

# Učinci umjerene konzumacije bijelog vina na vaskularnu reaktivnost izolirane torakalne aorte štakora

---

Srzić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:261774>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Sara Srzić

**Učinci umjerene konzumacije bijelog vina na vaskularnu  
reaktivnost izolirane torakalne aorte štakora**

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godine

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Sara Srzić

**Učinci umjerene konzumacije bijelog vina na vaskularnu  
reaktivnost izolirane torakalne aorte štakora**

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godine

Mentor rada: Dr. sc. Ivana Mudnić

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
Biotechnology in medicine

Sara Srzić

**The effects of moderate white wine consumption on vascular  
reactivity of the isolated rat thoracic aorta**

Master's thesis

Rijeka, 2022.

## Zahvala

*Željela bih zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Ivani Mudnić, koja je svojim beskrajnim strpljenjem i iscrpnim znanjem omogućila da zadnju stepenicu u svom studiranju uspješno privedem kraju. Bila mi je velika čast poznavati i surađivati sa tako stručnom osobom, punom znanja i entuzijazma.*

*Veliko hvala mojoj komentorici dr. sc. Mirandi Mladinić Pejatović bez koje suradnja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci ne bi bila moguća, pa tako ni izrada ovoga rada.*

*Posebno hvala mojoj obitelji koja je uvijek bila uz mene tijekom godina školovanja, koja mi je pružila bezgraničnu ljubav i podršku, bez njih moj uspjeh nebi bio moguć. Na samom kraju, hvala mom dečku i mojim prijateljima koji su bili uz mene kad sam i sama sumnjala u svoje sposobnosti, koji su vjerovali da to mogu i poticali me u ostvarenju svojih ciljeva.*

Diplomski rad obranjen je dana:

Pred povjerenstvom:

1. Dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović

2. Dr. sc. Jelena Ban

3. Dr. sc. Željka Minić

Rad ima 47 stranica, 7 slika, 6 tablica i 46 literaturna navoda.

*Istraživanje opisano u diplomskom radu izrađeno u sklopu HRZZ 8652 projekta, „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“, voditelja prof. dr. sc. Mladena Bobana.*

## SAŽETAK

Rezultati epidemioloških studija jasno ukazuju na povoljne učinke umjerene konzumacije vina na ljudsko zdravlje, posebice na kardiovaskularni sustav. Vino usporava razvoj ateroskleroze i arterioskleroze ostvarujući protuupalne, antitrombocitne i antioksidacijske učinke. Osim alkohola, vinski polifenoli smatraju se posrednicima ovih učinaka. Tradicionalna macerirana bijela vina s bogatim fenolnim sadržajem privlače pozornost proizvođača i znanstvenika, a njihovi biološki učinci slabije su istraženi. Cilj provedenog istraživanja bio je ispitati i usporediti utjecaj umjerene konzumacije standardnog i maceriranog bijelog vina na vazodilatacijski i vazokonstriksijski odgovor aorte štakora.

Sprague Dawley štakori, mužjaci (N = 45) randomizirani su u 3 skupine i podvrgnuti 4-tjednom konzumacijskom protokolu: kontrolna (K) skupina konzumira isključivo vodu, skupina SV standardno, a skupina MV macerirano bijelo vino. Nakon konzumacije slijedi izolacija torakalne aorte štakora i preparacija vaskularnih prstenova. Prstenovi svih skupina (N = 107) dodatno se randomiziraju i izlažu jednom od dva doza - učinak protokola u *in vitro* uvjetima: vazodilatacijski gdje su prekontrahirani prstenovi tretiraju kumulativnim koncentracijama acetilkolina; i vazokonstriksijski, bez prekontrakcije, s kumulativnim koncentracijama noradrenalina. Raspon je primijenjenih koncentracija acetilkolina i noradrenalina jednak s konačnim koncentracijama u organskom bazenčiću od 1nM do 10  $\mu$ M). Glavne mjere ishoda su maksimalni vazodilatacijski i vazokonstriksijski učinak ( $E_{max}$ ) te koncentracija potrebna za postizanje 50 % maksimalnog učinka ( $EC_{50}$ ).

Vazokonstriksijski učinak nije se razlikovao među skupinama. Međutim, konzumacija maceriranog bijelog vina promijenila je vazodilatacijsku učinkovitost acetilkolina koji je u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 1  $\mu$ M ostvario značajno veći učinak na vaskularnim prstenovima aorta MV štakora. Sukladno, potentnost je acetilkolina bila najveća u MV, nešto



manja u SV, a najmanja u K skupini s pripadajućim EC<sub>50</sub> vrijednostima od 43 nM, 57 nM i 70 nM za MV, SV i K.

### **Ključne riječi**

Kardiovaskularni sustav, standardno bijelo vino, macerirano bijelo vino, vaskularni prstenovi, acetilkolin, noradrenalin, vazodilatacijski učinak, vazokonstriksijski učinak, štakor

## SUMMARY

The results of epidemiological studies clearly indicate the beneficial effects of moderate wine consumption on human health, especially on the cardiovascular system. Wine slows the development of atherosclerosis and arteriosclerosis by achieving anti-inflammatory, antiplatelet and antioxidant effects. Except alcohol, wine polyphenols are thought to mediate these effects. Traditional macerated white wines with rich phenolic content attract the attention of producers and scientists, and their biological effects are less well examined. The aim of the study was to examine and compare the impact of moderate consumption of standard and macerated white wine on the vasodilation and vasoconstriction response of the rat aorta.

Male Sprague Dawley rats (N = 45) were randomized into 3 groups and subjected to a 4-week consumption protocol: the control (K) group consumed only water, the SV group standard, and the MV macerated white wine. Following consumption trial, the rat thoracic aortas were isolated and the vascular rings prepared. The rings of all groups (N = 107) were additionally randomized and exposed to one of two *in vitro* dose - response protocols: vasodilatory protocol where the precontracted rings were treated with acetylcholine and vasoconstriction protocol, without precontraction with noradrenaline. Acetylcholine and noradrenaline were applied cumulatively to accomplish final concentrations from 1nM to 10  $\mu$ M in the organ baths. The main outcome measures were the maximal vasodilation and vasoconstriction effect ( $E_{max}$ ) and the concentration of noradrenaline and acetylcholine that produce 50% of maximal effect ( $EC_{50}$ ).

Noradrenaline-induced vasoconstriction effect was similar for all groups. However, the consumption of macerated white wine changed the vasodilation efficacy of acetylcholine, which induced a significantly greater vasodilatory effect of MV rat aorta in the concentration range from 0.1 to 1  $\mu$ M. Accordingly, the potency of acetylcholine was the highest in MV, slightly lower in SV, and the lowest in the K group with corresponding  $EC_{50}$  values of 43 nM, 57 nM and 70 nM for MV, SV and K, respectively.

The obtained results indicate a vasoprotective effect of moderate consumption of macerated white wine in rats. The effect of standard white wine consumption needs to be further clarified.

**Key words**

Cardiovascular system, standard white wine, macerated white wine, vascular rings, acetylcholine, noradrenaline, vasodilation effect, vasoconstriction effect, rat

## Popis skraćénica i oznaka

HDL	lipoproteini visoke gustoće, <i>engl. high-density lipoproteins</i>
LDL	lipoproteini niske gustoće, <i>engl. low-density lipoproteins</i>
NO	dušikov oksid, <i>engl. nitrogen oxide</i>
EDRF	čimbenik relaksacije endotelnog podrijetla, <i>engl. Endothelium-derived relaxing factor</i>
AII	receptori za angiotenzin II
Ach	acetilkolin
EDHF	hiperpolarizacijski čimbenik endotelnog porijekla, <i>engl. Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
ET	endotelin
FP	receptori za prostaciklin
H (H2)	histaminski receptori
His	histamin
K	kalij
M (M2)	muskarinski receptori;
NE	noradrenalin, <i>engl. Norepinephrine</i>
PE	fenilefrin, <i>engl. Phenylephrine</i>
PGI2	prostaciklin
5-HT	serotonin, <i>engl. 5-hydroxytryptamine</i>
TP	receptori za tromboksan
VOC	kanali ovisni o naponu, <i>engl. Voltage operated channels</i>
α	alfa adrenergični receptori

CVD	bolesti kardiovaskularnog sustava, engl. Cardiovascular diseases)
CAD	bolest koronarnih arterija, engl. Coronary artery disease
CHD	koronarna bolest srca, engl. Coronary Heart Disease
MI	infarkt miokarda, engl. myocardial infarction
HF	srčano zatajenje, engl. Heart Failure
TIA	prolazni ishemijski napad, engl. <i>Transient Ischemic Attack</i>
PAD	periferna arterijska bolest, engl. <i>Peripheral artery disease</i>
K	kontrola (skupina životinja koje konzumiraju isključivo vodu)
SV	standardno bijelo vino (skupina životinja koje konzumiraju standardno bijelo vino i vodu)
MV	macerirano bijelo vino (skupina životinja koje konzumiraju macerirano bijelo vino i vodu)
SEM	standardna pogreška sredine , engl. <i>standard error of mean</i>
GC	gvanilat ciklaza
GTP	gvanozin trifosfat
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
eNOS	endotelna NO sintaza
$E_{max}$	maksimalni vazodilatacijski učinak
$EC_{50}$	koncentracija koja izaziva 50% maksimalnog vazodilatacijskog učinka, engl. <i>half maximal effective concentration</i>
CI	interval pouzdanosti, engl. <i>confidence interval</i>
SD	standardna devijacija

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Povijesni aspekt istraživanja zdravstvenih učinaka konzumacije vina .....	1
1.2. Proizvodnja vina .....	2
1.3. Polifenoli iz vina .....	3
1.4. Kardiovaskularne bolesti .....	4
1.4.1. Utjecaj umjerene konzumacije vina na kardiovaskularno zdravlje .....	6
1.5. Ostali utjecaji umjerene kontumacije vina na ljudsko zdravlje .....	6
1.6. Vaskularna reaktivnost .....	8
1.6.1. Vaskularna reaktivnost u <i>in vitro</i> eksperimentalnom modelu ..	11
2. Cilj rada .....	13
3. Materijali i metode .....	14
3.1. Životinje i ishrana .....	14
3.2. Vina .....	15
3.3. Izolacija torakalne aorte i preparacija aortnih prstenova .....	18
3.4. Biokemijska analiza vina: ukupni fenoli, flavonoidi, neflavonoidi ..	21
3.5. Kemikalije.....	22
3.6. Statistička obrada .....	22
4. Rezultati .....	23
5. Rasprava .....	30
6. Zaključak.....	35
7. Literatura .....	37
8. Životopis .....	43

## **1. Uvod**

### **1.1. Povijesni aspekt istraživanja zdravstvenih učinaka konzumacije vina**

Vino je napitak koji se dobiva alkoholnim vrenjem od zrelog i svježeg grožđa, odnosno grožđanog soka. Vino je kroz čitavu povijest bio cijenjeni napitak, bilo zbog svog okusa i/ili zbog pozitivnih učinaka koje ima na zdravlje. Mnogobrojne drevne civilizacije poput Grka, Rimljana i Egipćana konzumirali su vino kao "lijek za dušu i tijelo", a korištenje vina u ljekovite svrhe zabilježeno je u povijesnim zapisima. Iako postoje zapisi o konzumaciji vina stariji više od 7000 godina, pozitivni utjecaj ovog napitka na ljudsko zdravlje nedvosmisleno je istaknut tek 80tih godina prošlog stoljeća kada su francuski epidemiolozi opisali epidemiološki fenomen i uveli jezičnu tvorevinu "francuski paradoks" (engl. *French paradox*) (1).

Pojam se odnosi na smanjenu incidenciju kardiovaskularnih bolesti među Francuzima unatoč konzumaciji hrane bogate zasićenim mastima. Znanstvenici su taj fenomen pripisali učestaloj konzumaciji vina. Francuski paradoks potaknuo je istraživanja učinaka vina te između ostaloga, doveo do identifikacije brojnih spojeva, ponajprije polifenola (2).

Stari su Grci raspravljali o širokoj primjeni vina u medicini. Hipokrat (460.-370. g.pr.Kr.) je izvjestio o terapijskim svojstvima vina, napitka koji je imao široku upotrebu, a koristio se kao dodatak prehrani u kahektičnih bolesnika, kao diuretik, antipiretik, purgativ, antiseptik te antidepresiv.

Sastav vina čini ovaj napitak izuzetno korisnim kada je riječ o ljudskom zdravlju, ali ne smije se prestati naglašavati kako se povoljni učinci vina na ljudsko zdravlje očituju samo i isključivo kad se vino konzumira umjereno i po mogućnosti u kombinaciji s obrocima.

