apoptosis, cardiac healing, and angiogenesis. Cell Death Dis [Internet]. 2019;10(7). Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1718-7

58. Zou N, Ao L, Cleveland JC, Yang X, Su X, Cai GY, et al. Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2008;

59. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;

60. Hlil JH, Ward PA. The phlogistic role of c3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. J Exp Med. 1971;133(4):885–99.

61. Yasojima K, Kilgore KS, Washington RA, Lucchesi BR, McGeer PL. Complement gene expression by rabbit heart: Upregulation by ischemia and reperfusion. Circ Res. 1998;82(11):1224–30.

62. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. Thrombosis and Haemostasis. 2007.

63. Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;

64. Chute M, Aujla P, Jana S, Kassiri Z. The Non-Fibrillar Side of Fibrosis: Contribution of the Basement Membrane, Proteoglycans, and Glycoproteins to Myocardial Fibrosis. J Cardiovasc Dev Dis. 2019;6(4):35.

65. Wight TN, Vernon RB. Targeting the extracellular matrix promotes healing following myocardial infarction. Circ Res. 2019;125(9):802–4.

66. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. Nature Reviews Immunology. 2017.

67. Puhl SL, Steffens S. Neutrophils in Post-myocardial Infarction Inflammation: Damage vs. Resolution? Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2019.

68. Ma Y, Yabluchanskiy A, Iyer RP, Cannon PL, Flynn ER, Jung M, et al. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2016;

69. Fan H, Sun B, Gu Q, Lafond-Walker A, Cao S, Becker LC. Oxygen radicals trigger activation of NF-κB and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2002;282(5 51-5):1778–86.

70. Prabhu SD, Frangogiannis NG, Service M, Einstein A. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. Circu. 2017;119(1):91–112.

71. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. Circulation [Internet]. 2011 Feb 15 [cited 2020 Apr 17];123(6):594–604. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282498

72. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, et al. The

inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2011 Dec 6 [cited 2020 Apr 17];108(49):19725–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22106299

73. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. Am J Pathol [Internet]. 2008 Jul [cited 2020 Apr 17];173(1):57–67. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535174

74. Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell J V. Cytokine signaling during myocardial infarction: Sequential appearance of IL-1β and IL-6. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 1995;

75. Fontes JA, Rose NR, Čiháková D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. Cytokine. 2015.

76. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nature Reviews Immunology. 2011.

77. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. J Exp Med. 2007;

78. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: An integrated view. EMBO Molecular Medicine. 2013.

79. Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;

80. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. Frontiers in Immunology. 2014.

81. Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan Fragments Stimulate Endothelial Recognition of Injury through TLR4. J Biol Chem. 2004;279(17):17079–84.

82. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2010.

83. McDonald B, Kubes P. Interactions between CD44 and hyaluronan in leukocyte trafficking. Frontiers in Immunology. 2015.

84. Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. JACC Basic to Transl Sci. 2019;4(3):449–67.

85. Samoticha J, Wojdyło A, Chmielewska J, Nofer J. Effect of Different Yeast Strains and Temperature of Fermentation on Basic Enological Parameters, Polyphenols and Volatile Compounds of Aurore White Wine. Foods. 2019;

86. Lamce F. Evaluation of the content of polyphenols and flavonoids during the fermentation of white wines (cv . Pulëz and Shesh i bardhë) with and without (Open Access) Evaluation of the content of polyphenols and flavonoids during the fermentation of white wine. 2018;(May).

87. del Alamo-Sanza M, Nevares I. Oak wine barrel as an active vessel: A critical review of past and current knowledge. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2018;58(16):2711–26. Available from: https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1330250

88. Ivanova V, Vojnoski B, Stefova M. Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines. J Food Sci Technol. 2012;

89. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. Oxid Med Cell Longev. 2015;2015.

90. Waterhouse AL. Wine phenolics. In: Annals of the New York Academy of Sciences. 2002.

91. Mudnić I. Vazodilatacijski i antioksidacijski učinci fenolnih kiselina iz vina, termički obrađenog te intaktnog vina u usporedbi s kupinovim vinom.

