

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA SOLAR

**IZOLACIJA BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI IZ VINA Z DELOVANJEM NA
IZOLIRANE ŽILE PODGANE**

**ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM THE WINE
WITH THE ACTION ON AN ISOLATED RAT AORTA**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in v laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo na Medicinski fakulteti, pod somentorstvom zn. sod. dr. Gorazda Drevenška.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., somentorju zn. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, asist. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., Lovru Žiberni, mag. farm in Mojci Lunder, dr. med. za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem fantu Mateju, staršem in prijateljem, da so me spodbujali, mi pomagali in verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom zn. sod. dr. Gorazda Drevenška.

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

Ljubljana 2009

Solar Barbara

VSEBINA

VSEBINA.....	II
POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	1
1.1 Zgradba žilne stene.....	1
1.2 Mehanizem skrčenja in sprostitve gladkih mišičnih celic	2
1.3 Vloga endotelija pri uravnavanju skrčenja in sprostitve gladkih mišičnih celic	4
1.3.1 Dušikov oksid.....	5
1.3.2 Prostaglandini	7
1.3.3 Hiperpolarizacijski dejavniki endotelijskega izvora (EDHF)	7
1.3.4 Endotelijska disfunkcija	8
1.4 Sestava vina	8
1.5 Polifenoli	10
1.6 Učinki snovi iz vina na kardiovaskularni sistem.....	20
2. NAMEN DELA.....	22
3. MATERIALI IN METODE	23
3.1 Uporabljeni reagenti in raztopine	23
3.1.1 Reagenti uporabljeni pri pripravi frakcij vina	23
3.1.2 Reagenti uporabljeni pri poskusih na izolirani podganji aorti.....	25
3.2 Priprava frakcij vina Cabernet sauvignon (Goriška Brda, letnik 2004)	26
3.3 Tankoplastna kromatografija-TLC	27
3.4 Določanje vsebnosti polifenolov s Folin-Ciocalteujevo metodo.....	29
3.5 Poskusne živali	31
3.6 Izolirana podganja aorta	31
3.7 Naprava za poskuse na izoliranih žilah	32
3.8 Protokol poskusov	33
3.9 Obdelava podatkov.....	36

4. REZULTATI	37
4.1 Izolacija frakcij vina	37
4.2 Rezultati tankoplastne kromatografije.....	37
4.3 Določanje vsebnosti polifenolov s Folin-Ciocalteujevo metodo.....	40
4.4 Masna spektrometrija	40
4.5 Vpliv Cabernet sauvignona na sprostitvev žilnih obročkov	41
4.6 Vpliv petroletrne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov	42
4.7 Vpliv etrne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov	43
4.8 Vpliv etilacetatne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov	44
4.9 Vpliv butanolne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov.....	45
4.10 Vpliv vodne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov.....	46
4.11 Vpliv podfrakcij petroletrne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov.....	49
4.12 Vpliv podfrakcij butanolne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov	50
4.13 Vpliv podfrakcij vodne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov	51
4.14 Vpliv vinskih frakcij na žilne obročke ob predhodnem dodatku <i>L-NNA</i>	53
5. RAZPRAVA.....	55
5.1 Izolacija frakcij vina	55
5.2 Tankoplastna kromatografija.....	55
5.3 Določanje vsebnosti polifenolov s Folin-Ciocalteujevo metodo.....	56
5.4 Masna spektrometrija	56
5.5 Izolirani žilni obročki podganje aorte.....	57
5.6 Vpliv frakcij vina na sprostitvev žilnih obročkov	58
6. SKLEP IN NAČRTI ZA NADALJNJE DELO	60
7. LITERATURA	61

POVZETEK

Srčno-žilne bolezni so eden od vodilnih vzrokov smrti pri nas in po svetu, zato se na tem področju izvajajo številne študije. Leta 1992 so Renaud in sodelavci predstavili izraz francoski paradoks, da bi poudarili nizko smrtnost med Francozi zaradi ishemične srčne bolezni, kljub veliki prisotnosti nasičenih maščob v njihovi hrani. Ta pojav so pripisali uživanju rdečega vina oziroma varovalni vlogi spojin, ki so prisotne v vinu.

Polifenoli so zanimivi zaradi velikega deleža v naši prehrani, svojih antioksidativnih lastnosti in svoje protektivne vloge pri boleznih povezanih z oksidativnim stresom, kot so kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni ter rak.

V diplomskem delu smo se osredotočili na vpliv vina (Cabernet sauvignon) in frakcij le-tega na kontrakcijo izolirane žile podgane. Frakcije smo pripravili, tako da smo vino zaporedno ekstrahirali s štirimi različno polarnimi topili (petroleter, eter, etilacetat, butanol). Preostanek smo poimenovali vodna frakcija. Namen našega dela je bil ugotoviti, katera frakcija je najbolj aktivna in okvirno okarakterizirati spojine v njih.

Uporabili smo obročke torakalne aorte podgane, ki smo jih namestili v kivete, napolnjene z oksigenirano raztopino po Krebsu-Henseleitu. Aortne obročke smo razdelili v dve skupini: obročki z ohranjenim endotelijem in obročki z inhibiranim encimom NO-sintazo. S pomočjo izometričnega mehano-električnega pretvornika smo merili skrčenje po dodatku izbranega vazokonstriktorja (60 mmol/L KCl) in nato sprostitvev po dodatku različnih koncentracij vina oziroma redčitev frakcij vina.

Vino je povzročilo približno 20 odstotno sprostitvev žilnih obročkov.

Po osnovnih meritvah na žilah s petimi frakcijami smo se osredotočili na tri, in sicer na petroletrno, butanolno in vodno frakcijo. Slednje so povzročile največjo vazorelaksacijsko aktivnost na žilah. Najbolj aktivna je bila vodna, sledili sta ji petroletrna in butanolna frakcija. S tankoplastno kromatografijo smo približno določili prisotne spojine. V butanolni frakciji predvidevamo, da so prisotni antociani, v vodni pa antociani in proantocianidini. Petroletrna frakcija je zaenkrat ostala neznanka.

V nadaljevanju dela smo vodno in petroletrno frakcijo razdelili na 4 podfrakcije, butanolno pa na 3 podfrakcije s preparativno TLC. Pri podfrakcijah sta najobetavnejše rezultate kazali 2. in 4. podfrakcija vodne frakcije, ki sta po višini maksimalne relaksacije primerljivi z rezultati vina. Petroletrni podfrakciji 2 in 4 sta povzročali odstotek relaksacije, ki je podoben butanolnima podfrakcijama 2 in 3.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ach	acetilholin
AC	adenilatna ciklaza
ATP	adenozintrifosfat
$[Ca^{2+}]_i$	znotrajcelična koncentracija kalcijevih ionov
Ca^{2+} kanali	kalcijevi kanali
cAMP	ciklični adenozinmonofosfat
cGMP	ciklični gvanozinmonofosfat
CŽS	centralni živčni sistem
DAG	diacilglicerol
EDCF	krčitveni dejavnik endotelijskega izvora (<i>Endothelium-Derived Contracting Factor</i>)
EDHF	hiperpolarizacijski dejavnik endotelijskega izvora (<i>Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor</i>)
EDRF	sprostitveni dejavnik endotelijskega izvora (<i>Endothelium-Derived Relaxing Factors</i>)
eNOS	endotelijska konstitutivna NO sintaza
ET-1	endotelin 1
GABA	γ -aminomaslena kislina (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GC	gvanilatna ciklaza
GTP	gvanozintrifosfat
HDL	lipoproteini visoke gostote (<i>high density lipoprotein</i>)
iNOS	inducibilna NO sintaza
IP_3	inozitol-3-fosfat
K^+ kanal	kalijev kanal
K_{ATP} kanal	kalijev kanal, odvisen od ATP
K_{Ca} kanal	kalijev kanal, odvisen od kalcija
K-H raztopina	Krebs-Henseleit pufrska raztopina
LDL	lipoproteini nizke gostote (<i>low density lipoprotein</i>)
L-NNA	<i>N w</i> -nitro- <i>L</i> -arginin (zaviralec NO-sintaze)
MF	mobilna faza

MLCK	kinaza lahke verige miozina (<i>Myosine Light Chain Kinase</i>)
NA	noradrenalin
NO	dušikov oksid
NOS	NO sintaza
PDE	fosfodiesteraza
PG	prostaglandin
PGI ₂	prostaciklin
PKA	proteinska kinaza A
PKC	proteinska kinaza C
PKG	proteinska kinaza G
PLC	fosfolipaza C
SERCA	kalcijeva ATPaza na celični membrani sarkoplazemskega retikuluma
SR	sarkoplazemski retikulum
VGCC	napetostno odvisni kalcijevi kanali (<i>Voltage-Gated Calcium Channels</i>)