Brojna su epidemiološka izvješća o dobrobiti umjerene konzumacije vina, osobito na kardiovaskularno zdravlje i povezuju se s nizom bioloških učinaka koji su ispitani u eksperimentalnom *in vivo* i *in vitro* okruženju. Neki od njih su: poboljšavanje lipidnog profila u korist lipoproteina visoke gustoće (HDL, engl. *high-density lipoproteins*) uz smanjenje koncentracije lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *low-density lipoproteins*), smanjenje ekspresija adhezijskih molekula i migracije leukocita, poboljšanje endotelne funkcije uz pojačanu sintezu dušikovog (II) oksida (NO, engl. *nitrogen oxide*), smanjenu agregaciju trombocita i povećanu fibrinolitičku aktivnost, pozitivne promjene u metabolizmu ugljikohidrata uz povećanu osjetljivost na inzulin. Svi ovi učinci doprinose smanjenju kardiovaskularnog rizika (1).

## **1.2. Proizvodnja vina**

Vinarstvo se smatra jednom od najstarijih čovjekovih djelatnosti, a i dan danas vrlo je cijenjena i prosperitetna.

Proizvodnja vina je biološki proces do kojeg dolazi zbog niza biokemijskih transformacija koje su rezultat djelovanja više enzima iz različitih mikroorganizama. Neki od važnijih mikroorganizama u proizvodnji vina su kvasci koji su odgovorni za glavni dio procesa, alkoholno vrenje, zatim bakterije mliječne kiseline koje su odgovorne za drugi najvažniji proces, malolaktičnu fermentaciju, odnosno pretvorbu jabučne u mliječnu kiselinu. Međutim, endogeni enzimi grožđa, kvasaca i ostalih mikroorganizama prisutni u moštu i vinu često nisu dovoljno učinkoviti za samu proizvodnju vina, pa se dodaju komercijalni enzimski pripravci (3).

Bijela vina znatno su siromašnija sastavom od crnih vina, razlog tomu je razlika u procesu proizvodnje bijelih i crnih vina. Bioaktivne komponente u crnom vinu, odnosno fenolni spojevi potječu iz kožice, stabljike ili pulpe grožđa. Ti važni izvori polifenola tijekom prve faze fermentacije se prenose u vino skupa sa grožđanim sokom (moštom). Za razliku od crnih, bijela vina



se proizvode samo od groždanog soka koji ne dolazi u kontakt s kožicom i pulpom grožđa tijekom fermentacije. Pretpostavlja se da je to glavni razlog zašto je bijelo vino znatno siromašnije polifenolima i ostalim antioksidativnim spojevima. Ako je ta hipoteza točna, način da obogatimo sastav bijelog vina i učinimo ga korisnijim za kardiovaskularno zdravlje je promjena u samoj proizvodnji (4).

Za proizvodnju bijelog vina obogaćenog polifenolima korištena je gruzijska metoda proizvodnje vina. Macerirano bijelo vino, kako se još naziva bijelo vino bogato polifenolima, dobiva se tako da groždani sok najprije spontano fermentira u kontaktu s krutim djelovima grožđa. Zatim se bez uklanjanja kožice i sjemenki te dodavanja konzervansa groždani sok s čvrstim djelovima grožđa prenosi u hermetički zatvorene spremnike što omogućuje daljnju fermentaciju vina na konstantnoj temperaturi 120 dana. Ovakva proizvodnja rezultira dobivanjem bijelog vina obogaćenog polifenolnog sastava narančaste ili jantarne boje (5).

### **1.3. Polifenoli iz vina**

Polifenole svrstavamo u veliku i heterogenu skupinu fitospojeva koji se nalaze većinom u hrani biljnog porijekla, kao što su čaj, kava, vino, žitarice, povrće, mahunarke, voće, ponajviše bobičasto voće. Najrasprostranjeniji i najbolje proučeni spojevi iz skupine polifenola su flavonoidi, koji obuhvaćaju nekoliko tisuća spojeva, među kojima su flavonoli, flavan-3-oli, flavononi, flavoni, antocijanini i izoflavoni. Preporučena dnevna doza polifenola je približno 1g.

Epidemiološka istraživanja dala su saznanja o povezanosti prehrane bogate polifenolima i kroničnih oboljenja bolesti kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, hipertenzija i rak. Vaskularna zaštita također može biti posljedica izravnog djelovanja polifenola na endotelnu funkciju. Naime, Schini-Kerth i suradnici dokazali su vaskularnu

zaštitu uzrokovanu polifenolima iz prirodnih spojeva u ex-vivo i eksperimentalnim modelima kardiovaskularnih bolesti, uključujući dijabetes i metabolički sindrom. Franzini i suradnici došli su do saznanja da prehrana bogata prirodnim izvorima polifenola, kao što su crno vino, bobičasto voće, grejp i tamna čokolada, poboljšava endotelnu funkciju u populaciji s niskim kardiovaskularnim rizikom. Khan-a i suradnici proćavali su učinke polifenola kakaa na upalne procese povezane sa kardiovaskularnim sustavom. Istraživanja su pokazala da konzumacija kakaa, smanjuje krvni tlak, pozitivno utjeće na razine triglicerida u krvi te smanjuje glukozu natašte u bolesnika s visokim krvnim tlakom i dijabetesom.

U istraživanjima utjecaja konzumacije alkoholnih pića na učestalost oboljenja od dijabetesa, znanstvenici su došli do saznanja kako su manje oboljevali pojedinci koji uz uravnoteženu prehranu umjereno konzumiraju neku vrstu alkoholnih pića u odnosu na pojedince čija prehrana ne uključuje nikakve alkoholne napitke (6).

#### **1.4. Kardiovaskularne bolesti**

Kardiovaskularni se sustav sastoji od srca i krvnih žila. Bolesti kardiovaskularnog sustava (CVD, engl. *Cardiovascular diseases*) vodeći su uzrok smrtnosti u svijetu. Kardiovaskularne bolesti obuhvaćaju širok spektar poremećaja, a dijele su u 4 glavne skupine:

1. Bolest koronarnih arterija (CAD, engl. *Coronary artery disease*), odnosno koronarna bolest srca (CHD, engl. *Coronary Heart Disease*) rezultat je smanjenog protoka krvi u miokardu te posljedično uzrokuje anginu pektoris i infarkt miokarda (MI, engl. *Myocardial infarction*). Infarkt miokarda može zahvatiti veliki dio srćane stijenke i u konaćnici dovesti do srćanog zatajivanja (engl. *Heart Failure*, HF)

2. Cerebrovaskularna bolest (engl. *Cerebrovascular disease* uključuje moždani udar i prolazni ishemijski napad (TIA, engl. *Transient Ischemic Attack*).
3. Periferna arterijska bolest (PAD, engl. *Peripheral artery disease*) osobito zahvaća udove, a karakteriziraju je napetost, bolovi i slabost u mišićima najčešće donjih ekstremiteta.
4. Aortna i arterijska ateroskleroza patogeni je proces do kojeg dolazi u arterijama i aorti, a uzrokuje smanjenje ili potpuni prekid protoka krvi zbog upalnih ateromateznih plakova koji mogu ulcerirati, aktivirati trombogenezu i zatvoriti ili suziti lumen krvnih žila (7).

Čimbenici koji negativno utječu i povećavaju rizik oboljenja su šećerna bolest, povećana razina kolesterola, pretilost, pušenje, visok krvni tlak, nedovoljna tjelesna aktivnost te genetske predispozicije (8).

Iako je liječenje osoba oboljelih od kardiovaskularnih bolesti vrlo širok pojam, često se naglašava važnost prevencije bolesti i promjene načina života. Upravo iz tog razloga je AHA (engl. American Heart Association) razvila koncept tzv. "idealnog kardiovaskularnog zdravlja":

1. Idealna zdravstvena ponašanja: indeks tjelesne mase manji od  $25\text{kg/m}^2$ , zadovoljavajuća količina tjelesne aktivnosti, nepušenje, pridržavanje zdravog, odnosno raznovrsnog načina prehrane
2. Idealni čimbenici zdravlja: ukupni kolesterol manji od  $200\text{mg/dL}$ , arterijski krvni tlak manji od  $120/80\text{ mmHg}$  i koncentracija glukoze u krvi natašte manja od  $100\text{ mg/dL}$  (7).

Vrlo često se spominje i pozitivan utjecaj crnog vina u očuvanju kardiovaskularnog zdravlja. Prekomjerna konzumacija alkohola je štetna u svakom pogledu, pa tako i u razvitku kardiovaskularnih bolesti. Međutim,

brojni su epidemiološki dokazi kako umjerena konzumacija alkoholnih pića ima pozitivan utjecaj na kardiovaskularno zdravlje (8).

#### **1.4.1. Utjecaj umjerene konzumacije vina na kardiovaskularno zdravlje**

Učinak umjerene konzumacije alkohola na ljudsko zdravlje je tijekom posljednjih desetljeća tema od interesa brojnih istraživačkih studija. Umjerenu konzumaciju alkohola nerjetko svako tumači na drugačiji način, ali obično se smatra bocom piva od 355mL, čašom vina od 120mL ili čašom žestokog pića 44mL (9).

Pozitivan utjecaj vina na kardiovaskularno zdravlje posebno je primjećen kod crnog vina. S obzirom na biokemijski sastav crnog vina ne možemo sa sigurnošću tvrditi je li njegov pozitivan utjecaj na kardiovaskularno zdravlje posljedica prisutnosti alkohola ili zajedničkog djelovanja alkohola i antioksidativnih spojeva. Osim alkohola, crno vino sadrži širok raspon bioaktivnih komponenti – polifenola – koji svojim antioksidativnim i protuupalnim djelovanjem mogu pridonjeti u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (10).

#### **1.5. Ostali utjecaji umjerene konzumacije vina na ljudsko zdravlje**

S obzirom na bogatstvo i raznolikost bioaktivnih spojeva u sastavu vina logično je za pretpostaviti da upravo ovo piće ima velik potencijal kada je riječ o zdravlju. Mnogi znanstveni radovi prikazuju biološko djelovanje vina na različite organe i sustave, a njihova vjerodostojnost dokazana je eksperimentalnim i/ili kliničkim studijama. Vino sadrži etanol, fenolne spojeve i mnoge druge prirodne bioaktivne spojeve. Kardioprotektivni učinci

vina posebno su pripisani etanolu i fenolnim spojevima. Navedene komponente komplementarno djeluju na kolesterol, zgrušavanje i protok krvi te na funkciju vaskularnog endotela. Osim fenolnih spojeva dobivenih iz vina, njihovi metaboliti nastali u tankom crijevu i jetrenim stanicama mogu imati važnu ulogu u biološkim učincima vina. Istraživanja su pokazala da se nakon konzumacije umjerene količine vina antioksidativna aktivnost u serumu povećava. Na početku se smatralo da je razlog bogatstvo fenolnih spojeva u vinu, posebno crnom. Međutim, kasnije je dokazano da je akutno povećanje antioksidativnog kapaciteta plazme nakon unosa vina posredovano umjereno povećanom razinom mokraćne kiseline u plazmi. Visoke koncentracije mokraćne kiseline u plazmi mogu dovesti do gihta i povezane su s drugim medicinskim stanjima, uključujući dijabetes i stvaranje bubrežnih kamenaca. Stoga, dokazano je da na antioksidativnu aktivnost utječu najmanje dva mehanizma, fenolni spojevi dobiveni iz vina i plazmatski urati.

Ako se vino konzumira uz obrok, početak povišenja mokraćne kiseline u plazmi poklapa se s razdobljem postprandijalnog oksidativnog stresa (oksidativni stres koji nastaje nakon jela). U skladu sin vitro kr ovim saznanjima znanstvenici su došli do zaključka da se kardioprotektivni učinci umjerene konzumacije vina najbolje očituju tijekom razdoblja postprandijalnog oksidativnog stresa. Ovi mehanizmi pružaju dokaze o pozitivnim učincima vina na ljudsko zdravlje unatoč niskim koncentracijama fenolnih spojeva u krvi čovjeka nakon konzumacije vina. Neapsorbirani fenolni spojevi zaostaju u gastrointestinalnom sustavu nakon unosa vina, što također može doprinjeti antioksidativnoj aktivnosti, na način da lokalno 'pohvataju' slobodne radikale, tako spriječavajući lipidnu peroksidaciju i apsorpciju njezinih citotoksičnih produkata.