92. Chiva-Blanch G, Arranz S, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: Evidences from human studies. Alcohol Alcohol. 2013;

93. Castaldo L, Narváez A, Izzo L, Graziani G, Gaspari A, Minno G Di, et al. Red wine consumption and cardiovascular health. Vol. 24, Molecules. MDPI AG; 2019.

94. Li H, Förstermann U. Red wine and cardiovascular health. Circulation Research. 2012.

95. Forman HJ, Ursini F. Para-hormesis: An innovative mechanism for the health protection brought by antioxidants in wine. Nutr Aging. 2014;

96. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am J Clin Nutr. 2005;81(1 Suppl):230–42.

97. Haseeb S, Alexander B, Baranchuk A. Wine and Cardiovascular Health. Circulation. 2017.

98. Bertelli A, Migliori M, Bertelli AAE, Origlia N, Filippi C, Panichi V, et al. Effect of some white wine phenols in preventing inflammatory cytokine release. Drugs Exp Clin Res. 2002;

99. Bertelli AAE, Migliori M, Panichi V, Longoni B, Origlia N, Ferretti A, et al. Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. In: Annals of the New York Academy of Sciences. 2002.

100. Sun L, Fan H, Yang L, Shi L, Liu Y. Tyrosol prevents ischemia/reperfusion-induced cardiac injury in H9c2 cells: Involvement of ROS, Hsp70, JNK and ERK, and apoptosis. Molecules. 2015;

101. Bertelli AAE. Wine, research and cardiovascular disease: Instructions for use. Vol. 195, Atherosclerosis. Atherosclerosis; 2007. p. 242–7.

102. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. Food Chem [Internet]. 2012 Feb 15 [cited 2020 May 22];130(4):797–813. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611011502

103. Markoski MM, Garavaglia J, Oliveira A, Olivaes J, Marcadenti A. Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits. Nutr Metab Insights. 2016;9:51–7.

104. Miyamae M, Diamond I, Weiner MW, Camacho SA, Figueredo VM. Regular alcohol consumption mimics cardiac preconditioning by protecting against ischemia-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 1;94(7):3235–9.

105. Reynolds K, Lewis LB, Nolen JDL, Kinney GL, Sathya B, He J. Alcohol Consumption and Risk of Stroke: A Meta-analysis. Journal of the American Medical Association. 2003.

106. Guiraud A, De Lorgeril M, Boucher F, Berthonneche C, Rakotovao A, De Leiris J. Cardioprotective effect of chronic low dose ethanol drinking: Insights into the concept of ethanol preconditioning. J Mol Cell Cardiol. 2004;

107. Onishi A, Miyamae M, Inoue H, Kaneda K, Okusa C, Inamura Y, et al. Sevoflurane confers

additive cardioprotection to ethanol preconditioning associated with enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3β and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2013;

108. Showing all foods in which the polyphenol Tyrosol is found - Phenol-Explorer [Internet]. [cited 2020 May 23]. Available from: http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/673

109. Sacanella E, Vázquez-Agell M, Mena MP, Antúnez E, Fernández-Solá J, Nicolás JM, et al. Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: A randomized trial. Am J Clin Nutr. 2007;

110. Opie LH, Lecour S. The red wine hypothesis: From concepts to protective signalling molecules. Eur Heart J. 2007;28(14):1683–93.

111. Krenz M, Korthuis RJ. Moderate ethanol ingestion and cardiovascular protection: From epidemiologic associations to cellular mechanisms. Vol. 52, Journal of Molecular and Cellular Cardiology. NIH Public Access; 2012. p. 93–104.

112. Brien SE, Ronksley PE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: Systematic review and meta-analysis of interventional studies. BMJ. 2011;

113. Williams MJA, Sutherland WHF, Whelan AP, McCormick MP, De Jong SA. Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. Metabolism. 2004;

114. Roth I, Casas R, Ribó-Coll M, Estruch R. Consumption of aged white wine under a veil of flor reduces blood pressure-increasing plasma nitric oxide in men at high cardiovascular risk. Nutrients. 2019;11(6).

115. https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Wine%20Annual_Rome_EU-28_3-16-2015.pdf.