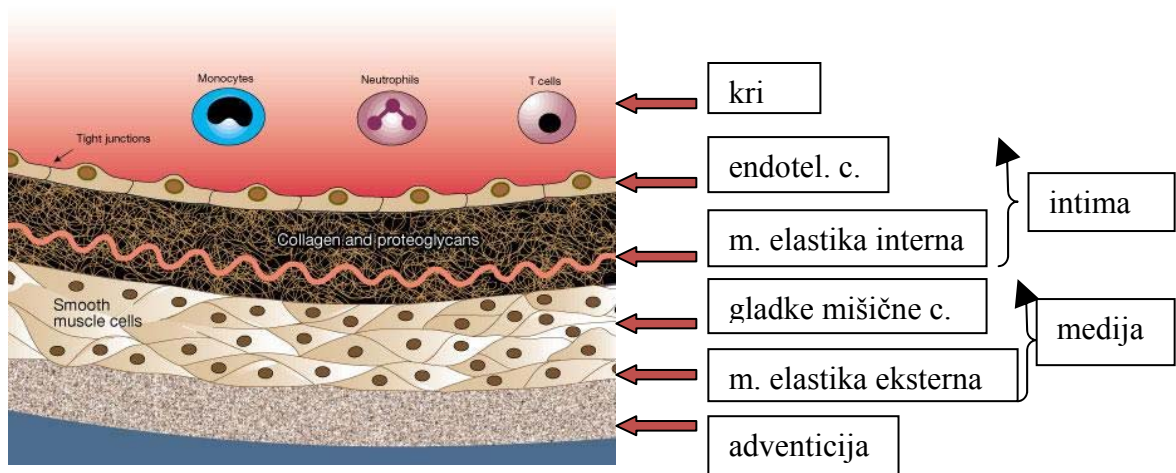
1. UVOD

1.1 Zgradba žilne stene

Ožilje je sestavljeno iz arterij elastičnega tipa, arterij mišičnega tipa, arteriol, kapilar, venul in ven. Različni tipi žil se med seboj razlikujejo v zgradbi žilne stene.

Žilno steno sestavljajo v smeri od lumna proti zunanosti žile (Slika 1):

- **Intima** predstavlja notranji sloj žilne stene. Sestavljena je iz ploščatih endotelijskih celic z bazalno membrano, pod njo pa je tanjša plast krožno potekajočega veziva. Endotelij ima ključno vlogo pri kontroli permeabilnosti, vazokonstrikciji, angiogenezi in regulaciji hemostaze. Membrana elastika interna loči intimo od medije (1).
- **Medijo** gradijo koncentrični sloji gladkih mišičnih celic, mednje se vrivajo elastična, kolagenska in retikularna vlakna ter proteoglikani. (1) Gladke mišične celice vzdržujejo tonus žil. Ta se spreminja glede na lokalno koncentracijo vazoaktivnih snovi in aktivnost simpatičnih živčnih končičev. Hkrati gladke mišične celice izločajo vse ekstracelularne komponente. Membrana elastika eksterna loči medijo od adventicije (1).
- **Adventicija** je zunanja plast žilne stene. Sestavljajo jo elastična in kolagenska vlakna ter živčni končiči avtonomnega živčnega sistema (nervi vascularis), ki uravnavajo kontrakcijo gladkih mišičnih celic. Pri večjih žilah v adventiciji potekajo tudi manjše krvne žile za prehrano zunanje in srednje plasti žilne stene (vasa vasorum) (1).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe arterijske žilne stene

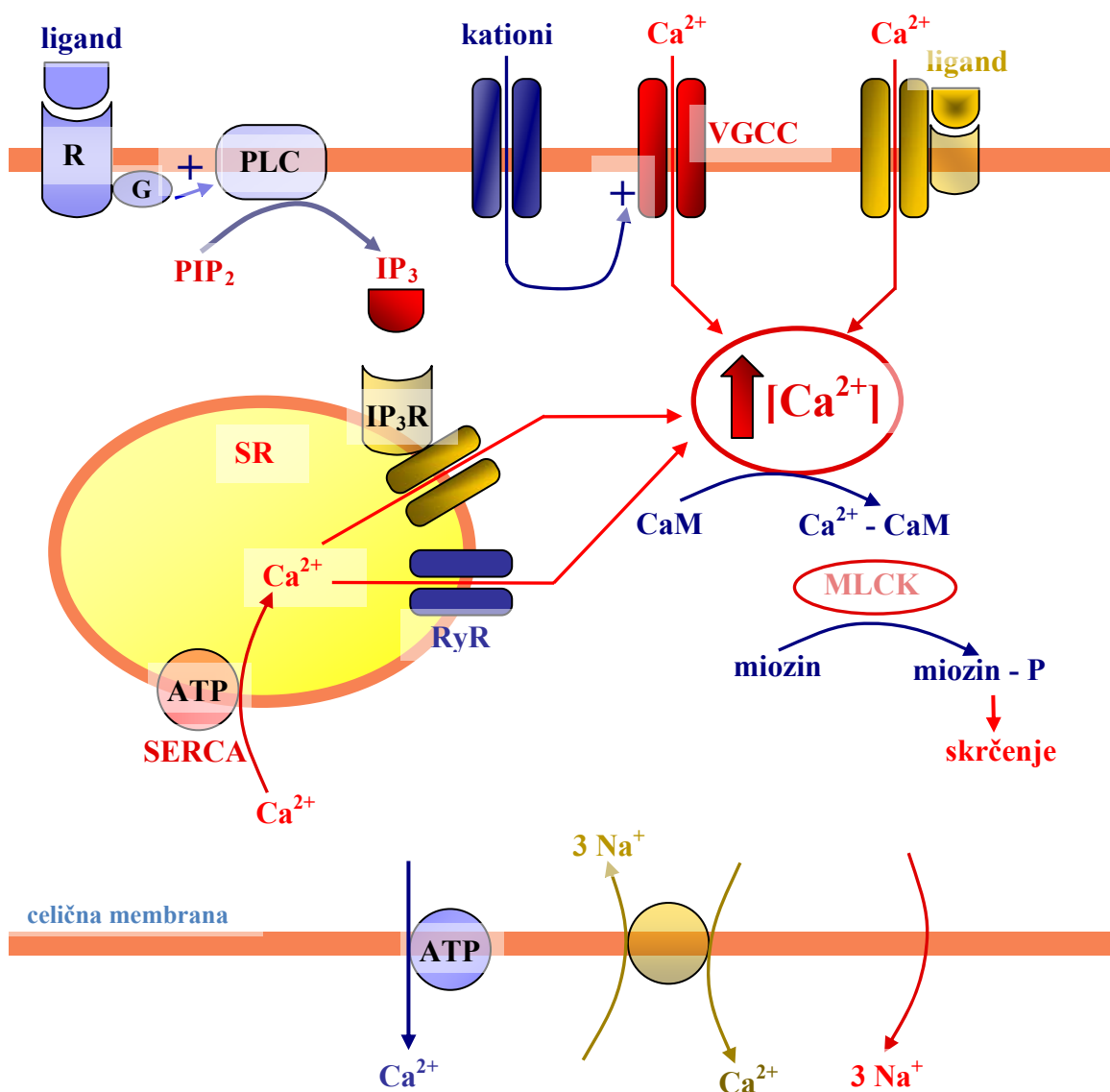
Glavne razlike v zgradbi različnih tipov žil so v sestavi medije. Pri arteriolah je delež gladkih mišičnih celic največji, pri arterijah mišičnega tipa nekoliko manjši, medtem ko je pri arterijah elastičnega tipa bistveno manjši, saj je medija večinoma prepletena z elastičnimi vlakni. Razlike v zgradbi med posameznimi tipi žil vplivajo na hemodinamske lastnosti žile in na delovanje vazoaktivnih snovi (1). Aorta, katere odzivnost smo v pričujoči nalogi spremljali, spada med arterije elastičnega tipa.

1.2 Mehanizem skrčenja in sprostitve gladkih mišičnih celic

Skrčenje žil je neposredno odvisno od delovanja gladkih mišičnih celic žil (Slika 2). Na le-te lahko vplivajo snovi, ki se sproščajo iz simpatičnih živčnih končičev, hormoni v krvnem obtoku, ter snovi, ki jih izloča endotelij.