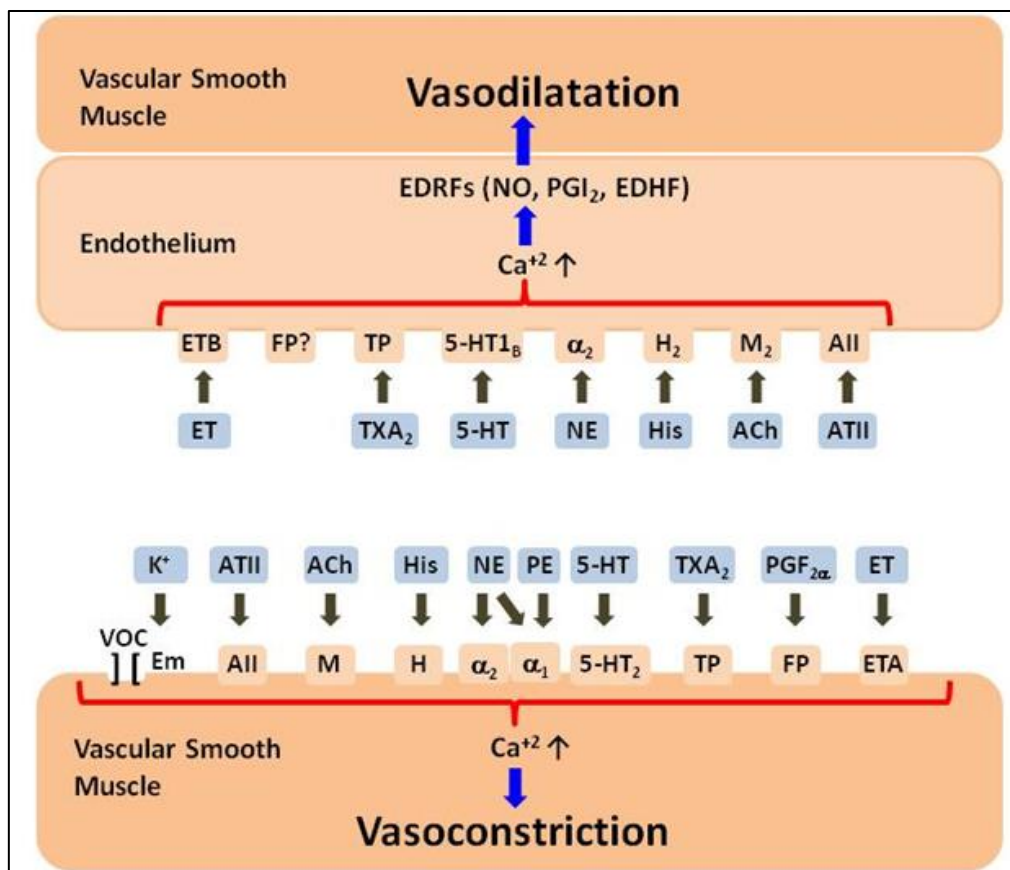
Antimikrobno djelovanje još je jedno od značajnijih bioloških svojstava vina. Znanstveno je dokazano da su marinade na bazi vina učinkovite u borbi protiv štetnih učinaka patogena koji se prenose hranom, a najčešće se nalaze u mesnim produktima. Osim povećanja mikrobiološke sigurnosti

hrane, konzumacija vina uz obrok može biti i značajna u zaštiti od alimentarnih infekcija (infektivno oboljenje digestivnog trakta uzrokovano unošenjem hrane koja sadrži patogene mikroorganizme) (11).

Jedan od mnogih benefita umjerene konzumacije vina je njegov učinak na oksidativni stres. Oksidativni stres je stanje organizma u kojem se dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), biološki najvažnijih slobodnih radikala. Antioksidativni potencijal umjerene konzumacije vina definiran je njegovom sposobnošću da reagira s molekulama ROS ili da ometa njihovu proizvodnju (12).

### **1.6. Vaskularna reaktivnost**

Na endotelnim i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila postoje raznovrsni receptori kojima se modulira napetost vaskularne stijenke, a posljedično i promjer krvne žile te protok krvi i periferni otpor, što je uz minutni srčani volumen odrednica arterijskog tlaka. Slika 1 prikazuje vazodilatacijske i vazokonstriksijske tvari od kojih neki nastaju u endotelu (dušikov oksid i endotelin, primjerice), neki se oslobađaju kao neurotransmitori iz živčanih okončina (noradrenalin, serotonin), a neki djeluju kao endokrini (adrenalin) ili parakrini čimbenici (tromboksen i prostaciklin).



**Slika 1** Vazokonstriksijski i vazodilatacijski čimbenici i pripadajući receptori; EDRF (engl. Endothelium-derived relaxing factor), čimbenik relaksacije endotelnog podrijetla; NO, dušikov okid; AII, receptori za angiotenzin II; ACh, acetilkolin; EDHF (engl. Endothelium-derived hyperpolarizing factor), hiperpolarizacijski čimbenik endotelnog porijekla; ET, endotelin; FP, receptori za prostaciklin; H (H<sub>2</sub>), histaminski receptori; His, histamine; K, kalij; M (M<sub>2</sub>), muskarinski receptori; NE (engl. Norepinephrine) noradrenalin; PE (engl. Phenylephrine), fenilefrin; PGI<sub>2</sub>, prostaciklin; 5-HT, (engl. 5-hydroxytryptamine), serotonin; TP, receptori za tromboksan; VOC, (engl. Voltage operated channels) kanali ovisni o naponu; α, alfa adrenergični receptori (13); datum preuzimanja: 05.07.2022.

Adrenergični živci posredstvom noradrenalina ostvaruju vazokonstriksijski učinak na većini krvnih žila aktivirajući alfa 1 receptore. Ovi su receptori naširoko izraženi u krvnim žilama, a njihova aktivacija rezultira kontrakcijom arterija i vena. Lijekovi koji djeluju kao selektivni alfa 1 -

agonisti kakav je fenilefrin povećavaju periferni otpor i smanjuju kapacitet vena. Povećani arterijski otpor obično rezultira porastom krvnog tlaka koji, međutim, uz očuvane kardiovaskularne reflekse izaziva aktivaciju baroreceptora, aktivaciju tonusa vagusa i usporavanje srčane frekvencije. To je homeostatski mehanizam kojim se uz kontrolu arterijskog tlaka zapravo nastoji održati konstantna perfuzija svih vitalnih organa.

Nadalje, adrenergični živci posredstvom noradrenalina ostvaruju vazodilatacijski učinak na manjem broji krvnih žila, osobito arterija u skeletnim mišićima, aktivirajući beta 2 receptore.

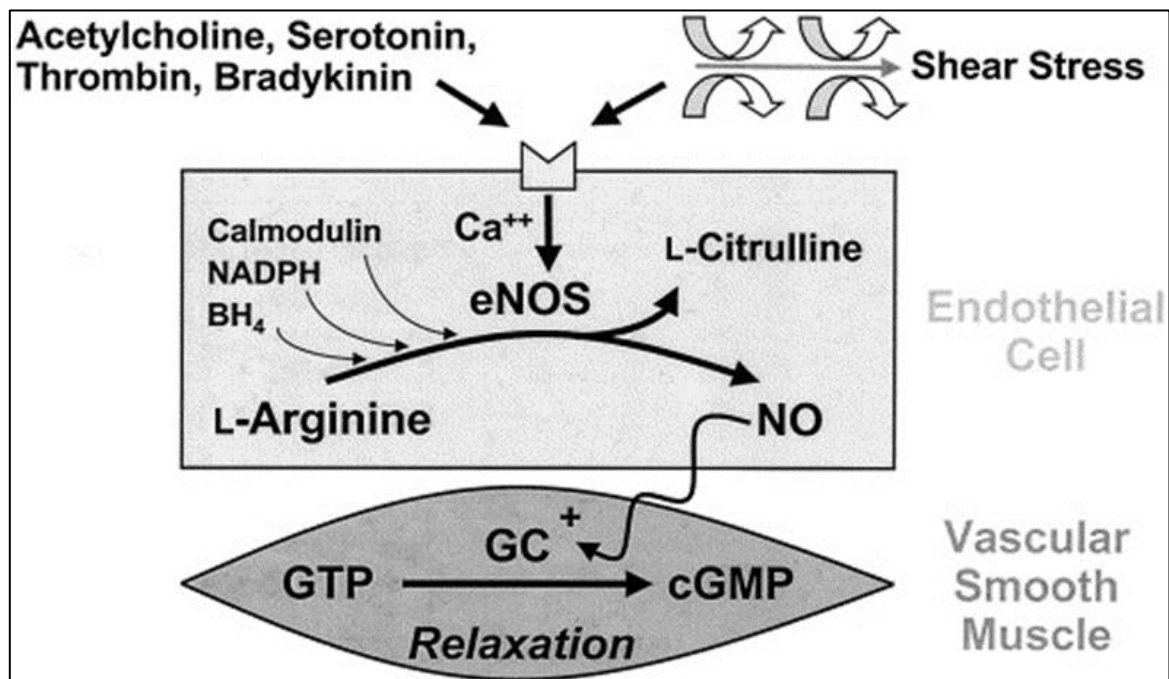
Velike su razlike u tipovima receptora koji prevladavaju u pojedinim krvožilnim bazenima: alfa receptori dominiraju u krvnim žilama kože i utobnih organa i konstrikcija nastaje kao odgovor na noradrenalin; alfa i beta receptori postoje na krvnim žilama skeletne muskulature, te ovisno o većoj aktivaciji jednih ili drugih receptora može nastati vazodilatacija ili vazokonstrikcija.

S druge strane acetilkolin ostvaruje vazodilatacijski učinak samo na krvnim žilama s očuvanim endotelom. Ovaj učinak ostvaruje se putem muskarinskih receptora. Acetilkolin potiče endotel na stvaranje dušikova oksida (NO) koji difundira u susjedne glatke mišićne stanice, veže se sa željezom iz hema enzima topljive gvanilat ciklaze (GC) koji katalizira pretvorbu gvanozin trifosfata (GTP) u ciklički gvanozin monofosfat (cGMP). cGMP aktivira protein-kinazu G koja potom fosforilira odgovarajuće proteine što rezultira smanjenjem unutarstanične koncentracije kalcija i vezorelaksacijom.

Na ovaj način vazodilatacijski učinak ostvaruju i druge tvari, primjerice serotonin, trombin i bradikinin, te mehanički stres koji nastaje zbog protoka krvi (engl. *shear stress*). Sinteza NO-a u endotelu događa se posredstvom enzima endotelne NO sintaze (eNOS) koji iz aminokiseline L-arginina stvara NO uz oslobađanje L-citrulina. U ovoj je, o kisiku i NADPH ovisnoj reakciji, uključen kofaktor tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>), kalmodulin i kalcij (Slika 2).



U slučaju uznapredovale ateroskleroze i endotelne disfunkcije, vazodilatacijski učinak acetilkolina izostaje te aktivacijom muskarinskih receptora na glatkim mišićnim stanicama acetilkolin izaziva vazokonstrikciju.



**Slika 2** NO kao vazodilatacijski čimbenik: aktivacija, sinteza i mehanizam djelovanja (14); datum preuzimanja: 05.07.2022.

### 1.6.1. Vaskularna reaktivnost u *in vitro* eksperimentalnom modelu

Vaskularnu reaktivnost najčešće se eksperimentalno proučava u *ex vivo* modelu izoliranih vaskularnih prstenova u kojima se određene krvne žile izoliraju te iz organizma eksperimentalne životinje premještaju u *in vitro* uvijete, organske bazenčice s oksigeniranom i zagrijavanom izotoničnom otopinom. U ovim uvjetima očuvana je vitalnost vaskularnog tkiva, a mjerenjem vaskularnog tonusa moguće je, ovisno o primjenjenom eksperimentalnom protokolu, između ostalog istražiti i:

- 1) veličinu vazokonstriktorskog i vazodilatorskog odgovora poznatih ili nepoznatih tvari primjenom istih u kumulativnim rastućim koncentracijama (krivulje doza - učinak); konstrukcija krivulja doza - učinak omogućuje izračunavanje potentnosti ( $EC_{50}$ ) i učinkovitosti ( $E_{max}$ ) ispitivanih tvari
- 2) mehanizme ovih odgovora primjenom farmakoloških antagonista (npr. antagonista alfa receptora), inhibitora sinteze određenih čimbenika vazodilatorskog ili vazokonstriktorskog učinka (npr. indometacina kao inhibitora sinteze prostaciklina) ili primjenom nefarmakološke intervencije (npr. mehaničko uklanjanje endotelne stanice)
- 3) promjene vazodilatorskog ili vazokonstriktorskog učinka nakon provedene intervencije u laboratorijskim životinjama (npr. konzumacija vina ili indukcija dijabetesa streptozotocinom (15)).

Važna prednost ove metode je da se vaskularna reaktivnost proučava u kontroliranim uvjetima bez vanjskih neuralnih čimbenika, međudjelovanja cirkulirajućih hormona, protoka krvi ili stresa smicanja. Stoga se procjenjuje da su podatci o potentnosti i učinkovitosti vazokonstriktora ili vazodilatatora dobiveni iz *in vitro* krivulja doza - učinak točniji u usporedbi s onima iz *in vivo* eksperimenata. Ova je metodologija također omogućila međusobnu usporedbu tvari i testiranje kombinacija vazoaktivnih lijekova (16,17).