116. Yamazaki T, Seko Y, Tamatani T, Miyasaka M, Yagita H, Okumura K, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against cell adhesion molecules. Am J Pathol. 1993;

117. Tojo SJ, Yokota SI, Koike H, Schultz J, Hamazume Y, Misugi E, et al. Reduction of rat myocardial ischemia and reperfusion injury by sialyl Lewis x oligosaccharide and anti-rat P-

selectin antibodies. Glycobiology. 1996;

118. Simpson PJ, Todd RF, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR, et al. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. J Clin Invest. 1988;

119. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. European Journal of Clinical Investigation. 2013.

120. Cheng B, Chen HC, Chou IW, Tang TWH, Hsieh PCH. Harnessing the early post-injury inflammatory responses for cardiac regeneration. J Biomed Sci. 2017;

121. Cancer Today [Internet]. [cited 2020 Mar 7]. Available from: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1

122. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Onkologija. 3rd ed. 2018.

123. Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: A look at the evidence. Vol. 11, Women's Health. Future Medicine Ltd.; 2015. p. 65–77.

124. Brenton JD, Carey LA, Ahmed A, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? Journal of Clinical Oncology. 2005.

125. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. New England Journal of Medicine. 2010.

126. Barbuti AM, Chen ZS. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: Exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. Cancers. 2015.

127. Oudin MJ, Barbier L, Schäafer C, Kosciuk T, Miller MA, Han S, et al. MENa confers resistance to paclitaxel in triple-negative breast cancer. Mol Cancer Ther. 2017;

128. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. Nature Reviews Clinical Oncology. 2016.

129. Reguera-Nuñez E, Xu P, Chow A, Man S, Hilberg F, Kerbel RS. Therapeutic impact of Nintedanib with paclitaxel and/or a PD-L1 antibody in preclinical models of orthotopic primary or metastatic triple negative breast cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2019;

130. MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™ [Internet]. [cited 2020 Mar 26]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo_country=hr#characteristics

131. Welsh JE. Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. In: Animal Models for the Study of Human Disease. 2013.

132. European College of Authenticated Cell cultures. Cell line profile MDA-MB-231. Eur Collect Authenticated Cell Cult [Internet]. 2017;231(92020424):1–3. Available from: https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf

133. Choosing the right cell line for breast cancer research | Breast Cancer Research | Full Text [Internet]. [cited 2020 Mar 26]. Available from: https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2889/tables/1

134. Lavalette C, Trétarre B, Rebillard X, Lamy PJ, Cénée S, Menegaux F. Abdominal obesity and prostate cancer risk: Epidemiological evidence from the EPICAP study. Oncotarget. 2018 Oct 1;9(77):34485–94.

135. De Nunzio C, Andriole GL, Thompson IM, Freedland SJ. Smoking and Prostate Cancer: A Systematic Review [Internet]. Vol. 1, European Urology Focus. Elsevier; 2015 [cited 2020 Apr 17]. p. 28–38. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28723351

136. Yun EJ, Zhou J, Lin CJ, Hernandez E, Fazli L, Gleave M, et al. Targeting Cancer Stem Cells in Castration-Resistant Prostate Cancer. Clin Cancer Res. 2016;

137. Lu X, Yang F, Chen D, Zhao Q, Chen D, Ping H, et al. Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/Akt signaling pathways. Int J Biol Sci. 2020 Feb 14;16(7):1121–34.

138. Gupta A, Middleton M. Cytostatic and cytotoxic drugs. In: Side Effects of Drugs Annual. 2011.

139. Chiappino I, Destefanis P, Addeo A, Galetto A, Cucchiarale G, Munoz F, et al. Activity of weekly paclitaxel in advanced hormone-refractory prostate cancer. Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials. 2007;

140. DU 145 ATCC ® HTB-81™ Homo sapiens prostate; derived from me [Internet]. [cited 2020 Mar 26]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-81.aspx?geo_country=hr

141. Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. Medicine (United States). 2016.

142. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: Current status and evolving complexities. Cell Stem Cell. 2012.