Skrčitev povzroči bodisi zvišanje koncentracije kalcijevih ionov v gladkih mišičnih celicah ($[Ca^{2+}]_i$) bodisi povečana občutljivost znotrajceličnih struktur zanje. Kalcijevi ioni s kalmodulinom tvorijo kompleks, ki aktivira kinazo lahke verige miozina (MLCK). Ta fosforilira lahko verigo miozina, fosforilacija pa je ključna, saj omogoči interakcijo miozina z aktinom znotraj gladke mišične celice. To privede do nastajanja in kroženja prečnih aktinsko-miozinskih mostičkov in s tem tonične skrčitve gladke mišice (2,3). Kroženje poteka dokler so lahke verige miozina fosforilirane, kar je odvisno od nivoja koncentracije $[Ca^{2+}]_i$ in ATP.

Ko se lahke verige miozina defosforilirajo, se gladka mišična celica sprosti. Reakcija defosforilacije miozina je pospešena z encimom miozinska fosfataza, ki je v celici ves čas prisotna in aktivna. Sprostitev gladke mišične celice je tako odvisna samo od zmanjšanja aktivnosti MLCK. To se lahko zgodi ob delovanju PKA (proteinska kinaza, odvisna od cAMP), ki se aktivira s povišanjem koncentracije cAMP. PKA inaktivira MLCK in poveča izhajanje Ca^{2+} iz celice. Sprostitev gladke mišične celice povzroča tudi povišana koncentracija cGMP z aktivacijo PKG (proteinska kinaza, odvisna od cGMP), ki zavira sproščanje Ca^{2+} iz sarkoplazemskega retikuluma (4).



Slika 2: Shematski prikaz krčenja gladke mišične celice in uravnavanja znotrajcelične koncentracije kalcija. Skrčenje je posledica povišanja znotrajcelične koncentracije kalcija. Ligandi zvišajo $[Ca^{2+}]_i$ po različnih poteh: 1. preko receptorjev (R), ki so sklopljeni s proteinom G (G), ki aktivira fosfolipazo C (PLC); 2. preko napetostno odvisnih kalcijevih kanalov (VGCC), ki se odprejo ob depolarizaciji celice (npr. s KCl); 3. preko receptorsko aktiviranih kalcijevih kanalov. Zniževanje $[Ca^{2+}]_i$ poteka preko: 1. SERCA, ki črpa Ca^{2+} v notranjost SR; 2. Ca^{2+} ATPaze; 3. $3Na^+/Ca^{2+}$ izmenjevalca. Prirejeno po (4).

(PIP₂ – fosfatidilinozitol-difosfat, IP₃ – inozitol-3-fosfat, IP₃R – receptor za vezavo IP₃, MLCK – kinaza lahke verige miozina, CaM – kalmodulin, Ca²⁺-Cam – kompleks kalcija in kalmodulina, RyR – rianodinski receptor, SERCA – SR Ca²⁺ ATPaza)

1.3 Vloga endotelija pri uravnavanju skrčenja in sprostitve gladkih mišičnih celic

Endotelij se aktivno odziva na hemodinamske (npr. strižne sile) in humoralne spremembe (npr. spremembe v parcialnem tlaku O₂ in v pH) s sproščanjem številnih snovi, ki povzročajo skrčenje ali sprostitvev gladkih mišičnih celic. Ravnotežje med temi snovmi omogoča žilno homeostazo (5). Endotelij tako uravnava upornost žil in s tem vpliva na krvni tlak in pretok krvi skozi tkiva. V fizioloških razmerah preprečuje aterosklerozo. Porušenje žilne homeostaze povzroči nagnjenje k povečanemu krčenju žil, adherenci levkocitov, aktivaciji trombocitov, mitogenezi gladkih mišičnih celic, peroksidaciji elementov žilne stene, trombozi, vnetju in remodeliranju krvnih žil, kar vse vodi v nastanek ateroskleroze (6).

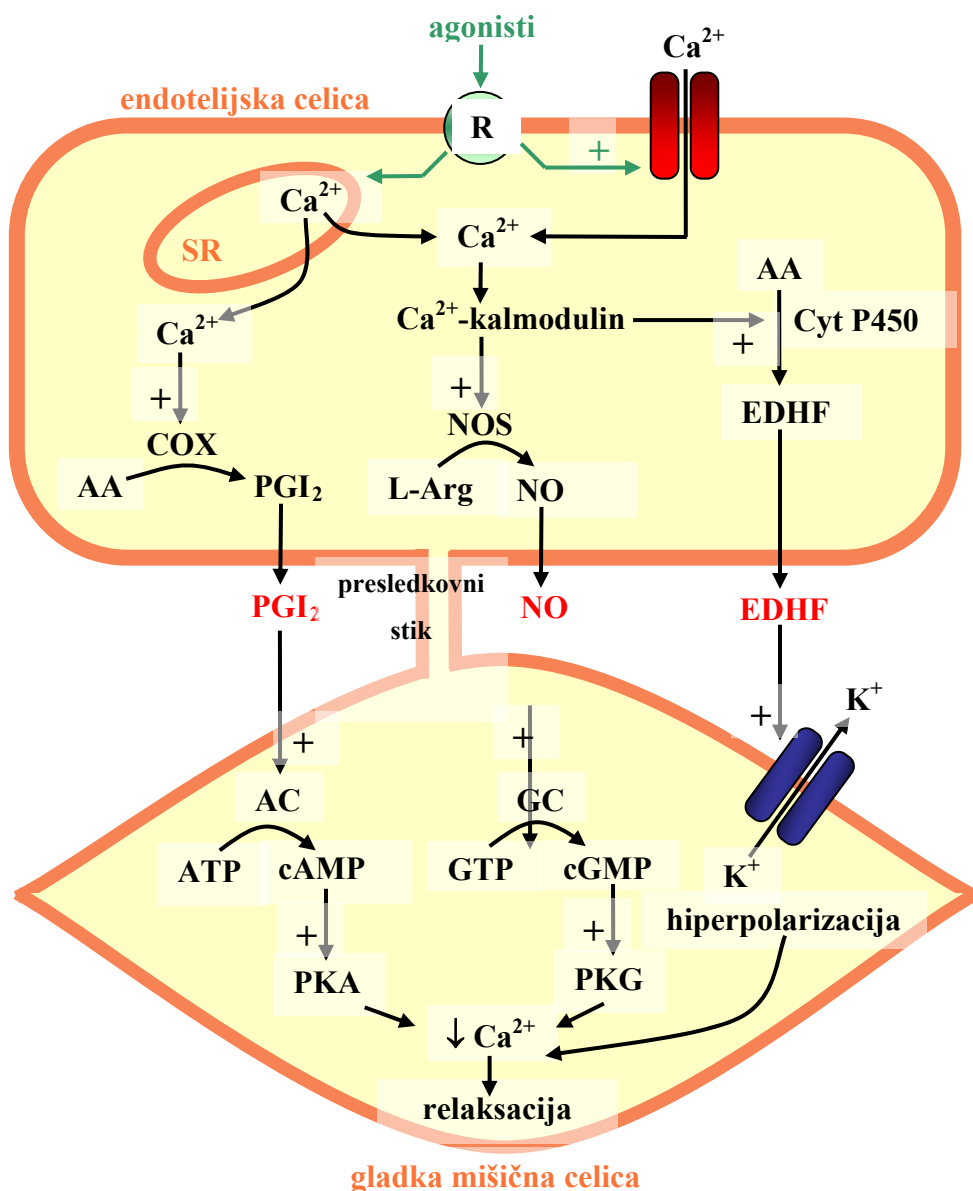
Snovi, ki jih izločajo endotelijske celice in povzročajo skrčenje gladkih mišičnih celic so: endotelini, angiotenzin II, superoksidni anion (O₂^{•-}), nekateri izoprostani, vmesni produkti sinteze prostaglandinov (PGG₂ in PGH₂), krčitveni dejavnik endotelijskega izvora (EDCF – Endothelium Derived Contracting Factor) in tromboksan A₂ (4, 7, 8).

Snovi izločene iz endotelija, ki omogočajo sprostitvev gladkih mišičnih celic so: NO (dušikov oksid, pred odkritjem poimenovan kot sprostitveni dejavnik endotelijskega izvora

oziroma EDRF - Endothelium Derived Relaxing Factor), PGI₂ (prostaciklin), PGE₂ (prostaglandin E₂), C-natriuretični peptid (vazodilatator, ki poveča koncentracijo cGMP), adrenomedulin (vazodilatator, ki poveča koncentracijo cAMP) in skupina neznanih snovi, ki jih označujemo s skupnim imenom hiperpolarizacijski dejavniki endotelijskega izvora (EDHFs – Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors) (4, 9, 10).