Ipak, važno je naglasiti kako mjerenje *in vitro* odgovora vaskularnih prstenova može pomoći istraživaču da predvidi što se može dogoditi, a ne što se zapravo događa u integrativnim i kompliciranim *in vivo* uvjetima.

## 2. Cilj rada

Glavni ciljevi rada:

- Istražiti učinke umjerene konzumacije bijelog vina na vazodilatacijski učinak acetilkolina i vazokonstriksijski učinak noradrenalina na vaskularnim prstenovima izolirane aorte štakora
- Istražiti ulogu polifenola usporedbom promjena u vaskularnoj reaktivnosti aorte štakora nakon konzumacije maceriranog bijelog vina bogatog polifenolima i standardnog bijelog vina s manjim polifenolnim sadržajem

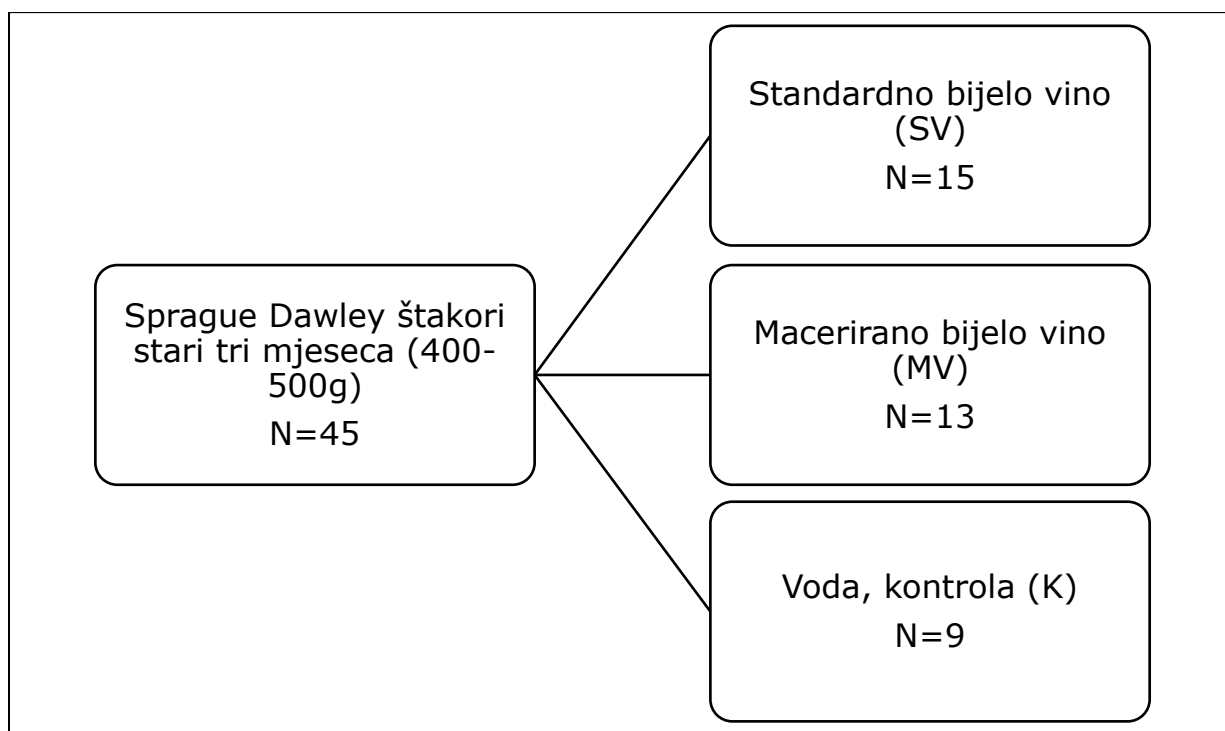
Hipoteze:

1. Umjerena konzumacija standardnog bijelog vina nema učinka na vaskularnu reaktivnost aorte štakora
2. Umjerena konzumacija maceriranog bijelog vina bogatog polifenolima smanjuje vazokonstriksijski učinak noradrenalina i povećava vazodilatacijski učinak acetilkolina

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Životinje i ishrana

U eksperimentu je korišteno 45 štakora soja Sprague-Dawley, mužjaka starih 3 mjeseca i tjelesne mase od 400 do 500g. Životinje su uzgojene u Nastambi za eksperimentalne životinje Sveučilišta u Splitu. Navedene životinje bile su randomizirane u 3 skupine: štakori koji piju standardno bijelo vino (SV), štakori koji piju macerirano bijelo vino (MV) i kontrolni štakori koji piju samo vodu (K) (Slika 3). Vino je štakorima koji su pili standardno bijelo vino i macerirano bijelo vino bilo dostupno *ad libitum*, 24 sata dnevno kroz četiri tjedna, dok im je voda bila ograničeno dostupna tijekom 6 sati dnevno. Kontrolnoj skupini štakora, odnosno onima koji su pili samo vodu, isključivo je voda bila dostupna bez ograničenja 24 sata dnevno.



**Slika 3** Podjela uzorka eksperimentalnih životinja u tri skupine.

Štakori koji su dnevno konzumirali manje od 7 mL vina bili su isključeni iz istraživanja, tako da je konačni uzorak činilo 15 kontrolnih životinja (K, N=15), 13 životinja koje su pile standardno vino (SV, N=13) i 9 životinja koje su pile macerirano vino (MV, N=9). Svježa pića pripremana su svakodnevno te su dostavljana u malim spremnicima s nepropusnom mlaznicom (Ferplast Small Pet Sippy Water Bottle, Castelgomberto, Italy). Unosi tekućina mjereni su jednom dnevno tijekom trajanja eksperimenta.

Životinje su se hranile standardnom hranom za štakore (pellet diet) (MUcedola S.R.L., Settimo Milanese, Milan, Italy) kalorijske vrijednosti od 16,54 kJ/g. Hrana im je bila dostupna *ad libitum*. Tjelesna masa i unos hrane mjereni su jednom tjedno tijekom trajanja pokusa koristeći Grundig KW 4060 Digital Scale vagu.

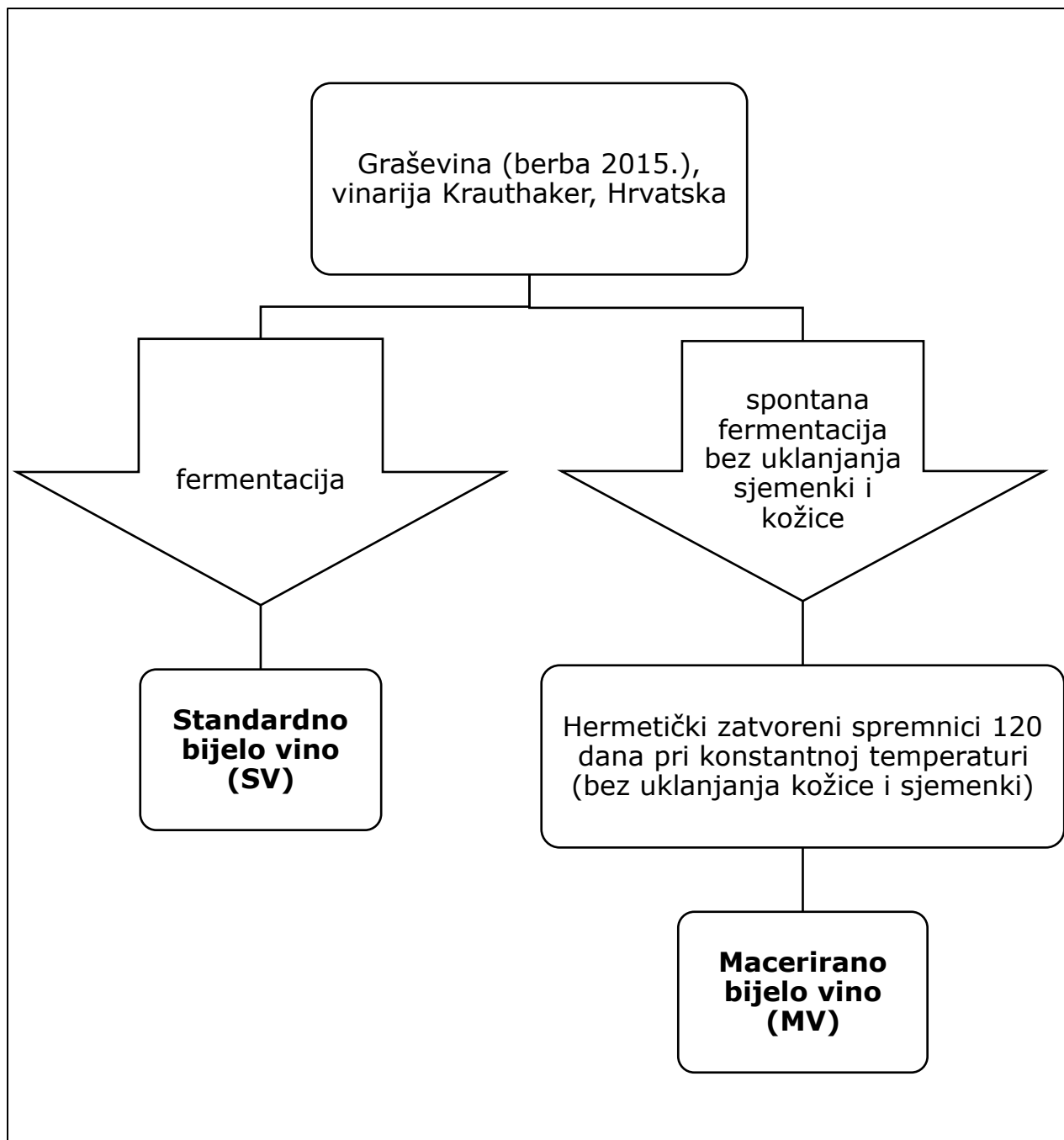
Svaka je životinja bila smještena u zasebnu kavezu, a svi su kavezi bili raspoređeni unutar iste prostorije pri standardnoj temperaturi i uvjetima svjetla (22-25°C, 12h ciklus svjetlo/tama).

Opisana istraživanja koja su uključivala konzumacijski protokol s pokusnim životinjama te vazodilacijski i vazokonstriksijski protokol na izoliranim životinjskim organima odobrena su od Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Splitu i Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede u sklopu projekta „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“.

### **3.2. Vina**

Kao standardno bijelo vino korištena je Graševina berba 2015. godine iz vinarije Krauthaker, Kutjevo u Hrvatskoj. Bijelo vino obogaćeno polifenolima, odnosno macerirano bijelo vino, dobiveno je produljenom

maceracijom od iste sorte grožđa iz istog vinograda i iste godine berbe, a u postupku proizvodnje korišteni su tradicionalni gruzijski vinifikacijski postupci. Princip proizvodnje maceriranog bijelog vina uključivao je prvotno spontanu fermentaciju mošta u dodiru s krutim dijelovima grožđa, kao što su sjemenke i kožice. Nakon spontane fermentacije spremnici su hermetički zatvoreni pri uvjetima konstantne temperature tijekom 120 dana, bez prethodnog uklanjanja sjemenki i kožice grožđa (Slika 4).



**Slika 4** Postupak proizvodnje standardnog bijelog vina (SV) i maceriranog bijelog vina (MV)

Ovakav način proizvodnje bijelog vina rezultirao je dobivanjem vina narančaste ili jantarne boje s visokim udjelom fenola. Dobiveno je bijelo vino prema fenolnom sadržaju bilo usporedivo s crnim vinima. Primjenom akreditiranih metoda učinjena je detaljna analiza vina Internacionalne

organizacije za vinarstvo i vinogradarstvo (17) ,a vrijednosti odabranih parametara (gustoća, pH, sadržaj etanola, slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida i ukupnih kiselina) prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1** Fizikalno-kemijski parametri uzoraka vina

Parametar		V	MV
Gustoća	g/L	989	991
pH	-	3,54	3,90
Etanol	vol%	13,0	13,3
	g/L	102,3	105,0
Ukupne kiseline	g/L	3,56	3,29
Slobodni SO <sub>2</sub>	mg/L	27	5
Ukupni SO <sub>2</sub>	mg/L	124	99

\* V, standardno bijelo vino; MV, macerirano bijelo vino

### 3.3. Izolacija torakalne aorte i preparacija aortnih prstenova

Po završetku konzumacijske studije slijedilo je žrtvovanje životinja, izolacija torakalne aorte i pokusi na izoliranim vaskularnim prstenima.