143. Toh TB, Lim JJ, Chow EKH. Epigenetics in cancer stem cells. Vol. 16, Molecular Cancer. BioMed Central Ltd.; 2017.

144. Raghu D, Mobley RJ, Shendy NAM, Perry CH, Abell AN. GALNT3 Maintains the Epithelial State in Trophoblast Stem Cells. Cell Rep. 2019;

145. Regina Todeschini A, Hakomori S itiroh. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 2008.

146. Jacob F, Alam S, Konantz M, Liang CY, Kohler RS, Everest-Dass A V., et al. Transition of mesenchymal and epithelial cancer cells depends on a1-4 galactosyltransferase-mediated glycosphingolipids. Cancer Res. 2018;

147. Legros N, Pohlentz G, Steil D, Müthing J. Shiga toxin-glycosphingolipid interaction: Status quo of research with focus on primary human brain and kidney endothelial cells. International Journal of Medical Microbiology. 2018.

148. Liang YJ, Ding Y, Levery SB, Lobaton M, Handa K, Hakomori SI. Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;

149. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2002;

150. Yang F, Cao L, Sun Z, Jin J, Fang H, Zhang W, et al. Evaluation of breast cancer stem cells and intratumor stemness heterogeneity in triple-negative breast cancer as prognostic factors. Int J Biol Sci. 2016;

151. The Response of CD24(-/low)/CD44+ Breast Cancer-Initiating Cells to Radiation - PubMed [Internet]. [cited 2020 May 29]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17179479/

152. Phi LTH, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, et al. Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. Stem Cells International. 2018.

153. Reynisson J, Court W, O'Neill C, Day J, Patterson L, McDonald E, et al. The identification of novel PLC-γ inhibitors using virtual high throughput screening. Bioorganic Med Chem. 2009;

154. Lieberman 1950- M. Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach. Basic Med Biochem. 2013;

155. Nakamura Y, Fukami K. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. Journal of Biochemistry. 2017.

156. Yang YR, Follo MY, Cocco L, Suh PG. The physiological roles of primary phospholipase C. Advances in Biological Regulation. 2013.

157. Suh PG, Park J Il, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2008.

158. Lomasney JW, Cheng HF, Kobayashi M, King K. Structural basis for calcium and phosphatidylserine regulation of phospholipase C δ1. Biochemistry. 2012;

159. Režić-Mužinić N, Čikeš-Čulić V, Božić J, Tičinović-Kurir T, Salamunić I, Markotić A. Hypercalcemia induces a proinflammatory phenotype in rat leukocytes and endothelial cells. J Physiol Biochem. 2013;

160. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electron. 2001;

161. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D'mello SAN, Denny WA, Baguley BC, et al. Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno[2,3-b]pyridine derivative. Cancer Cell Int. 2016;16(1):1–9.

162. Arabshahi HJ, Van Rensburg M, Pilkington LI, Jeon CY, Song M, Gridel LM, et al. A synthesis, in silico, in vitro and in vivo study of thieno[2,3-b]pyridine anticancer analogues. Medchemcomm [Internet]. 2015;6(11):1987–97. Available from: http://dx.doi.org/10.1039/C5MD00245A

163. Feng L, Reynisdóttir I, Reynisson J. The effect of PLC-γ2 inhibitors on the growth of human

tumour cells. Eur J Med Chem. 2012 Aug 1;54:463–9.

164. Zollner TM, Nuber V, Duijvestijn AM, Boehncke WH, Kaufmann R. Superantigens but not mitogens are capable of inducing upregulation of E-selectin ligands on human T lymphocytes. Exp Dermatol. 1997;

165. Peakman M, Tredger JM, Davies ET, Davenport M, Dunne JB, Williams R, et al. Analysis of peripheral blood mononuclear cells in rodents by three-colour flow cytometry using a small-volume lysed whole blood technique. J Immunol Methods. 1993;

166. Yang MY, Wang CJ, Chen NF, Ho WH, Lu FJ, Tseng TH. Luteolin enhances paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells by blocking STAT3. Chem Biol Interact. 2014;

167. Jung K, Kim P, Leuschner F, Gorbatov R, Kim JK, Ueno T, et al. Erratum: Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infracted mouse hearts (Circulation Research (2013) 112 (891-899) DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111. 300484). Circulation Research. 2013.