1.3.1 Dušikov oksid

NO nastaja v endotelijskih celicah s pomočjo konstitutivne NO sintaze (eNOS ali izoencim NOS-III) v reakciji med kisikom in *L*-argininom, ki je v endotelijskih celicah prisoten v visokih koncentracijah (4). Poznamo pa tudi inducibilno obliko NOS (iNOS ali izoencim NOS-II), ki je prisotna v endotelijskih celicah in gladkih mišičnih celicah. Njena ekspresija močno naraste v patoloških stanjih (11). Konstitutivni eNOS proizvaja manjše količine NO, medtem ko je aktivnost iNOS v patoloških stanjih približno tisočkrat večja (4).



Slika 3: Shematski prikaz vloge endotelija pri sprostitvi gladke mišične celice. Prikazane so poti sprostitve s sodelovanjem endotelijskih celic: izločanje NO, PGI₂, EDHF in presledkovni stiki, ki omogočajo širjenje hiperpolarizacije iz endotelijskih celic v gladke mišične celice. Sprostitev žile je posledica znižanja koncentracije Ca²⁺ v gladkih mišičnih celicah. Prirejeno po (5).

(AC – adenilatna ciklaza, ATP – adenzotriofosfat, cAMP – ciklični adenzotriofosfat, cGMP – ciklični gvanozinmonofosfat, COX – ciklooksigenaza, EDHF - hiperpolarizacijski dejavnik endotelijskega izvora, GC – gvanoilatna ciklaza, GTP- gvanozintrifosfat, NOS – NO sintaza, PGI₂ – prostaciklin, PKA – proteinska kinaza A, PKG – proteinska kinaza G)

1.3.2 Prostaglandini

Prostaglandina PGE_2 in PGI_2 sproščata gladko mišično celico preko aktivacije adenilatne ciklaze in posledičnim dvigom koncentracije cAMP. Povišan nivo cAMP aktivira PKA, ki zmanjša aktivnost MLCK. Predvidevajo, da povečan krvni pretok, ki v fizioloških razmerah poveča strižne sile na endotelij, sproži sintezo PGE_2 in PGI_2 (12, 13). Ne odstranitev endotelija niti inhibicija COX ne zavreta sprostitve gladkih mišičnih celic s PGE_2 ali PGI_2 . Sprostitev zavre le delna zamenjava Na^+ z Li^+ ali uporaba oubaina (zaviralec Na^+/K^+ ATPaze) (14). Gre torej za sprostitvev, ki ni odvisna od endotelija. V večini krvnih žil je vpliv PGE_2 in PGI_2 na od endotelija odvisno sprostitvev žile majhen (5).

1.3.3 Hiperpolarizacijski dejavniki endotelijskega izvora (EDHF)

EDHF predstavlja do sedaj še neidentificirano snov, ki povzroči hiperpolarizacijo gladkih mišičnih celic žile preko aktivacije K_{Ca} -kanalov ali napetostno odvisnih K^+ -kanalov, kar privede do sprostitve žile (15). EDHF ob dodatku vazodilatatornih snovi (npr. acetilholin, bradikinin) omogoča sprostitvev gladkih mišičnih celic tudi kadar sta encima NOS in COX popolnoma inhibirana. Možne razlage za od endotelija odvisno hiperpolarizacijo gladkih mišičnih celic so presledkovni stiki (omogočajo širjenje hiperpolarizacije iz endotelija na gladko mišično celico), epoksieikozatetranojske kisline (nastanejo iz arahidonske kisline pod vplivom encimskega sistema citokrom P450) in iz endotelija sproščeni kalijevi ioni, ki povzročijo hiperpolarizacijo gladke mišične celice preko kalijevih kanalov (16, 17).

Prispevek hiperpolarizacije k od endotelija odvisni relaksaciji je odvisen od velikosti arterije. Bolj je izražen v manjših žilah. V večjih arterijah tako NO kot EDHF povzročata sprostitvev žil, vendar prevladuje prispevek NO. Na podganji aorti je popolna inhibicija NOS preprečila sprostitvev žile z acetilholinom (18).

1.3.4 Endotelijska disfunkcija

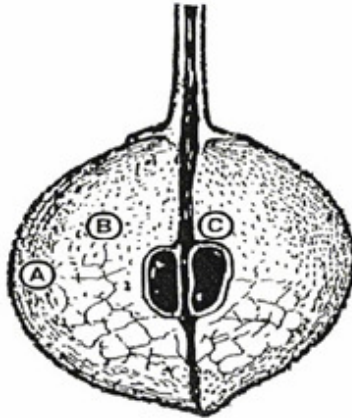
Endotelijske celice imajo aktivno vlogo pri uravnavanju tonusa žilne stene, pretoku krvi in funkciji trombocitov. Endotelijska disfunkcija predstavlja motnjo v delovanju endotelija, ki privede do porušenega ravnovesja med vazodilatacijskim in vazokonstriktornim delovanjem (19). Odkrivanje funkcijskih motenj v delovanju endotelija sodi med najzgodnejše zaznavne spremembe, ki jih je možno meriti (merjenje razširitve žile s pomočjo ultrazvočnega aparata ali določanje krvnih sestavin, ki kažejo na okvaro endotelija) in tako spremljati aterogenezo. Nesposobnost razširitve žile in povečanja pretoka v njej po fizioloških ali farmakoloških dražljajih je verjetno najzgodnejša motnja v delovanju endotelijskih celic (20). Pri določenih (pato)fizioloških stanjih, kot so ateroskleroza, kajenje, hipertenzija, sladkorna bolezen in hiperlipidemija se zmanjša izločanje NO ter poveča tvorba vazokonstriktornih snovi (21).

1.4 Sestava vina

Vino je pijača, ki jo pridobivamo s kontroliranim alkoholnim vrenjem iz grozdja plemenite vinske trte *Vitis vinifera*.

Na sestavo in kakovost vina poleg geografskega porekla, kraja in lege, vplivajo še sorta vina, vremenske in talne razmere ter predelava grozdja ali vinifikacija.

Grozdje sestavljajo jagode, v katerih je grozdno meso in sok, jagodne kožice, pečke, jagodni in grozdni pecelj. Od kemičnih sestavin grozdne jagode je za začetek trgatve in predelave v vino najpomembnejša količina sladkorjev (glukoze, fruktoze), organskih kislin, dušikovih spojin in aromatičnih snovi. Zorenje grozdja spoznamo po povečanju količine sladkorja in zmanjšanju količine kisline. Glede na čas dozorevanja so vinske sorte grozdja zgodnje, srednje in pozno zoreče.



Slika 4: Sestava grozdne jagode (22). A: epikarp (jagodna kožica); B: mezokarp (grozdni sok); C: endokarp (pečke)

Sestavlja ga več kot petsto komponent, vendar le nekatere presegajo koncentracijo > 100 mg/L: voda, etanol, glicerol, sladkorji in organske kisline. To so tudi najpomembnejše komponente, ki vplivajo na okus vina.

- **Voda**

V vinu je več kot 80 % vode. V njej so raztopljene organske in anorganske snovi. Med temi je največ ogljikovih hidratov, višjih alkoholov, dušikovih spojin, fenolnih snovi, vitamina C in vitaminov B kompleksa ter barvnih in aromatičnih snovi. Omenjene sestavine vplivajo na značilni vinski buke ali cvetico.

- **Alkoholi**

Od alkoholov prevladuje etanol. Njegova povprečna stopnja v vinu je od 7,5 % pri cvičku, do 14 % pri Cabernet sauvignonu. Strupeni metanol običajno nastane z alkoholnim vrenjem iz pektina. Višji alkoholi, kot so glicerol, propanol, butanol in različni poliol ali sladkorni alkoholi, nastanejo pri počasnem alkoholnem vrenju in vplivajo na prijeten poln okus vina.

- **Kisline**

Na prijeten okus vina vpliva razmerje med količino sladkorja in kislin. Povprečno je v vinu 4,5-9 g/L kislin. Prevladujejo nehlapne vinska, jabolčna, mlečna, jantarna in citronska kislina, manj zaželene pa so hlapne kisline, še posebej očetna kislina, ki je lahko tudi znak kvarjenja vina (očetni cik). Po pravilniku o kakovosti vin je dopustna količina hlapnih kislin od 1,05 do 1,2 g/L.

- **Aromatične - buketne snovi**

Aromatične snovi so snovi, ki vplivajo na značilen vonj in okus vina in jih opišemo kot cvetico ali buket vina. Po svojem izvoru so primarne in pridejo v vino s predelavo posamezne vinske sorte grozdja, sekundarne (aromatični estri, nastali z reakcijo med kislinami in alkoholi), ki nastanejo med alkoholnim vrenjem in terciarne buketne snovi, ki se oblikujejo med zorenjem vina v steklenici.

- **Polifenoli**

Njihova povprečna količina je v belih vinih od 40 do 400 mg/L in od 300 do 4000 mg/L v rdečih vinih.