Anestezija životinja provedena je intramuskularnom injekcijom smjese ketamina (Ketaminol , 1,2 mL/kg, Intervet International, Nizozemska) i ksilazina (Xylapan, 0,4 mL/kg, Vetoquintol, Švicarska). Štakori su dekapitirani nakon što je utvrđeno da ne reagiraju na bolni podražaj. Nakon ekscizije srca, silazna torakalna aorta je disecirana od vezivnog tkiva i smještena u hladnu modificiranu Krebs – Henseleitovu otopinu sljedećeg sastava: NaCl 118.6, KCl 4.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.5, glukoza 10.1 i EDTA 0.020 mM. Aorta je pažljivo očišćena od masnog tkiva i izrezana na prstenove širine 3 – 4 mm. Potom se prstenove namjestilo u organske bazenčiće s istom Krebs – Henseleitovom otopinom

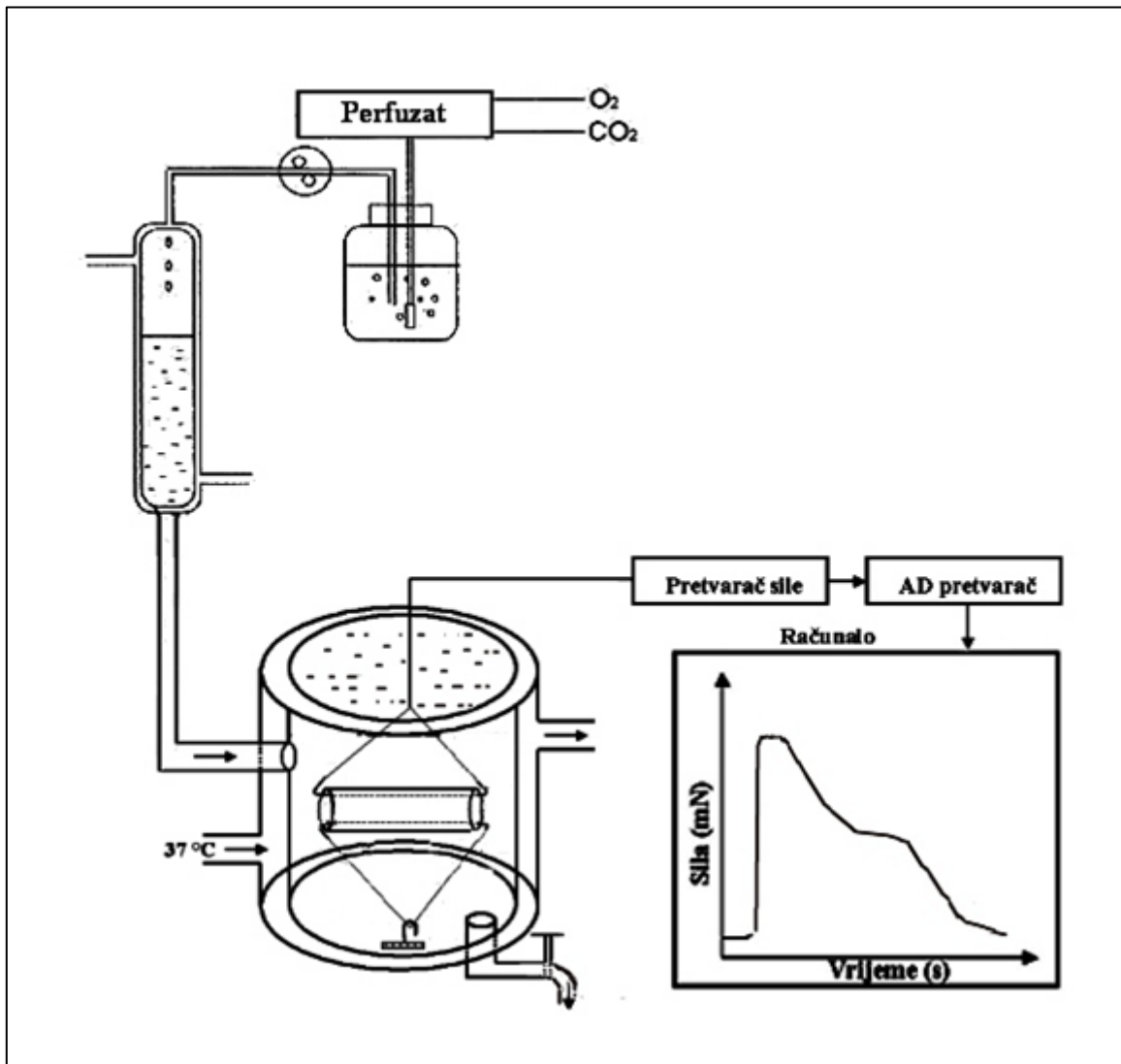


koja se neprekidno zagrijavala i oksigenirala. Temperatura otopine održavala se na  $37,0 \pm 0,2$  ° C korištenjem termostatski kontroliranog cirkulatora vode. Otopina je uravnotežena smjesom plinova od 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> kako bi se održavao parcijalni tlak kisika od  $496 \pm 8$  mm Hg i pH od 7,35 - 7,40. Kroz lumen aortnog prstena provučene su dvije paralelne čelične žice od kojih je jedna pričvršćena za dno organskog bazenčića, a druga povezana kirurškim koncem na izometrični pretvarač vlačne sile (FORT 10, World Precision Instruments, Berlin, Njemačka) u svrhu mjerenja tonusa žilnog prstena. Izometrični pretvarač sile priključivao se na pojačalo (QUAD Bridge, ADInstruments, Castle Hill, Australija) i analogno – digitalni pretvarač (MacLab / 8e, ADInstruments, Castle Hill, Australija) kako bi se bilježile promjene izometrične sile te primjenom računalnog programa (CHART za Windows, verzija 4.2.4, ADInstruments) stvorio kontinuirani grafički prikaz žilnog tonusa na računalu (Slika 5).

Prstenovi su prekontrahirani kontrolnom dozom noradrenalina (NA  $10^{-7}$  mol/L) nakon ispiranja. Kada se dosegnuo stabilni plato kontrakcije, očuvanost endotela se testirala acetilkolinom (Ack  $10^{-6}$  mol/L). Vazokonstrikcija se izražava kao vrijednost razvijene napetosti, tj. vlačne sile, u mjernim jedinicama za silu, mN. Relaksacija se izražava kao postotak smanjenja prethodne, noradrenalinom potaknute vazokonstriksijske napetosti (18). Isključivo prstenovi čija je sila prekontrakcije bila veća od 10 mN i relaksacija veća od 60% izlažu se dalje vazodilatacijskom ili vazokonstriksijskom eksperimentalnom protokolu. Aortni se prstenovi iz iste životinje bili randomizirani u jedan od protokola tako da se jedan dio prstenova ponovno prekontrahirao istom dozom noradrenalina i izlagao kumulativnoj dozi ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  mol/L) acetilkolina (vazodilatacijski protokol, n = prstenova), a ostatak prstenova izlagao kumulativnoj dozi ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  mol/L) noradrenalina (vazokonstriksijski protokol, n = prstenova).

Glavne mjere ishoda su vazodilatacijska i vazokonstriksijska aktivnost acetilkolina i noradrenalina koja je ovisna o dozi, a prikazane su krivuljama doza-učinak. Učinkovitost se izražavala maksimalnim učinkom ( $E_{max}$ , za

acetilkolin vazodilacijski  $E_{max}$  definiran kao smanjenje napetosti izoliranog prstena štakorske aorte nakon inducirane vazokonstrikcije noradrenalinom, a za noradrenalin vazokonstrikciji  $E_{max}$  definiran kao najveća ostvarena vazokonstrikcijska sila). Potentnost se izražavala koncentracijom acetilkolina i/ili noradrenalina koja ostvaruje 50% svog maksimalnog vazodilacijskog i/ili vazokonstrikcijskog učinka,  $EC_{50}$ .



**Slika 5** Shematski prikaz sustava za izolirane vaskularne prstenove (19)

### **3.4. Biokemijska analiza vina: ukupni fenoli, flavonoidi, neflavonoidi**

Primjenom UV – VIS spektrofotometra „Specord 200“ Analytik Jena GmbH, Jena, Njemačka određene su koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida.

Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na oksidaciji fenolnih spojeva do kinona dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa u lužnatim uvjetima (pH otopine je 10 uz dodatak Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Takva metoda naziva se metodom po Folin-Ciocalteu (20). Reagens Folin-Ciocalteu je smjesa nereduciranih volframofosfatnih i molibdofosfatnih aniona žute boje koji se u kontaktu s nastalim fenolatima reduciraju i daju plavo obojenje.



Određivanjem apsorbancije pri 765nm u odnosu na slijepu probu mjeri se intenzitet obojenja koji je proporcionalan koncentraciji fenolnih spojeva.

Za određivanje koncentracije flavonoida i neflavonoida nakon precipitacije s formaldehidom 24 sata pri sobnoj temperature također je korištena metoda po Folin-Ciocalteu. Spomenuta reakcija odvija se u uvjetima niskog pH uz dodatak kloridne kiseline. Dolazi do reakcije formaldehida s flavonoidima pri čemu nastaju kondenzirani produkti koji se talože, a moguće ih je odstraniti filtracijom. Zaostali neflavonoidi u otopini definirani su uz pomoć prethodno spomenute metode.

Iz razlike koncentracije ukupnih fenola i neflavonoida izračunata je koncentracija flavonoida po formuli:

## **Flavonoidi (mg GAE/L) = Ukupni fenoli (mg GAE/L) – Neflavonoidi (mg GAE/L)**

Mjerenja su izvedena u triplikatu, a rezultati su izraženi kao mg/L ekvivalenta galne kiseline (GAE).

### **3.5. Kemikalije**

Za pripravu svih otopina i reagensa primijenjena je deionizirana voda (Milli Q®, Waters Corp., Milford, MA, SAD). Sve su kemikalije za pripremu Krebs – Henseleitove otopine pribavljene od tvrtke VWR Chemicals (Radnor, SAD), osim natrij-hidrogen karbonata koji je kupljen od tvrtke Panreac (Barcelona, Španjolska). Sve su ostale kemikalije i reagensi bili analitičkog stupnja čistoće i kupljeni od Sigma Aldrich (Saint Louis, SAD). Koncentrirane otopine noradrenalina (20 mM) i acetilkolina (20 mM) pripremljene su prethodno, raspodijeljene u manje volumene, pohranjene u hladnjaku (-4°C) i neposredno prije eksperimentalnog protokola razrijeđene do odgovarajućih koncentracija.

### **3.6. Statistička obrada**

Minimalna veličina uzorka štakora za ispitivanje učinka konzumacije bijelih vina na vaskularnu reaktivnost te aortnih prstenova za ispitivanje vazodilatacijske i vazokonstriksijske aktivnosti izračunata je primjenom programa G\*Power 3,1 (G\*Power, Dusseldorf, Njemačka).

Maksimalni vazodilatacijski učinak prikazani su u obliku aritmetička sredina ± standardna pogreška sredine (SEM, engl. *standard error of mean*). EC50 (engl. half maximal effective concentration) vrijednosti su izračunate nelinearnom regresijom i izražene kao aritmetička sredina s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*). Rezultati

biokemijske analize vina *in vitro* izraženi su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD). Hipoteze se testiraju primjenom two-way ANOVA testa i post-hoc Tukey testa s razinom značajnosti  $P < 0,05$  koristeći GraphPrism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD).

#### 4. Rezultati

Prvi dio rezultata odnosi se na dnevni i ukupni unos vina, odnosno vina i vode te tjedni i ukupni unos hrane i tijekom 4 tjedna primijenjenog eksperimentalnog protokola.

Nije bilo razlika u dnevnom unosu vina među štakorima koji su pili standardno ili macerirano bijelo vino kao ni u ukupnom dnevnom unosu tekućine uspoređujući ih međusobno i sa kontrolnim životinjama koje su pile samo vodu. Rezultati su prikazani u Tablici 2.

**Tablica 2** Prosječni unos tekućina u ispitivanim skupinama životinja

	Dnevni unos vina (ml/dan)	Ukupni unos tekućine (vino+voda) (ml/dan)
K	n. p.	32 $\pm$ 1
SV	15 $\pm$ 2	29 $\pm$ 2
MV	11 $\pm$ 1	30 $\pm$ 1

\* n.p., nije primjenjivo; SV, životinje koje konzumiraju standardno bijelo vino, MV, macerirano bijelo vino i K, kontrolne životinje koje konzumiraju samo vodu. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM.