168. Lee S, Vinegoni C, Feruglio PF, Fexon L, Gorbatov R, Pivoravov M, et al. Real-time in vivo imaging of the beating mouse heart at microscopic resolution. Nat Commun. 2012;

169. Liebetrau C, Hoffmann J, Dörr O, Gaede L, Blumenstein J, Biermann H, et al. Release kinetics of inflammatory biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. Circ Res. 2015;

170. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intracellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. J Clin Invest. 1989;

171. Huebener P, Abou-Khamis T, Zymek P, Bujak M, Ying X, Chatila K, et al. CD44 Is Critically Involved in Infarct Healing by Regulating the Inflammatory and Fibrotic Response. J Immunol. 2008;

172. Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. Cell Tissue Res. 2006;

173. Svee K, White J, Vaillant P, Jessurun J, Roongta U, Krumwiede M, et al. Acute lung injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is mediated by CD44. J Clin Invest. 1996;

174. Henke C, Bitterman P, Roongta U, Ingbar D, Polunovsky V. Induction of fibroblast apoptosis by anti-CD44 antibody: Implications for the treatment of fibroproliferative lung disease. Am J

Pathol. 1996;

175. Iyer RP, Patterson NL, Zouein FA, Ma Y, Dive V, De Castro Brás LE, et al. Early matrix metalloproteinase-12 inhibition worsens post-myocardial infarction cardiac dysfunction by delaying inflammation resolution. Int J Cardiol. 2015;

176. Ključević N, Boban D, Milat AM, Jurić D, Mudnić I, Boban M, et al. Expression of leukocytes following myocardial infarction in rats is modulated by moderate white wine consumption. Nutrients. 2019;

177. Ključević N, Milat AM, Grga M, Mudnić I, Boban M, Grković I. White Wine consumption influences inflammatory phase of repair after myocardial infarction in rats. J Cardiovasc Pharmacol [Internet]. 2017 Jul 19 [cited 2020 Mar 26];70(5):293–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28731891

178. Flesch M, Schwarz A, Böhm M. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 1998;275(4 44-4):1183–90.

179. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 1993;265(2 34-2).

180. Mudnic I, Budimir D, Modun D, Gunjaca G, Generalic I, Skroza D, et al. Antioxidant and vasodilatory effects of blackberry and grape wines. J Med Food. 2012;15(3):315–21.

181. Dell'Agli M, Buscialà A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. Cardiovasc Res. 2004;63(4):593–602.

182. Eder U, Butter M, Zirbisegger E, Reinsberger L, Bucar F, Wintersteiger R, et al. Influence of several Styrian wines on bovine coronary artery contractions induced by endogenous agents. J Biochem Biophys Methods. 2004;61(1-2 SPEC. ISS.):169–82.

183. Sparwel J, Vantler M, Caglayan E, Kappert K, Fries JWU, Dietrich H, et al. Differential effects of red and white wines on inhibition of the platelet-derived growth factor receptor: Impact of the mash fermentation. Cardiovasc Res. 2009;81(4):758–70.

184. Cui J, Tosaki A, Bertelli AAE, Bertelli A, Maulik N, Das DK. Cardioprotection with white wine. Drugs Exp Clin Res. 2002;

185. Rodríguez-Morató J, Boronat A, Kotronoulas A, Pujadas M, Pastor A, Olesti E, et al.

Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. Drug Metabolism Reviews. 2016.

186. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Samuel SM, Akita Y, Zhan L, Bertelli AAE, et al. White wine induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury is mediated by life extending Akt/FOXO3a/NFκB survival pathway. J Agric Food Chem. 2008;

187. Van Berlo JH, Molkentin JD. An emerging consensus on cardiac regeneration. Nature Medicine. 2014.

188. Chung TW, Choi HJ, Kim SJ, Kwak CH, Song KH, Jin UH, et al. The ganglioside GM3 is associated with cisplatin-induced apoptosis in human colon cancer cells. PLoS One. 2014;9(5).