- **Vitamini**

Prevladujejo vitamini B-kompleksa in askorbinska kislina (vitamin C).

- **Mineralne snovi**

Ca, Mg, K, Na, Fe, Cu ... Njihova količina je odvisna od vrste vina.

- **Dušikove spojine**

Beljakovine, aminokisliline, amidi in amini.

- **Ogljikovi hidrati**

Prevladuje sladkor, ki v vinu ni do konca alkoholno prevrel. Na podlagi količine neprevretega sladkorja vina označujemo kot suha, polsuha, polsladka in sladka (22).

1.5 Polifenoli

Grozdje vsebuje veliko različnih polifenolnih snovi, ki se nahajajo predvsem v trdih delih grozdne jagode, večinoma v kožici in pečkih. V vinu lahko obstajajo v prosti monomerni obliki ali pa so polimerizirani. Zelo pogosta je oblika, pri kateri je ena ali več karboksilnih skupin zaestrenih s sladkorjem, neredko pa se pojavijo tudi v obliki estrov organskih kislin, še posebej očetne, kumarne in vinske kisline (23).

Tabela 1: Razporeditev polifenolov v grozdni jagodi. Polifenoli: mg/kg grozdja. Povzeto po Waterhouse (25)

Deli grozdja	% mase	Rdeče grozdje	Belo grozdje
Kožica	15	1800	900
Pulpa	1	40	35
Sok	78	210	175
Pečke	6	3500	2800
Skupaj		5600	3900

Ker rdeče vino pridobivamo s fermentacijo grozdnega soka in grozdnih jagod, belo vino pa samo s fermentacijo soka, ima rdeče vino veliko večjo vsebnost polifenolov kot belo vino. Tudi fermentacijski proces je pri rdečem vinu daljši, kar močno vpliva na količino polifenolov v vinu. Potrebno pa je upoštevati tudi količino alkohola, kajti etanol je ugodno topilo za ekstrakcijo teh spojin (24).

Znano je, da so polifenolne snovi pomembne za vrsto senzoričnih lastnosti vina: barvo, trpkost in grenkobo, zato so količine teh snovi kontrolirane s strani vinogradnikov.

Polifenolne spojine delimo na flavonoide (flavonoli, flavanoli oz. flavan-3-oli in antociani) in ne-flavonoide (derivati hidroksicimetne kisline, hidroksibenzojske kisline in stilbeni) (25).

Tabela 2: Tipične količine polifenolov v vinu (mg/L). Mlado vino je staro 6 mesecev, staro vino je staro približno 2 leti. Povzeto po Waterhouse (25).

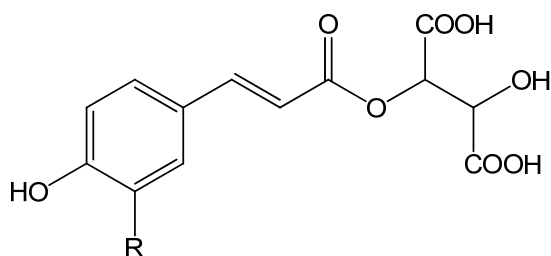
	Mlado vino	Staro vino
<u>Ne-flavonoidi</u>		
Hidroksicinamati	165	60
Benzojske kisline	60	60
Hidrolizirajoči tanini	0	250
Stilbeni	7	7
Skupaj	232	377
<u>Flavonoidi</u>		
Flavanolni monomeri	200	100
Proantocianidini in kondenzirani tanini	750	1000
Flavonoli	100	100
Antociani	400	90
Drugi	50	75
Skupaj	1500	1365
Skupni fenoli	1732	1742

NE-FLAVONOIDI

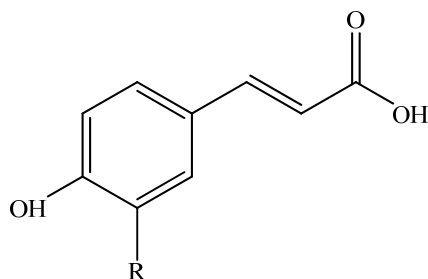
- **Hidroksicimetne kisline**

Hidroksicimetne kisline so najpomembnejša skupina ne flavonoidov tako v rdečih kot tudi v belih vinih. Te kisline so v grozdju glavni fenoli grozdnega soka in zaradi tega glavni fenoli belega vina, pridelanega brez maceracije. Najpogostejše kisline so kutarna, kaftarna in fertarna kislina. Te kisline se v grozdju večinoma nahajajo v obliki estrov z vinsko kislino, v vinu pa lahko pride do hidrolize in zato najdemo tudi proste oblike teh kislin (kavna, *p*-kumarna in ferulna kislina), vendar v manjšem deležu (25).

V belem vinu so prisotne v koncentracijah 10 do 20 mg/L, v rdečih pa 100-200 mg /L (26).



Ime estrov hidroksic. k.	R
kaftarna kislina	OH
kutarna kislina	H
fertarna kislina	OCH ₃

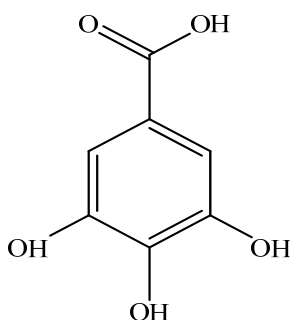


Ime hidroksicimetne k.	R
kavna kislina	OH
<i>p</i> -kumarna kislina	H
ferulna kislina	OCH ₃

Slika 5: Strukturne formule hidroksicimetnih kislin v obliki estrov (zgoraj) in v prosti obliki (spodaj) v vinu (25)

- **Hidroksibenzojske kisline**

Galna kislina, ki je najpomembnejša hidroksibenzojska kislina v vinu, ima zaradi treh hidroksilnih skupin dobre antioksidativne lastnosti. Ekstrahira se iz grozdnih pečk. Večje vrednosti galne kisline lahko dosežemo z daljšo maceracijo, saj je ekstrakcija iz grozdja razmeroma počasna. Koncentracija v rdečih vinih je okoli 70 mg/L, v belih pa okoli 10 mg/L (25).

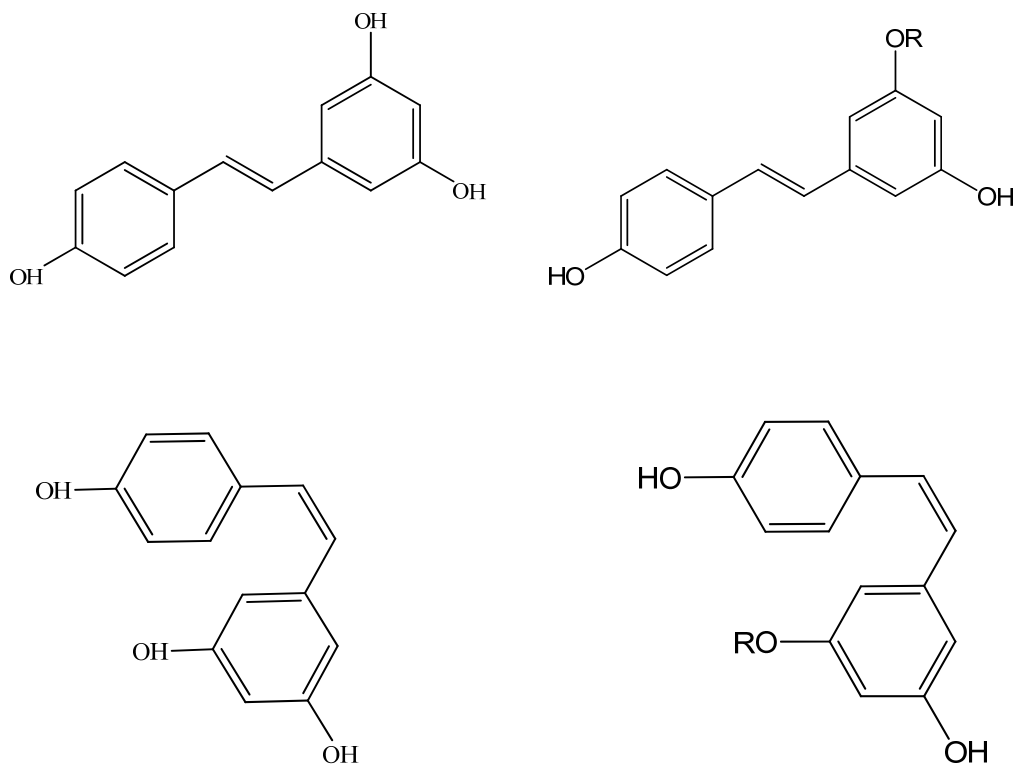


Slika 6: Galna kislina (25)

- **Stilbeni**

Glavni predstavnik te skupine je resveratrol. To je 3,5,4-trihidroksistilben, ki se v vinu nahaja v štirih različnih oblikah: *cis*- in *trans*- resveratrol ter *cis*- in *trans*- glukozeid resveratrola. V grozdju se nahaja predvsem v jagodni kožici, zato se njegova koncentracija med maceracijo povečuje. Prav zaradi tega je v rdečih vinih bistveno več resveratrola kot v belih vinih (25).