Sve životinje koje piju vino konzumirale su manje hrane na tjednoj bazi i ukupno nakon 4 tjedna primijenjene intervencije u usporedbi s kontrolnim životinjama, i to redom: 163  $\pm$  4 g (SV), 149  $\pm$  4 g (MV) i 178  $\pm$  10 g (K)

tjedno. Sukladno, i u ukupnom unosu hrane postoji razlika između životinja koje piju vino i kontrolnih životinja, ali bez razlike među životinjama obzirom na vrstu vina ( $P = 0.026$  za životinje koje piju standardno vino u odnosu na kontrolne,  $P < 0.001$  za životinje koje piju macerirano vino u odnosu na kontrolne i  $P = 0.079$  za životinje koje piju standardno vino u odnosu na one koje piju macerirano vino).

Masene koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida prikazane su u Tablici 3.

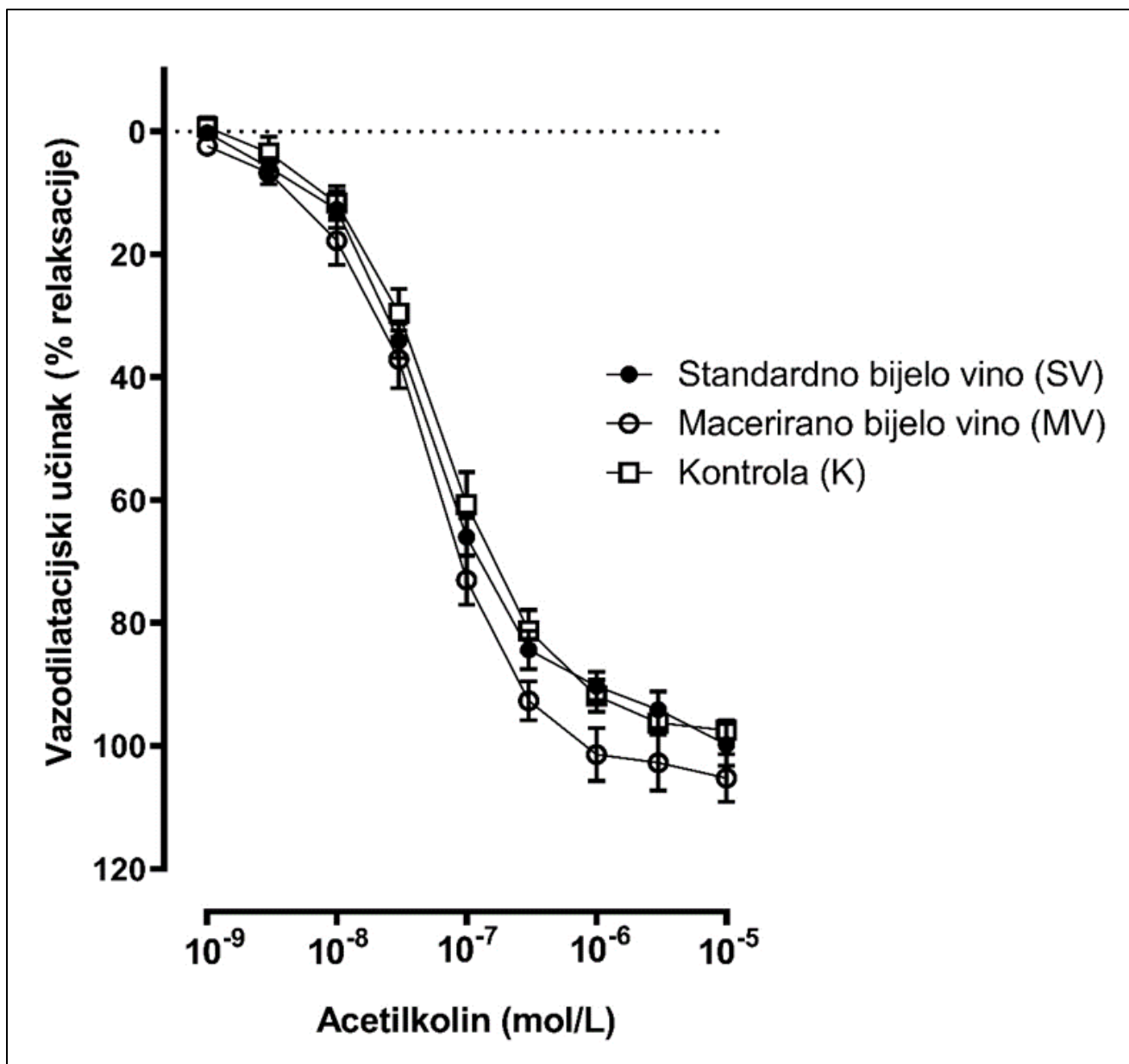
**Tablica 3** Analiza fenolnog sastava vina

	Ukupni fenoli (mg GAE/L)	Flavonoidi (mg GAE/L)	Neflavonoidi (mg GAE/L)
Standardno bijelo vino	305 ± 3*	3*	302 ± 2
Macerirano bijelo vino	2850 ± 35	2477	373 ± 3

\* Rezultati su prikazani su kao aritmetička sredina ± SD nakon tri neovisna mjerenja. Koncentracija flavonoida je izračunata kao razlika između koncentracije ukupnih fenola i koncentracije neflavonoida; GAE, ekvivalenti galne kiseline; \*  $P < 0,05$ , Student t-test.

U ispitivanje vaskularne reaktivnosti uključeno je 107 izoliranih vaskularnih prstenova:  $N = 47$  u pokusima s acetilkolinom i  $N = 60$  u pokusima s noradrenalinom.

Acetilkolin je ostvario značajan i o dozi ovisan učinak na izoliranim vaskularnim prstenovima u svim ispitivanim skupinama. Krivulja doza – učinak prikazana je na Slici 6, a prosječne vrijenosti vazodilacijskog učinka u svakoj primjenjenoj dozi u Tablici 4.



**Slika 6** Vazodilatacija aortnih prstenova štakora koji su konzumirali samo vodu (K), standardno bijelo vino (SV) ili macerirano bijelo vino (MV) prekontrahiranih noradrenalinom nakon izlaganja acetilkolinu; krivulje doza-učinak; Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SEM).

**Tablica 4** Prosječni vazodilatacijski učinak acetilkolina u svakoj primjenjenoj koncentraciji na izoliranoj aorti štakora koji konzumiraju isključivo vodu (K), standardno (SV) ili macerirano (MV) bijelo vino.

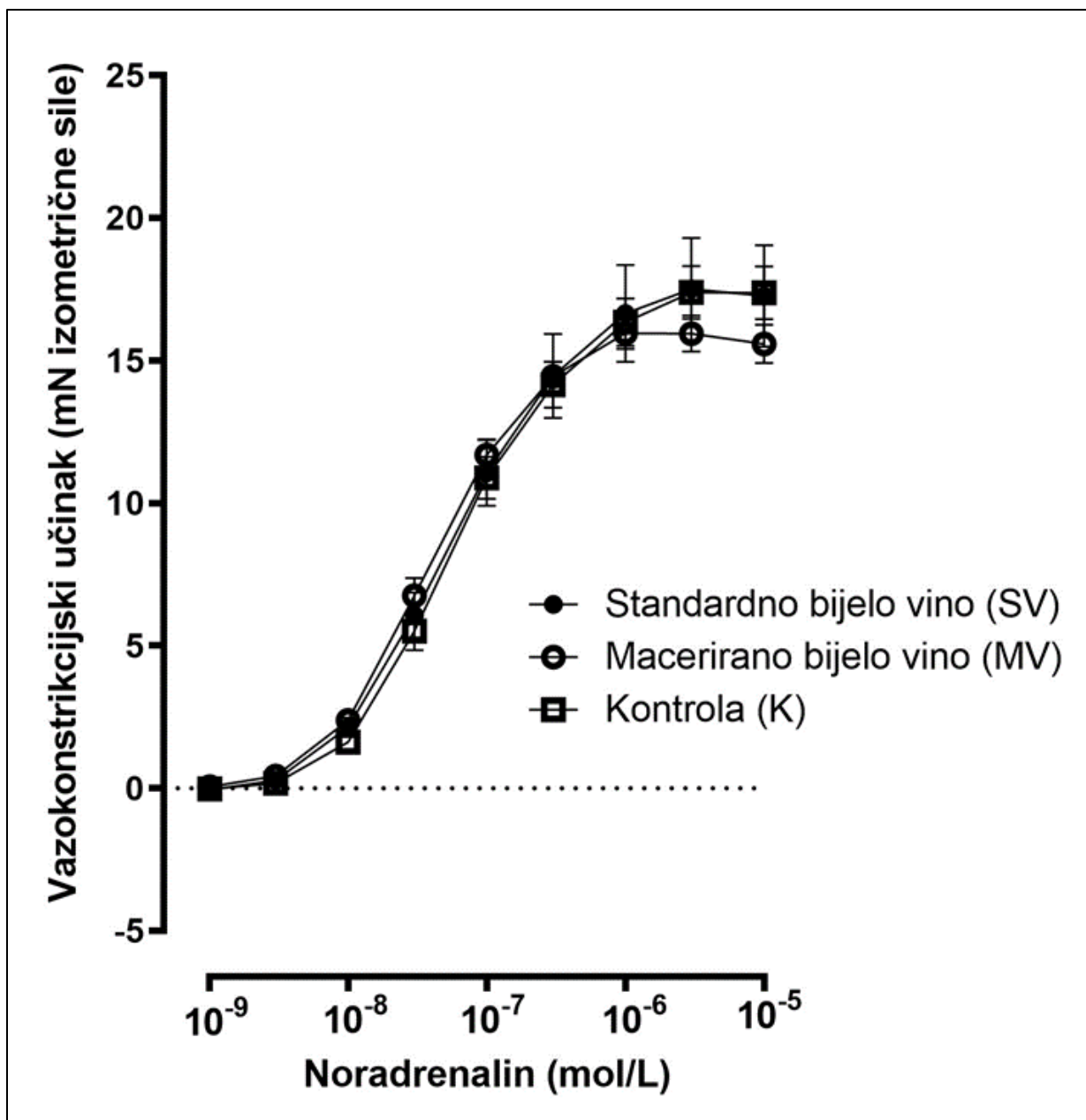
Koncentracija acetilkolina u organskom bazenčiću (M)	Vazodilatacijski učinak (%) (srednja vrijednost (SEM))		
	Kontrola (K)	Standardno bijelo vino (SV)	Macerirano bijelo vino (MV)
$10^{-9}$	-0,7 (1,6)	0,1 (1,1)	2,3 (1,1)
$3 \times 10^{-9}$	3,4 (2,6)	5,8 (1,4)	6,7 (1,8)
$10^{-8}$	11,6 (2,6)	12,6 (2,9)	17,7 (3,9)
$3 \times 10^{-8}$	24,5 (3,9)	34,0 (2,7)	37,0 (4,6)
$10^{-7}$	60,6 (5,2)	66,0 (3,1)	73,0 (3,9)*
$3 \times 10^{-7}$	81,2 (3,3)	84,3 (3,0)	92,6 (3,1)*
$10^{-6}$	91,8 (2,6)	90,2 (2,2)	101,4 (4,2)**
$3 \times 10^{-6}$	96,2 (1,8)	94,0 (2,9)	102,7 (4,5)
$10^{-5}$	97,4 (1,6)	99,7 (3,3)	105,2 (3,8)

\* M, mol/L; ANOVA s *post hoc* Tukey testom \* P < 0,05 vs. K, \*\* P < 0,05 vs. SV.

Maksimalan učinak ( $E_{max}$ ) ostvaren je u najvišoj koncentraciji i nije se značajno razlikovao među skupinama koje su pile vodu ili vino. Pri koncentraciji od  $10^{-7}$  i  $3 \times 10^{-7}$  M acetilkolinska vazodilatacija aorte štakora koji su pili macerirano vino bila je značajno veća u odnosu na kontrolne životinje, a u koncentraciji od  $10^{-6}$  M i u odnosu na one koji piju standardno vino. Značajne su također bile i razlike u potentnosti acetilkolina (Tablica 6) među ispitivanim skupinama.

Noradrenalin je ostvario značajan i o dozi ovisan učinak na izoliranim vaskularnim prstenovima u svim ispitivanim skupinama. Krivulje doza – učinak prikazana je na Slici 7, a prosječne vrijednosti vazokonstriktorskog učinka u svakoj primjenjenoj dozi u Tablici 5.





**Slika 7** Vazokonstrikcija aortnih prstenova štakora koji su konzumirali samo vodu (K), standardno bijelo vino (SV) ili macerirano bijelo vino (MV) nakon izlaganja noradrenalinu; krivulje doza-učinak. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SEM).

**Tablica 5** Prosječni vazokonstriksijski učinak noradrenalina u svakoj primjenjenoj koncentraciji na izoliranoj aorti štakora koji konzumiraju isključivo vodu (K), standardno (SV) ili macerirano (MV) bijelo vino.