189. Hanai N, Nores GA, MacLeod C, Torres-Mendez CR, Hakomori S. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 and lyso-GM3 in tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem. 1988;

190. Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S. Cell growth regulation through GM3-enriched microdomain (glycosynapse) in human lung embryonal fibroblast WI38 and its oncogenic transformant VA13. J Biol Chem. 2004;

191. Bremer EG, Schlessinger J, Hakomori S. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem [Internet]. 1986 Feb 15 [cited 2020 Apr 17];261(5):2434–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2418024

192. Wells A, Souto JCS, Solava J, Kassis J, Bailey KJ, Turner T. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist limits DU-145 prostate cancer growth by attenuating epidermal growth factor receptor signaling. Clin Cancer Res. 2002;

193. Davidson NE, Gelmann EP, Lippman ME, Dickson RB. Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines. Mol Endocrinol. 1987;1(3):216–23.

194. Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S. Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor. J Biol Chem. 2005;

195. Mi LY, Ettenson DS, Edelman ER. Phospholipase C-delta extends intercellular signalling range and responses to injury-released growth factors in non-excitable cells. Cell Prolif. 2008;

196. Nohara K, Wang F, Spiegel S. Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat [Internet]. 1998 Mar [cited 2020 Mar 26];48(2):149–57. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596486

197. Markotić A, Čulić VČ, Kurir TT, Meisen I, Büntemeyer H, Boraska V, et al. Oxygenation alters ganglioside expression in rat liver following partial hepatectomy. Biochem Biophys Res Commun. 2005;

198. Oliva JP, Valdés Z, Casacó A, Pimentel G, González J, Álvarez I, et al. Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with 99mTc. Breast Cancer Res Treat. 2006;

199. Marquina G, Waki H, Fernandez LE, Kon K, Carr A, Valiente O, et al. Gangliosides expressed in human breast cancer. Cancer Res. 1996;

200. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. Breast Cancer Research. 2010.

201. Ravindranath MH, Muthugounder S, Presser N, Ye X, Brosman S, Morton DL. Endogenous immune response to gangliosides in patients with confined prostate cancer. Int J Cancer. 2005;

202. Zen K, Cui LB, Zhang CY, Liu Y. Critical Role of Mac-1 Sialyl Lewis X Moieties in Regulating Neutrophil Degranulation and Transmigration. J Mol Biol. 2007;

203. Zen K, Liu DQ, Guo YL, Wang C, Shan J, Fang M, et al. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. PLoS One. 2008;

204. Huang S, Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, Safa AR. Human GM3 Synthase Attenuates Taxol-Triggered Apoptosis Associated with Downregulation of Caspase-3 in Ovarian Cancer Cells. J Cancer Ther. 2012;

205. No Title [Internet]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-131.aspx?geo_country=hr#characteristics

206. Battula VL, Shi Y, Evans KW, Wang RY, Spaeth EL, Jacamo RO, et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. J Clin Invest. 2012;

207. Lombardo Y, de Giorgio A, Coombes CR, Stebbing J, Castellano L. Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. J Vis Exp. 2015;

208. Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, DeCrescenzo GA, Devraj R V., et al. Physiochemical

drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. Bioorganic Med Chem Lett. 2008;

209. Hann MM, Keseŕ GM. Finding the sweet spot: The role of nature and nurture in medicinal chemistry. Nature Reviews Drug Discovery. 2012.

210. https://www.jax.org/strain/002019.

8. SAŽETAK

Ciljevi doktorske disertacije bili su istražiti izražaj adhezijskih molekula na granulocitima i monocitima štakora koji su pred infarkt miokarda konzumirali bijelo vino te izražaj istih molekula na matičnim stanicama karcinoma dojke i prostate nakon tretmana novosintetiziranim inhibitorom fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamidom.

Adhezijske molekule CD15s i CD11b na plazma membranama neutrofila i monocita uključene su u započinjanje, a CD44 i u zaustavljanje upalnog odgovora te cijeljenje nakon infarkta miokarda. Krv Sprague Dawley štakora, koji su konzumirali bijelo vino 4 tjedna prije izazivanja infarkta miokarda, uzorkovana je 24 sata nakon infarkta te analizirana metodom protočne citometrije. Dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima kontrolne skupine, prividno operirane skupine te skupine kod koje nije bilo intervencija. Prividno operirana i skupina u kojoj nije bilo intervencija nisu se razlikovale ni u postotku pojedinih subpopulacija niti u izražaju pojedinih biljega po jednoj stanici. Konzumacija vina posredovala je višestruko povećanje izražaja CD44 na velikim monocitima i na monocitima uobičajene veličine. Budući da CD44 potiče protuupalno djelovanje te sudjeluje u transformaciji fibroblasta u miofibroblaste, pojačan izražaj CD44 otkriva mogući povoljan učinak vina na te važne mehanizme cijeljenja srčanog tkiva.