Resveratrol nastane kot stresni metabolit na vinski trti med napadom plesni, poškodbami in med ultravijoličnim žarčenjem (26). Znano je, da ima močno antioksidacijsko aktivnost (27). Koncentracija v rdečih vinih je okoli 7 mg/L, v belih pa le okoli 1 mg/L (23).



Slika 7: Strukturne formule izomerov (*trans*, *cis*) resveratrola (levo) in izomerov (*trans*, *cis*) glukozidov resveratrola (desno) (25)

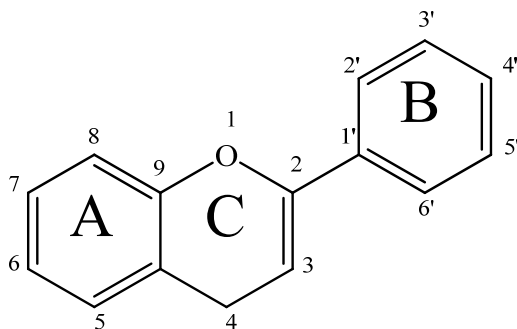
- **Tanini**

Razlikujemo hidrolizirajoče in kondenzirane tanine. Hidrolizirajoči tanini so estri *D*-glukoze, oziroma drugih ogljikovih hidratov, z galno kislino (galotanini) ali elagno kislino (elagitanini) (25). Njihov izvor je lesena posoda, v kateri zori vino, ali pa jih v vino dodamo z enološkimi sredstvi (28). Kondenzacijski tanini pa so polimeri flavonoidov, ki so v jagodni kožici, pečkih in pecljevini (26).

Od kemijskih lastnosti taninov je v ospredju njihova reaktivnost s kisikom, kar omogoča zaščito vina pred oksidacijo (23). V belih vinih so prisotni v koncentracijah med 250 in 310 mg/L, v rdečih vinih pa med 390 in 1660 mg/L (26).

FLAVONOIDI

Flavonoidi so fenolne spojine zgrajene iz 15 C-atomov z osnovno strukturno formulo $C_6C_3C_6$, ki ga imenujemo 2-fenilbenzopiran oz. flavan. (Slika 8)



Slika 8: Osnovna strukturna formula flavonoidov (25)

Različni flavonoidi se med seboj razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega obroča in po različnih substituentih na obročih (25).

V grozdju so flavonoidi večinoma glikolizirani. Največkrat je sladkor (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza) vezan na C_3 , lahko pa tudi na C_5 ali C_7 .

Flavonoidi predstavljajo v rdečih vinih več kot 85% vseh fenolnih spojin, v belih pa le približno 20% (29).

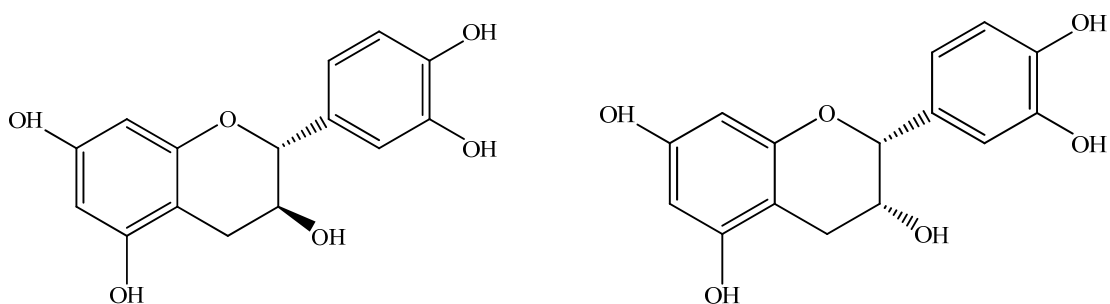
Najpogostejši flavonoidi v vinu so flavan-3-oli, flavonoli, proantocianidini in antociani (23).

- **Flavan-3-oli**

Monomerni, oligomerni (proantocianidini) in polimerni (kondenzirani tanini) flavan-3-oli so najpomembnejši fenoli v rdečih vinih. Najdemo jih predvsem v trdih delih grozdne jagode, medtem ko so njihove koncentracije v grozdnem soku zelo majhne. Zaradi tega je njihova količina vedno veliko večja v rdečih vinih kot v belih. Z podaljševanjem časa maceracije se njihova količina povečuje.

V skupino flavan-3-olov prištevamo katehin (*trans* oblika) in epikatehin (*cis* oblika). Vrednosti monomernih flavan-3-olov se v rdečih vinih gibljejo okoli 40-120 mg/L, večinoma gre za katehin, v belih vinih pa je katehina okoli 20-50 mg/L.

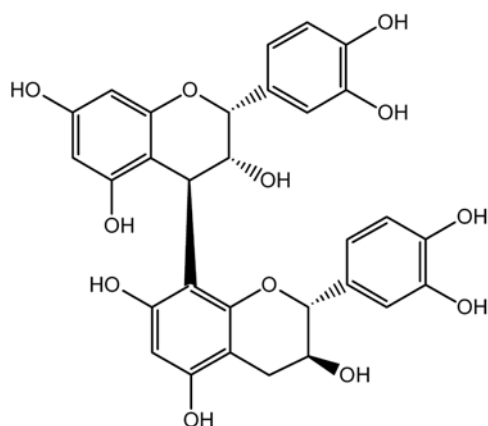
Poleg teh dveh pa v vinu najdemo še dva flavan-3-ola, vendar v nizkih koncentracijah. Galokatehin ima na B obroču osnovne strukture 3',4',5'- trihidroksi skupino, epikatehin galat pa je ester epikatehina in galne kisline na 3-OH skupini (25).



Slika 9: Strukturna formula katehina (levo) in epikatehina (desno) (25)

- **Proantocianidini**

Proantocianidini nastajajo s polimerizacijo flavan-3-olov, in sicer so njihovi di-, tri- in tetrameri. Dimeri flavan-3-olov so znani kot proantocianidini skupine A in B, trimeri pa kot proantocianidini skupine C. Najpogosteje so povezani s C₄-C₈ vezjo in C₄-C₆ vezjo. (30) Proantocianidinski dimeri B₁-B₄, ki so povezani s C₄-C₈ vezjo, so najpogosteje prisotni v grozdju. Občasno se pojavljajo tudi izomeri B₅-B₈, povezani s C₄-C₆ vezjo.



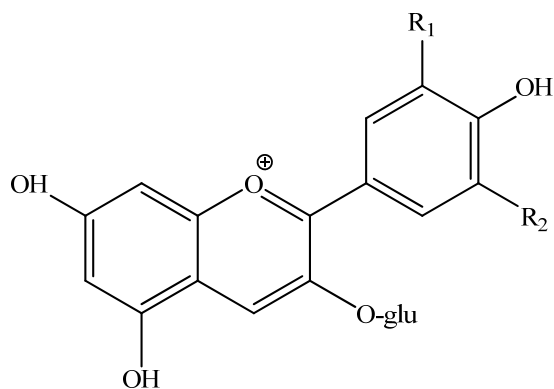
Slika 10: B- tip dimera (B_1) (25)

S dolgotrajnim staranjem vina (več let) se vsebnost polifenolov zmanjšuje, ker se proantocianidini in kondenzirani tanini začnejo obarjati. Vzrok je v tem, da se njihova velikost poveča, verjetno zaradi disproporcionacijskih reakcij, in zato postanejo netopni v vinu (25).

Vsebnost flavan-3-olov in proantocianidinov je močno sortno pogojena. V rdečih vinih se gibljejo koncentracije od 120 do 3500 mg/L. Sorte si sledijo ponavadi v tem vrstnem redu: cabernet sauvignon > modri pinot > merlot (23).

- **Antociani**

Antociani so druga najpomembnejša skupina v rdečih vinih. So barvila, ki se v grozdju nahajajo predvsem v jagodni kožici in so odgovorni za rdečo barvo vin. Osnova njihove kemijske zgradbe je 3,5,7-trihidroksibenzopiran z različnim številom hidroksilnih in metoksi skupin na 2-fenilnem obroču. Modri odtenek narašča s številom hidroksi skupin, rdeči pa s številom metoksi skupin. V vinu najdemo le 3-monoglikozide.