Koncentracija noradrenalina u organskom bazečiću (M)	Vazokonstriksijski učinak (mN) (srednja vrijednost (SEM))		
	Kontrola (K)	Standardno bijelo vino (SV)	Macerirano bijelo vino (MV)
$10^{-9}$	0 (0,1)	0 (0,1)	0 (0)
$3 \times 10^{-9}$	0,2 (0,1)	0,3 (0,1)	0,4 (0,1)
$10^{-8}$	1,6 (0,3)	2,1(0,3)	2,4 (0,3)
$3 \times 10^{-8}$	5,5 (0,7)	6,1 (0,8)	6,7 (0,6)
$10^{-7}$	10,9 (0,7)	11,1 (1,2)	11,7 (0,6)
$3 \times 10^{-7}$	14,1 (0,8)	14,5 (1,5)	14,4 (0,5)
$10^{-6}$	16,3 (0,8)	16,6 (1,7)	16,0 (0,5)
$3 \times 10^{-6}$	17,4 (0,9)	17,5 (1,8)	15,9 (0,6)
$10^{-5}$	17,4 (0,9)	17,3 (1,8)	15,6 (0,7)

Maksimalan učinak ( $E_{max}$ ) noradrenalina nije ostvaren u najvišoj koncentraciji već u koncentraciji od  $3 \times 10^{-6}$  M i nije se značajno razlikovao među skupinama koje su pile vodu ili vino. Nadalje, nije postojala razlika u potentnosti noradrenalina među ispitivanim skupinama (Tablica 6).

**Tablica 6** Potentnost acetilkolina i noradrenalina u vaskularnoj reaktivnosti na izoliranoj aorti štakora koji konzumiraju samo vodu (K), standardno bijelo vino (SV) ili macerirano bijelo vino (MV).

	<b>EC<sub>50</sub> (95% CI), M</b>	
	Acetilkolin	Noradrenalin
Kontrola (K)	$7,0 \times 10^{-8} (6,0 \times 10^{-8} - 8,1 \times 10^{-8})$	$2,6 \times 10^{-3} (1,0 \times 10^{-3} - 7,0 \times 10^{-3})$
Standardno bijelo vino (SV)	$5,7 \times 10^{-8} (5,0 \times 10^{-8} - 6,6 \times 10^{-8})$	$3,1 \times 10^{-3} (0,7 \times 10^{-3} - 14,6 \times 10^{-3})$
Macerirano bijelo vino (MV)	$4,3 \times 10^{-8} (3,6 \times 10^{-8} - 5,1 \times 10^{-8})^*$	$9,6 \times 10^{-3} (2,9 \times 10^{-3} - 31,1 \times 10^{-3})$

\* EC<sub>50</sub>, koncentracija potrebna za postizanje 50 % maksimalnog učinka izračunata nelinearnom regresijom; M, mol/L; SV, životinje koje konzumiraju standardno bijelo vino, MV, macerirano bijelo vino i K, kontrolne životinje koje konzumiraju samo vodu.

\* P < 0,05; EC<sub>50</sub> vrijednosti se razlikuju međusobno; F test zbroja kvadrata nakon nelinearne regresije

## 5. Rasprava

Ključni rezultat ovog istraživanja je da umjerena konzumacija maceriranog bijelog vina ostvaruje povoljne učinke na vaskularnu reaktivnost. U slučaju endotel-ovisnog vazodilatacijskog učinka acetilkolina pokazano je da su vazodilatacijski odgovori u višim koncentracijama bili značajno veći kod štakora koji su pili macerirano bijelo vino i u odnosu na one koje su pili standardno bijelo vino kao i na one koji su pili isključivo vodu (Slika 6 i Tablica 4). Nadalje, konzumacija standardnog bijelog vina također ostvaruje određeni povoljan učinak, budući da se u aortama ovih štakora potentnost acetilkolina povećala u odnosu na aorte životinja koje su pile isključivo vodu. Aorte štakora koje su pile macerirano bijelo vino bile su najosjetljivije na vazodilatacijski učinak acetilkolina što se očituje najnižom  $EC_{50}$  acetilkolina tj. najvišom potentnosti. Vazokonstriksijski odgovor krvožilja na noradrenalin nije se značajno promijenio zbog konzumacije vina.

Upravo je na modelu izoliranih vaskularnih prstenova pokazano kako bolesti kao što su arterijska hipertenzija i dijabetes mijenjaju strukturu i funkciju krvožilja te smanjuju vaskularnu reaktivnost uključujući o endotelu ovisnu vazodilatacijsku sposobnost i glatko mišićni vazokonstriksijski odgovor (21).

Farmakoterapija, primjena lijekova čak i kroz kratki vremenski period, pokazala je kako se patofiziološkim mehanizmima narušena vaskularna reaktivnost može poboljšati (22). Štoviše, promjena stila života koja uključuje promjene prehrambenih navika i umjerenu tjelovježbu također ima pozitivne učinke na vaskularnu reaktivnost (23).

U nedavnom istraživanju Bomfim i suradnika pokazano je kako umjerena konzumacija crnog vina povećava endotel-ovisnu vazodilataciju, a smanjuje vazokonstrikciju u dijabetičnih i hipertenzivnih štakora. Ovaj je

učinak posredovan polifenolima, budući da izostaje u životinja koje su konzumirale vodenu otopinu etanola (24).

U konzumacijskim *in vivo* istraživanjima pokazano je kako ekstrakti dealkoholiziranog crno vino (25) i polifenolnih spojevi crnog vina smanjuju arterijski krvni tlak i poboljšavaju endotel ovisni vazodilatacijski odgovor kako u normotenzivnih (26) tako i u spontano hipertenzivnih štakora. Međutim, u ovim je studijama, količine konzumiranih polifenolnih spojeva bile su mnogo veće od onih očekivanih tijekom umjerene konzumacije crnog, a pogotovo bijelog vina.

U prethodno provedenoj studiji Musić I. i suradnika u kojoj su štakori bili podvrgnuti 4-tjednom konzumacijskom protokolu koji je uključivao pijenje razrijeđenog crnog vina (6% vol/vol etanola) i naknadnu izolaciju srca i aorte te *in vitro* ispitivanje srčane funkcije u uvjetima ishemije-reperfuzije i vaskularne reaktivnosti u normoksiji i hipoksiji, konzumacija vina nije ostvarila nikakve značajni učinke (18).

Učinci bijelih vina općenito su manje istraživani u odnosu na crno vino, te je pokazano kako ova vina zbog manjeg polifenolnog sadržaja u *in vitro* sustavima imaju slabiji antioksidacijski učinak te da za razliku od crnih vina nemaju izravni vazodilatacijski učinak (27, 28).

U nedavnom istraživanju usporedili smo vazodilatacijski učinak bijelih vina koji su se međusobno razlikovali samo po polifenolnom sadržaju (5). Očekivano, standardno bijelo vino ostvarilo je manji izravni vazodilatacijski učinak čak i u najvišim koncentracijama. U standardnom bijelom vinu upravo su fenolne kiseline i njihovi konjugati dominantni fenolni spojevi koji imaju slabi vazodilatacijski učinak i u koncentracijam puno višim u odnosu na one prisutne u vinima (29). Macerirano bijelo vino ostvarilo je veći izravni vazodilatacijski odgovor koji je sličniji učinku crnih vina (28), kao što je i ukupni sadržaj fenola u maceriranom vinu bio je usporediv s onim u crnim vinima (30). Ovi su rezultati sukladni nedavno objavljenim rezultatima Mihaljević Z. I suradnika (31).

Nekoliko posljednjih istraživanja *in vivo* učinaka umjerene konzumacije bijelih vina provedena na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu pokazala su ipak značajan kardioprotektivni učinak standardnog bijelog vina (32, 33). U sličnom konzumacijskom protokolu štakori su kroz 4 tjedna konzumirali standardno bijelo vino i bili podvrgnuti infarktu te žrtvovani nakon 24h, a vino je ostvarilo značajne učinke na smanjenu ekspresiju prupalnih medijatora u peri-infarktnoj zoni te pojačanu ekspresiju protuupalnih CD44+ monocita.

Pojačani vazodilatacijski odgovor aorte štakora na acetilkolin može se povezati s nizom opisanim povoljnih učinaka vina dokazanih u *in vitro* ili *in vivo* sustavima. U mehanizme akutnih *in vitro* učinaka spada povećana proizvodnja i biodostupnost NO (28, 29, 36, 37, 32), a subakutnih i/ili kroničnih *in vivo* učinaka povećana proizvodnja prostaciklina i EDHF i smanjena proizvodnja endotelina-1 (33, 34). Osim vazodilatacijskog učinka, konzumacija vina ostvaruju protektivne učinke na vaskularno zdravlje i drugim mehanizmima: smanjuje ekspresiju adhezijskih molekula i čimbenika rasta, inhibiraju migraciju i proliferaciju stanica glatkih mišića krvnih žila, te inhibira agregaciju trombocita (38) (41).

Antioksidacijski učinak vina dokazan *in vitro*, također povezan s polifenolnim sadržajem ima važnu ulogu i nakon konzumacije vina *in vivo*, te dolazi do izražaja najviše lokalno u gastrointestinalnom sustavu. Toksični hidroperoksidi nastali tijekom probave, osobito lipida, djeluju kao proupalni medijatori i posreduju oksidativni stres i oštećenje vaskularnog endotela. Konzumacija vina uz obrok može spriječiti ove procese. Citoprotekcija se ostvaruje inhibicijom NADPH oksidaze i pojačanim uklanjanjem superoksidnih radikala i inhibicijom "rasprezanja" (engl. *uncoupling*) eNOS enzima, procesa koji je medijator oštećenja endotela u različitim bolestima.

U našem istraživanju nismo ispitivali mehanizme nastalog poboljšanja vazodilatacijskog odgovora, ali budući da je učinak izraženiji nakon

konzumacije maceriranog vina, ne možemo isključiti polifenole kao potencijalne posrednike.

Važno se osvrnuti na metodologiju provođenja konzumacijske studije opisane u ovom diplomskom radu. Iako su rezultati koji se odnose na dnevni i ukupni unos vina, odnosno vina i vode (Tablica 2) te tjedni i ukupni unos hrane i tijekom 4 tjedna primijenjenog eksperimentalnog protokola već publicirani (42) neizostavan su dio ovog diplomskog rada. Budući da su sve životinje dnevno konzumirale slične ukupne volumene vina i ukupne tekućine, možemo zaključiti kako je intervencija u svih ispitivanih skupina jednoliko provedena čime je ostvaren uvjet za objektivnu usporedbu među skupinama. Odabrani model konzumacije vina usporediv je s modelom umjerenog dobrovoljnog pijenja iz druge studije (43) u kojoj je vino također bilo slobodno dostupno pokusnim životinjama. Štoviše, u našoj studiji nije bilo stresnih postupaka pri unosu vina niti agresivnih načina konzumacije kao što je postavljanje oro- ili nazogastrične sonde i aplikacija vina primjenom gastrične lavaže, a što je dio metodologije u sličnim konzumacijskim studijama (44), (45). Važno je naglasiti da je zaključke našeg istraživanja provedenog primjenom laboratorijskih životinja moguće donekle translatirati na ljudsku populaciju. Usporedbom rezultata provedenog istraživanja sa studijom na ljudskim dobrovoljcima koji su umjerenom konzumirali alkoholna pića zajedno s hranom uvidjeli smo da je u obje studije udio energije iz količine konzumiranog alkoholnog pića u ukupnom unosu energije usporediv i iznosi oko 8 % (46).

Svjesni smo da je izostanak skupine koja bi pila vodenu otopinu s volumnim postotkom etanola jednakim onome u ispitivanim vinima predstavlja ograničenje provedene studije. Ipak primjenom standardnog i maceriranog bijelog vina s istim alkoholnim sadržajem omogućili smo donekle razlikovanje učinaka posredovanih primarno alkoholom od onih posredovanih polifenolima.

Opisana su istraživanja u skladu s trendovima u smislu etnofarmakološkog pristupa istraživanjima pravilne prehrane i zdrave hrane, a ostvareni rezultati predstavljaju poticaj uravnoteženoj prehrani koja je dio našeg mediteranskog sociokulturološkog okruženja.



## 6. Zaključak

Umjerena konzumacija maceriranog bijelog vina ostvaruje povoljne učinke na vaskularnu reaktivnost aorte štakora.

Vazodilatacijski odgovor ovisan o endotelu posredovan acetilkolinom bio je značajno veći kod štakora koji su pili macerirano bijelo vino i u odnosu na one koje su pili standardno bijelo vino kao i na one koji su pili isključivo vodu.

Aorte štakora koje su pile macerirano bijelo vino bile su najosjetljivije na vazodilatacijski učinak acetilkolina što se očituje najnižom  $EC_{50}$  acetilkolina tj. najvišom potentnosti.