Djelovanje inhibitora fosfolipaze C analizirano je kroz parametre rasta i preživljenja (MTT test), apoptoze (analiza PI i aneksina-V), postotka matičnih stanica (CD44+CD24-) te glikofenotipa (CD15s i GM3 (NeuAc)) tumorskih linija dojke (MDA-MB-231) i prostate (Du-145). Svi parametri, osim kod MTT testa, određivani su protočnom citometrijom nakon 48-satnog tretmana 2 μM inhibitorom. Učinak pet različitih koncentracija inhbitora tijekom četiri vremenska intervala analiziran je MTT testom. Citotoksični učinak, zapažen kod obiju staničnih linija, kod trostruko negativnog raka dojke je bio posredovan apoptozom. Inhibitor je uzrokovao blago, ali statistički značajno smanjenje postotka subpopulacije matičnih stanica u ukupnoj populaciji raka dojke uz istovremeno značajno povećanje njihova izražaja GM3(NeuAc), važnog inhibitora prijenosa signala čimbenika rasta. Postotak potencijalno metastatske subpopulacije matičnih stanica (CD15s+) bio je snižen kod obiju tumorskih staničnih linija nakon tretmana inhibitorom. MDA-MB-231 stanična linija predstavlja trostruko negativni rak dojke. Uzimajući u obzir činjenicu da je takav tip raka karakteriziran povećanim postotkom matičnih stanica raka te poznavajući njihovu povezanost s povećanim rizikom metastaziranja i smrtnosti, novi inhibitor iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina bi mogao biti djelotvoran za tretiranje ovakvog tipa raka.

9. SUMMARY

The aims of this doctoral thesis were to determine the expression of adhesion molecules on granulocytes and monocytes in rats that consumed white wine before myocardial infarction and on the breast and prostate cancer stem cells after treatment with newly synthesised inhibitor of phospholipase C, 3-amino-5-oxo-*N*-naphthyl-5,6,7,8-tetrahydrotieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide.

Neutrophil and monocyte CD15s and CD11b adhesion molecules are involved in the initiation of inflammation while CD44 molecule is implicated in the resolution of cardiac inflammation as well as in healing processes after the myocardial infarction. Blood of male Sprague Dawley rats, that consumed white wine during 4 weeks before infarction, was sampled 24 hours after infarction and analysed using flow cytometry. This group was compared with water only drinking controls, sham animals (subject to surgery without myocardial infarction) and baseline group (intact animals that received no intervention prior to being sacrificed). Sham animals did not differ from baseline animals nor in the percentage of subpopulations neither in the adhesion molecule expression. Wine drinking was associated with multiple increase in CD44 expression on large monocyte and monocytes. Knowing modulation ability of CD44 to suppress post-infarction inflammation and to transform fibroblast into myofibroblasts, the CD44 finding implicates benefitial role of white wine in the cardiac healing.

The effects of the newly synthesized phospholipase C inhibitor were analyzed through the parameters of growth and survival (MTT test), apoptosis (PI and annexin-V analysis), cancer stem cell percentage (CD44+CD24-), and stem cell glycophenotypes (CD15s and GM3 (NeuAc)) of breast (MDA-MB-231) and prostate (Du-145) tumor lines. All parameters, except for the MTT assay, were determined using flow cytometry, 48 hours after treatment with 2 μM inhibitor. The MTT test analyzed the effect of five different concentrations of inhibitor over four time intervals. Inhibitor produces cytotoxicity in both cell lines, mediated by apoptosis in breast cancer cells, and slightly but statistically significantly lowering breast stem cell subpopulation while GM3(NeuAc) expression per one breast stem cell was increased compared with controls. GM3(NeuAc) is the important inhibitor of growth factor signal transduction. The percentage of potentially metastatic stem cell subpopulation (CD15s+) was lower in both cell lines after treatment with the inhibitor. Cell line MDA-MB-231 represents triple-negative breast cancer. Considering that such cancers are characterized by an increased percentage of breast cancer stem cells and knowing their association with an increased risk of metastasis and mortality, the new phospholipase C inhibitor (belonging to thieno[2,3-*b*]pyridine inhibitors) may be a potentially effective drug for triple-negative breast cancer treatment.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Angela Mastelić