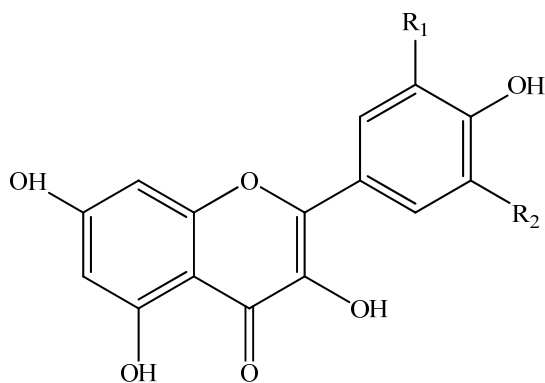
Slika 11: Strukturna formula antocianov (25)

Ime antociana	R ₁	R ₂
cianidin	H	OH
peonidin	H	OCH ₃
delfinidin	OH	OH
petunidin	OH	OCH ₃
malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Koncentracija antocianov je v veliki meri sortno pogojena in se giblje med 40 in 1300 mg/L. V cabernet sauvignonu je značilno, da so vrednosti skupnih antocianov podobne vrednostim flavan-3-olov in proantocianidinov (23).

- **Flavonoli**

Flavonoli se v grozdju nahajajo v jagodni kožici kot 3-glukozidi ali 3-glukuronidi. Posamezne spojine se ločijo med seboj glede na substituentne, ki so vezane na benzenov obroč na mestih 3 in 5. V vinu najdemo aglikone kvercetin, miricetin in kamferol. Najpogostejša sta kvercetin-3- glukozid in kvercetin-3-glukuronid. Koncentracija flavonolov je približno 50 mg/L (25).



Slika 12: Strukturna formula flavonolov (25)

Ime flavonola	R ₁	R ₂
kamferol	H	H
kvercetin	OH	H
miricetin	OH	OH

1.6 Učinki snovi iz vina na kardiovaskularni sistem

Zmerno uživanje vina, predvsem rdečega, je povezano z zmanjšanim tveganjem za razvoj kardiovaskularnih bolezni (koronarna arterijska bolezen, ateroskleroza...). Predvsem je to posledica različnih polifenolnih spojin, ki so prisotne v rdečem vinu, izključen pa ni niti vpliv etanola (31). Veliko študij je izvedenih tudi z belim vinom, vendar so rezultati slabši.

- Sproščanje žil

Rdeče vino povzroča od endotelija odvisno sproščanje preko povečane tvorbe in/ali povečane biološke aktivnosti NO, ki vodi do zvišanja vrednosti cGMP. Dokazano je, da rdeče vino vpliva tudi na druge prenašalce, ki uravnavajo žilni tonus. Znižuje sintezo ET-1, in povečuje sintezo EDHF in prostaciklina (PGI₂). Vazorelaksacijski učinek je odvisen od vsebnosti in vrste polifenolov, prisotnih v vinu. K temu učinku največ prispevajo antociani in proantocianidini (32).

- Modulacija genske ekspresije

Dokazano je, da rdeče vino inducira e-NOS transkripcijo. Tako je povečano izločanje NO iz endotelijskih celic. V primerjavi s povečano $[Ca^{2+}]_i$ je to dolgotrajnejši učinek, ki govori v prid kardioprotektivni vlogi rdečega vina. Resveratrol vpliva na e-NOS promotorsko regijo, nima pa vpliva na e-NOS-L-citrulin produkcijo (24). Tudi proantocianidini in antociani lahko vplivajo na modulacijo genske ekspresije (32).

- Agregacija trombocitov

Pomemben korak pri razvoju ateroskleroze in koronarne srčne bolezni je agregacija trombocitov. Polifenoli inhibirajo metabolizem arahidonske kisline in posledično inhibirajo agregacijo trombocitov in zmanjšajo sintezo protrombotičnih in provnetnih mediatorjev. Kvercetin, katehin in resveratrol inhibirajo sintezo tromboksana v trombocitih in levkotriena v nevtrofilcih (33).

- Inhibicija oksidacije LDL

V različnih študijah so dokazali, da rdeče vino deluje antioksidativno, predvsem na račun prisotnih polifenolov. Oksidacija LDL-a je ključni korak pri razvoju ateroskleroze. Obstaja več možnih mehanizmov o tem, kako polifenoli varujejo LDL pred oksidacijo. Prvi mehanizem je lovljenje radikalov oziroma polifenoli delujejo kot reducenti, drugi je keliranje kovinskih ionov in zadnji možni mehanizem je varčevanje z vitaminom E in karotenoidi v LDL-u. S tem je povečana antioksidativnost. Rdeče vino tudi zvišuje HDL (24).

2. NAMEN DELA

Rdeče vino je že dolgo znano kot pijača, ki pri zmernem uživanju lahko pozitivno vpliva na naše zdravje. Prav tako je znano, da zmerno pitje rdečega vina znižuje tveganje za razvoj koronarne srčne bolezni.

Namen naše raziskave je pridobiti čisti izvleček z visoko aktivnostjo na žilah, ga kemijsko identificirati in ovrednotiti vpliv tega izvlečka na odzivnost žilnih obročkov izolirane podganje torakalne aorte.

Naše delovne hipoteze so:

1. v frakcijah vina so poleg antocianov in proantocianidinov prisotne tudi druge vazoaktivne spojine;
2. frakcije vina povzročijo sprostitvev predhodno skrčenih izoliranih žil z ohranjenim endotelijem;
3. frakcije vina povzročijo sprostitvev predhodno skrčenih izoliranih žil preko vpliva na aktivnost encima NOS.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Uporabljeni reagenti in raztopine

3.1.1 Reagenti uporabljeni pri pripravi frakcij vina

Aceton (min. 99,5 %, 32211, Fluka, Buchs, Švica)

Argon (Messer, Ruše, Slovenija)

1-Butanol (min. 99,5 %, 33065, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija)

Dietileter (min. 99,5 %, 32211, Fluka, Buchs, Švica)

Dušik (Messer, Ruše, Slovenija)

Etilacetat (min. 99,5 %, 45760, Fluka, Buchs, Švica)

Folin-Ciocalteujev reagent (47641, Fluka, Buchs, Švica)

Galna kislina (min. 98,0 %, 48630, Fluka, Buchs, Švica)

n-Heptan (min 99 %, Kemika, Zagreb, Hrvaška)

Kloroform (99,0-99,4 %, 32211, 33065, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija)

Metanol (min. 99,8 %, 65543, Fluka, Büchi, Švica)

Mravljična kislina (min. 98 %, 06440, Fluka, Buchs, Švica)

Natrijev karbonat/brezvodni (min. 99,0 %, 71351, Fluka, Buchs, Švica)

Ocetna kislina/brezvodna (min. 99,8 %, 100063, Merck, Darmstadt, Nemčija)

Petroleter (40-60°C, 32299, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija)

Pirogalol (min. 99 %, M=126,11, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Toluen (min. 99,7 %, 32249, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija)

Aparature, pribor in oprema

Shranjevanje vzorcev:

- Hladilnik, +4°C Gorenje (Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik, -20°C Gorenje (Velenje, Slovenija)

Tehtanje:

- Analizna tehtnica KERN ALS 120-4, Kern & Sohn GmbH (Balingen, Nemčija)

Ekstrakcija:

- Čaše 100 mL
- Merilni valji 100 mL
- Stojalo
- Prižemki
- Lij ločnik

Rotavapiranje:

- Bučke 50 mL, 100 mL
- Buchi Rotavapor R-200, Büchi (Flavil, Švica)

Raztapljanje:

- Avtomatske pipete, Biohit (Helsinki, Finska)
- Bučka 5mL, 10 mL, 25mL, 50 mL, 100 mL
- Epruvete za centrifugiranje, 50 mL, TPP (Trasadingen, Švica)
- Ultrazvočna kadička SONIS 2 GT, Iskra PIO, d.o.o. (Šentjernej, Slovenija)

Centrifugiranje:

- Centrifuga, Centrifuge 5804 R, Eppendorf (Hamburg, Nemčija)

TLC:

- Polnilne pipete: 1 mL, 4 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL
- Dvoprekatne kadičke – Twin Trough Chamber, 20 x 10 cm, Camag (Muttentz, Švica)
- Kadičke, 20 x 20 cm, Camag (Muttentz, Švica)
- Grelna plošča – Camag TLC Plate Heater III, Camag (Muttentz, Švica)
- Avtomatski nanašalnik – Camag LINOMAT IV, Camag (Muttentz, Švica)
- Brizga – Camag LINOMAT, koda 695.0014, Camag (Muttentz, Švica)
- Digestorij Variolab Mobilien W90 Waldner (Wangen, Nemčija)
- TLC Silica gel 60 plošče 20 x 20 cm, Merck (Darmstadt, Nemčija)
- HPTLC Kieselgel 60 plošče 10 x 20 cm, Merck (Darmstadt, Nemčija)

Spektrometrija:

- Spektrofotometer Safire 2, Tecan (Männedorf, Švica)

3.1.2 Reagenti uporabljeni pri poskusih na izolirani podganji aorti

Acetilholin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 10 mmol/L.