Vinski polifenoli mogu se smatrati posrednicima vazoprotektivnih učinaka umjerene konzumacije maceriranog bijelog vina.

Konzumacija standardnog bijelog vina također ostvaruje određeni vazoprotektivni učinak, budući da se u aortama ovih štakora potentnost acetilkolina povećala u odnosu na aorte životinja koje su pile isključivo vodu.

Učinak konzumacije standardnog bijelog vina potrebno je dodatno razjasniti.

Vazokonstriksijski odgovor krvožilja na noradrenalin nije se značajno promijenio zbog konzumacije vina.

Uvođenje dodatne skupine životinja koje bi pile vodenu otopinu alkohola s volumnim postotkom etanola jednakim onome u ispitivanim vinima značajno bi unaprijedilo postojeću studiju. Međutim, primjena standardnog i maceriranog bijelog vina s istim alkoholnim sadržajem omogućila je donekle razlikovanje učinaka posredovanih primarno alkoholom od onih posredovanih polifenolima.

Opisana su istraživanja u skladu s trendovima istraživanja učinaka pravilne prehrane i biološkog potencijala zdrave hrane, a ostvareni rezultati

predstavljaju poticaj uravnoteženoj prehrani koja je povijesno i tradicijski dio hrvatskog i mediteranskog sociokulturološkog okruženja.

## 7. Literatura

1. Wurz DA. Wine and health: A review of its benefits to human health. Aurand JM, editor. *BIO Web Conf.* 2019;12:04001.
2. Haseeb S, Alexander B, Baranchuk A. Wine and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Circulation.* 2017 Oct 10;136(15):1434–48.
3. Gronbaek M, Deis A, Sorensen TIA, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *BMJ.* 1995 May 6;310(6988):1165–9.
4. Fuhrman B, Volkova N, Suraski A, Aviram M. White Wine with Red Wine-like Properties: Increased Extraction of Grape Skin Polyphenols Improves the Antioxidant Capacity of the Derived White Wine. *J Agric Food Chem.* 2001 Jul 1;49(7):3164–8.
5. Milat AM, Boban M, Teissedre PL, Šešelja-Perišin A, Jurić D, Skroza D, et al. Effects of oxidation and browning of macerated white wine on its antioxidant and direct vasodilatory activity. *J Funct Foods.* 2019 Aug;59:138–47.
6. Dal S, Sigrist S. The Protective Effect of Antioxidants Consumption on Diabetes and Vascular Complications. *Diseases.* 2016 Jul 11;4(4):24.
7. Edgardo Olvera Lopez, Brian D. Ballard, Arif Jan. Cardiovascular Disease [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/>
8. 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 May 1;48(3):270–7.

9. Golan R, Gepner Y, Shai I. Wine and Health–New Evidence. *Eur J Clin Nutr.* 2019 Jul;72(S1):55–9.
10. Castaldo, Narváez, Izzo, Graziani, Gaspari, Minno, et al. Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules.* 2019 Oct 8;24(19):3626.
11. Boban M, Stockley C, Teissedre PL, Restani P, Fradera U, Stein-Hammer C, et al. Drinking pattern of wine and effects on human health: why should we drink moderately and with meals? *Food Funct.* 2016;7(7):2937–42.
12. Artero A, Artero A, Tarín JJ, Cano A. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas.* 2015 Jan;80(1):3–13.
13. Yildiz O, Seyrek M, Gul H. Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery. In: Aronow WS, editor. *Artery Bypass [Internet].* InTech; 2013 [cited 2022 Jul 7]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/artery-bypass/pharmacology-of-arterial-grafts-for-coronary-artery-bypass-surgery>
14. Behrendt D, Ganz P. *Endothelial Function: From Vascular Biology to Clinical Applications.* :9.
15. Mulhern M, Docherty JR. Effects of experimental diabetes on the responsiveness of rat aorta. *Br J Pharmacol.* 1989 Aug;97(4):1007–12.
16. He GW, Yang CQ. Pharmacological Studies and Guidelines for the Use of Vasodilators for Arterial Grafts. In: He GW, editor. *Arterial Grafting for Coronary Artery Bypass Surgery [Internet].* Springer Berlin Heidelberg; 2006 [cited 2022 Jul 7]. p. 39–47. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/3-540-30084-8\\_5](http://link.springer.com/10.1007/3-540-30084-8_5)

17. <https://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-spirituuous-beverages-of-vitivicultural-origin>
18. I. Musić, Darko Modun, V. Katalinić, I. Salamunić, Bernard Kozina, Mladen Boban. Effects of four-weeks moderate drinking of red wine and ethanol on the rat isolated heart and aortic rings reactivity during ischemia and hypoxia. *Periodicum Biologorum*. 2005 Jun;107:165–73.
19. Bradamante V. *Farmakološki priručnik* (2007). :164.
20. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdicphosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult*, 1965. 16: p. 144-158.
21. Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 1986 Dec;132(1):75–8.
22. Soltis EE. Alterations in vascular structure and function after short-term losartan treatment in spontaneously hypertensive ra. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 Aug;
23. de Oliveira SG, Claudio ERG, de Almeida SA, Mengal V, da Silva FB, Silva NF, et al. Exercise training improves vascular reactivity in ovariectomized rats subjected to myocardial infarction. Bader M, editor. *PLOS ONE*. 2019 Apr 24;14(4):e0215568.
24. Guilherme Henrique Souza Bomfim, Diego Castro Musial, Katiucha Rocha, Aron Jurkiewicz, Neide Hyppolito Jurkiewicz. Red wine but not alcohol consumption improves cardiovascular function and oxidative stress of the hypertensive-SHR and diabetic-STZ rats. 2022 Apr 9;2022 *Clinical and Experimental Hypertension Volume 44, 2022-Issue 6*:573–84.

25. Benito S, Lopez D, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *135*:7.
26. Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R. Wine Polyphenols Decrease Blood Pressure, Improve NO Vasodilatation, and Induce Gene Expression. *Hypertension*. 2001 Aug;*38*(2):159–65.
27. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1993 Aug 1;*265*(2):H774–8.
28. 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-Heart Circ Physiol*. 1998 Oct 1;*275*(4):H1183–90.
29. Mudnic I, Modun D, Rastija V, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, et al. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chem*. 2010 Apr 1;*119*(3):1205–10.
30. Stockham K, Sheard A, Paimin R, Buddhadasa S, Duong S, Orbell JD, et al. Comparative studies on the antioxidant properties and polyphenolic content of wine from different growing regions and vintages, a pilot study to investigate chemical markers for climate change. *Food Chem*. 2013 Oct;*140*(3):500–6.
31. Mihaljević Z, Kujundžić T, Jukić V, Stupin A, Drenjančević M, Drenjančević I. White Wine—Induced Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Sprague-Dawley Rats. *Antioxidants*. 2022 May 11;*11*(5):944.
32. 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*. 2017 Nov;*70*(5):293–9.

33. Režić-Mužinić N, Mastelić A, Benzon B, Markotić A, Mudnić I, Grković I, et al. Expression of adhesion molecules on granulocytes and monocytes following myocardial infarction in rats drinking white wine. :11.
34. Andriambelason E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta: Wine polyphenols induce nitric oxide production. *Br J Pharmacol.* 1997 Mar;120(6):1053–8.
35. E Andriambelason, J C Stoclet, R Andriantsitohaina. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. 1999 Feb;33(2):248-54.
36. W Zenebe, O Pechánová, R Andriantsitohaina. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov.* 2003 Feb;52(4):425-32.
37. Soares de Moura R, Miranda DZ, Pinto ACA, Sicca RF, Souza MAV, Rubenich LMS, et al. Mechanism of the Endothelium-Dependent Vasodilation and the Antihypertensive Effect of Brazilian Red wine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Sep;44(3):302–9.
38. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, et al. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004 Oct;500(1–3):299–313.
39. Wallerath T, Poleo D, Li H, Förstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Feb;41(3):471–8.
40. Corder, R., et al.,. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature.* 2001;414(6866): p. 863-4.

41. Dellagli M. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res.* 2004 Sep;63(4):593–602.
42. Milat AM, Mudnić I, Grković I, Ključević N, Grga M, Jerčić I, et al. Effects of White Wine Consumption on Weight in Rats: Do Polyphenols Matter? *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1–7.
43. Arola L, Roig R, Cascon E, Brunet M, Fornos N, Sabate M, et al. Model for Voluntary Wine and Alcohol Consumption in Rats. *Physiol Behav.* 1997 Aug;62(2):353–7.
44. Izbeki F. Opposite effects of acute and chronic administration of alcohol on gastric emptying and small bowel transit in rat. *Alcohol Alcohol.* 2001 Jul 1;36(4):304–8.
45. Healey KL, Landin JD, Dubester K, Kibble S, Marquardt K, Brutman JN, et al. Effects of ethanol on plasma ghrelin levels in the rat during early and late adolescence. *Alcohol.* 2020 Jun;85:111–8.
46. Westerterp-Plantenga MS, Verwegen CR. The appetizing effect of an apéritif in overweight and normal-weight humans. *Am J Clin Nutr.* 1999 Feb 1;69(2):205–12.



## 8. Životopis

### OSOBNJE INFORMACIJE

Sara Srzić

📍 Put plokita 89, 21 000 Split, Hrvatska

📞 +385955932158

✉ sara.srzic1996@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 10/02/1996

| Državljanstvo: hrvatsko

### RADNO ISKUSTVO

03/2021-Danas

#### **Praktikant**

Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Katedra za farmakologiju

Izrada diplomskog rada „*Učinci umjerene konzumacije bijelog vina na vaskularnu reaktivnost izolirane torakalne aorte štakora*“

Mentor rada: Dr. sc. Ivana Mudnić

06/2019-Danas

#### **Pomorski agent**

Agencija pomoć jahtama

Administrativni poslovi u pomorskoj agenciji **L.P.**

#### **Yacht support**

09/2019-09/2020

#### **Student mentor**

Odjel za biotehnologiju

- 07/2018–10/2018     **Rad u ugostiteljstvu**  
JOKER d.o.o. 21000 Split, Put Brodarice 6  
Caffe Bar „OutBox“
- 10/2017-06/2022     **Dadilja**  
<http://dadilje.info/>  
Čuvanje i rad sa djecom različitog uzrasta
- Sezona 2017     **Hostesa/Domaćica na jahtama**  
Franje Tuđmana 213 ,21 213 Kaštel Gomilica, Hrvatska  
YACHT4YOU
- Sezona 2017     **Hostesa/Domaćica na jahtama**  
Marina Mandalina, 22 000 Šibenik, Hrvatska  
YACHTING 2000
- 07/2014-07/2017     **Restorantsko osoblje, kuhar**  
Narodni trg 1, 21 000 Split, Hrvatska  
BEPA

## **OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE**

- 2019-Danas     Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju,  
Diplomski studij Biotehnologija u medicini

2014-2019

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju  
Preddiplomski studij Biotehnologija i istraživanje  
lijekova

2010-2014

Prirodoslovna gimnazija Split

## **OSOBNJE VJEŠTINE**

Materinski jezik      Hrvatski

Strani jezici

engleski

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
C2	C2	C2	C2	C2

Komunikacijske  
vještine

Izvršne komunikacijske vještine, usavršene tijekom rada u ugostiteljstvu. Odlično poznavanje engleskog jezika

Organizacijske  
rukovoditeljske  
vještine

/ Odlične organizacijske vještine usavršene radom u timu

Poslovne vještine      Motiviranost u radu, te želja za usvajanjem novih znanja. Spremnost i snalažljivost u različitim situacijama. Želja za radom kako samostalno, tako i u timu. Višegodišnje iskustvo rada u kuhinji, maštovitost u pripremi hrane, te poznavanje pripreme širokog spektra jela. Dugogodišnje iskustvo u čuvanju djece različite dobi. kvalitetan odnos s djecom stečen kroz razgovor, te različite igre prilagođene uzrastu djeteta. Poznavanje rada i obaveza na mjestu domaćice/hostese broda. Pod tim podrazumjevajući brigu za čistoću i urednost unutarnjeg dijela broda, kao i priremu jela. Dobra komunikacija s gostima i fleksibilnost u dogovorima.

Digitalne vještine      Vješto baratanje Microsoft Office alatima (Word, Excel, PowerPoint, Outlook) i osnovno poznavanje programskih jezika (HTML, c++)

Osnovno poznavanje programa za molekularnu mehaniku i modeliranje: UCSF Chimera, PyMol, Avogadro

Osnovne vještine u statističkim programima Statistica i MedCalc

Python - osnovne vještine

Vozačka dozvola      B

## **DODATNE INFORMACIJE**

Članstva - članica UsbRi (Udruga studenata biotehnologije)

Tečajevi - GMP (Good manufacturing practice)