Državljanstvo: hrvatsko

IZOBRAZBA

2009. Prvostupnica inženjerka biotehnologije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska

2011. Magistra inženjerka molekularne biotehnologije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska/ Završen Master 2 iz Bioindustrijskih tehnika, Fakultet znanosti, Sveučilište u Orléans-u, Francuska

31.1.-10.6.2011. Praksa, CNRS, Orléans, Francuska

2013. doktorski studij TRIBE (Translacijska istraživanja u biomedicini)

MATERINSKI JEZIK

Hrvatski

OSTALI JEZICI

Engleski, talijanski, španjolski, francuski

NASTAVNE AKTIVNOSTI

2012.-2013. Biokemija (Odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu)

2012.-2014. Opća i analitička kemija (Odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu)

2013. Biokemija 2 (Odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu)

2013.-2015. Primijenjena biokemija (studij Farmacija)

2013. i 2015. Metode istraživanja u glikomedicini (doktorski studij Biologija novotvorina)

2011.–danas Medicinska kemija i biokemija (studij Medicina), Medicinska kemija (studij Dentalna medicina)

2012.-danas Biokemija (studij Dentalna medicina)

2013.-danas Medical Chemistry and Biochemistry (Medical studies in English)

OSTALE AKTIVNOSTI

2012. Izabrana predavačica za kratko usmeno izlaganje na kongresu europskog udruženja biokemičara FEBS3+, Opatija

2016. Članica Organizacijskog odbora Kongresa Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB) u povodu 40. obljetnice, Split

2017. i 2018. Suvoditeljica radionice „Kemija i vrijeme“ na Festivalu znanosti

2018. Voditeljica radionice „Kemija oko nas“ održane u sklopu Noći istraživača

2018. Završen „Intenzivan tečaj protočne citometrije“, Zagreb

Članica Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB-a)

Članica Hrvatskog biofizičkog društva

Članica Hrvatskog kemijskog društva (HKD-a)

STIPENDIJE I NAGRADE

Stipendija grada Splita tijekom srednjoškolskog obrazovanja

Stipendija grada Splita (1.godina) ili Državna stipendija (tijekom ostalih godina fakultetskog obrazovanja)

2012. Stipendija za sudjelovanje na FEBS3+ konferenciji (Opatija)

2019. Pohvalnica za najkvalitetnije izvođenje nastave iz reda suradničkih zvanja prema ocjenama studentske ankete u akademskoj godini 2017./2018. na studiju Dentalne medicine

SURADNICA NA PROJEKTU

„Patobiokemija glikosfingolipidnih antigena“ 2007.-2014. (voditelj projekta: prof. dr. sc. Anita Markotić, Hrvatsko Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa, broj 216-2160133-0066)

PUBLIKACIJE

Autorica dvaju znanstvenih članka te 8 kongresnih priopćenja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima.

Režić-Mužinić, N., Mastelić, A., Benzon, B., Markotić, A., Mudnić, I., Grković, I., Boban, M. (2018). Expression of adhesion molecules on granulocytes and monocytes following myocardial infarction in rats drinking white wine. *PloS one*, *13*(5), e0196842. doi:10.1371/journal.pone.0196842

Mastelić, A., Čikeš Čulić, V., Režić Mužinić, N., Vuica-Ross, M., Barker, D., Leung, E. Y., Markotić, A. (2017). Glycophenotype of breast and prostate cancer stem cells treated with thieno[2,3-*b*]pyridine anticancer compound. *Drug design, development and therapy*, *11*, 759–769.