Heparin (Heparin[®], Krka, Novo mesto, Slovenija) aktivira antitrombin III preko vezave nanj. Uporablja se kot antikoagulant. V viali je 5 mL raztopine za injiciranje, ki vsebuje 25000 i.e. heparina v obliki natrijeve soli. Pred izolacijo aort smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin v odmerku 0,3 mL / žival (približno 1000 i.e / 100 g telesne mase živali).

Karbogen (plinska mešanica 95% O₂ in 5% CO₂); (jeklenke polni Messer, Slovenija): plinsko mešanico smo uporabili za prepihanje raztopine K-H v kivetah

KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 3 mol/L.

K-H raztopina (»modificirana« raztopina po Krebs-Henseleitu): 118 mmol/L NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija); 4,7 mmol/L KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija); 1,2 mmol/L KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvaška); 1,2 mmol/L MgSO_4 (Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija); 25 mmol/L NaHCO_3 (Merck, Darmstadt, Nemčija); 2,5 mmol/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Nemčija); 11 mmol/L glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška). Za vsako serijo poskusov smo pripravili 10 litrov K-H raztopine.

Noradrenalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) smo pripravili v matični raztopini koncentracije 1 mmol/L.

Nw-nitro-L-arginin (L-NNA) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija): zavira NOS in tako prepreči nastajanje NO. Koncentracija L-NNA v matični raztopini je bila 36 mmol/L.

Uretan (etilkarbamat) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija): je anestetik, ki se uporablja v veterini. Pripravili smo matično raztopino koncentracije 2,24 mol/L (20 g uretana/100 mL). Za anestezijo smo uporabili 0,7 mL raztopine na 100 g telesne mase živali.

Vse matične raztopine smo pripravili v bidestilirani vodi ter jih redčili do končnih koncentracij, ki so navedene pri posameznem reagentu.

3.2 Priprava frakcij vina Cabernet sauvignon (Goriška Brda, letnik 2004)

Najprej smo 100 mL vina odparili pri znižanem tlaku ($T=45^\circ\text{C}$) do 60 mL. Nato smo izvajali zaporedno ekstrakcijo v lij ločniku s 50 mL izbranega topila (petroleter, eter, etilacetat, 1-butanol), in sicer dvakrat z vsakim topilom. Tako smo dobili pet frakcij (petroletrna, etrna, etilacetatna, butanolna) in vodni preostanek- vodna frakcija. Vse smo do suhega uparili. Iz razlike v masi med prazno in polno bučko smo dobili maso suhe frakcije. Preden smo osušene frakcije shranili, smo jih vedno prepihali z argonom.

Pred meritvami na žilah smo posamezno frakcijo raztopili v 30 mL vode.

3. 3 Tankoplastna kromatografija-TLC

Tri frakcije (petroletrna, butanolna in vodna), ki so po prvem sklopu poskusov na žilah kazale največjo aktivnost, smo analizirali s TLC.

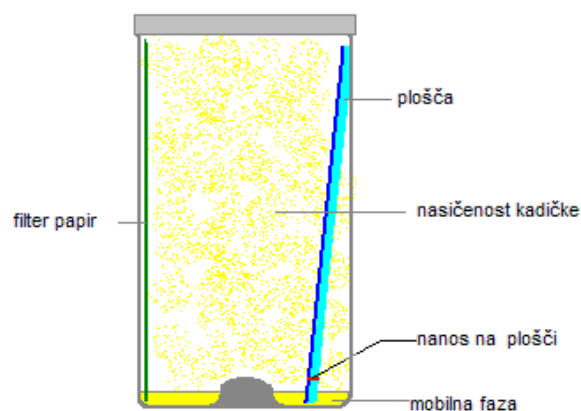
Pri našem delu smo uporabili več različnih mobilnih faz, in sicer v volumskem razmerju:

1. Toluen/aceton/mravljična kislina (3/3/1)
2. Etilacetat/ocetna kislina/mravljična kislina/voda (100/11/11/26)
3. Kloroform/ metanol (9/1) in (95/5)
4. Etilacetat/ metanol (9/1)

Mobilne faze smo izbrali na podlagi člankov in literature (24). Prvi dve mobilni fazi smo uporabili pri vodni in butanolni frakciji, drugi dve pa pri petroletrni frakciji. Vsak dan pred analizo smo pripravili svežo mobilno fazo.

Vzorci smo na plošče nanašali v črto s pomočjo igle in polavtomatskega nanašalnika Camag LINOMAT IV. Nanašati smo začeli 35 mm od levega roba in 15 mm od spodnjega roba. Nanosi so bili široki 10 mm, med njimi pa je bilo 10 mm prostora. Hitrost nanosa je bila 5 s/ μ L. Vzorce smo nanašali v toku inertnega plina dušika.

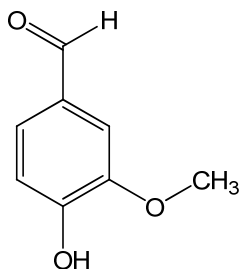
Za razvitje plošč smo uporabili dvoprekatno kadičko Camag. V kadičko smo nalili približno 50 mL mobilne faze in na eno stran kadičke vstavili filter papir. Tako pripravljeno kadičko smo pustili približno 30 minut, da se je nasitila s parami mobilne faze. Ploščo z nanešenimi vzorci smo nato previdno položili v kadičko tako, da je bila plast s silikagelom obrnjena proti notranjosti (Slika 13).



Slika 13: Razvijanje TLC plošče v nasičeni dvoprekatni kadički (24).

Ploščo smo pustili v kadički toliko časa, da je prišla fronta mobilne faze do 80-90% višine plošče. Nato smo ploščo vzeli iz kadičke in jo osušili s sušilnikom.

Za orositveni reagent smo uporabili vanilin (1%, etanol) in žveplovo(VI) kislino (5 %, etanol). Ta orositveni reagent uporabljamo za detekcijo fenolov. V digestoriju smo TLC ploščico orosili z obema reagentoma, nato pa smo jo na grelni plošči posušili pri 110°C. Lise s polifenoli so se obarvale modro vijolično.



Slika 14: Vanilin

Ker smo analizirane frakcije hoteli razdeliti na več podfrakcij, smo naredili tudi preparativno TLC. Vzorce smo pripravili tako, da smo

- 100 mg vodne frakcije (suhe mase) raztopili v 0,5 mL vode,
- 56,5 mg butanolne frakcije (suhe mase) raztopili v 250 μ L heptana,
- 12,2 mg petroletrne frakcije (suhe mase) raztopili v 100 μ L heptana.

Pri preparativni TLC smo vzorce nanašali s kapalko. Drugače pa je postopek isti kot je opisano zgoraj, le da nismo uporabili orositvenega reagenta.

Razvite ploščice smo si ogledali pod različnimi valovnimi dolžinami (254 nm in 366nm) in jih glede na videno razdelili in s svinčnikom označili na več frakcij. Nato smo označene frakcije skupaj s silikagelom spraskali s ploščice. Na ta način smo dobili štiri vodne, tri butanolne in štiri petroletrne podfrakcije. Posamezno maso smo v terilnici zdrobili, napolnili v 50 mL epruvete in dopolnili do oznake z:

- metanolom pri vodni in butanolni podfrakciji in
- 10% metanolom v kloroformu pri petroletrni podfrakciji.

Podfrakcije smo pustili čez noč macerirati, naslednji dan pa smo jih centrifugirali in bистre raztopine uparili do suhega. Ponovno smo prepihovali z argonom in podfrakcije shranili pri -20°C do poskusa na žilah.

Pred testiranjem na žilah smo jih raztopili v vodi (vse vodne podfrakcije v 1,5 mL vode, vse butanolne podfrakcije v 6 mL vode in vse petroletrne podfrakcije v 15 mL vode). Volumni so izračunani iz koncentracij prvotnih frakcij v 30 mL (koncentracija vodne frakcije je 0,066 g/mL, koncentracija butanolne frakcije 0,093 g/mL in koncentracija petroletrne frakcije 0,081 mg/ml).

3.4 Določanje vsebnosti polifenolov s Folin-Ciocalteujevo metodo

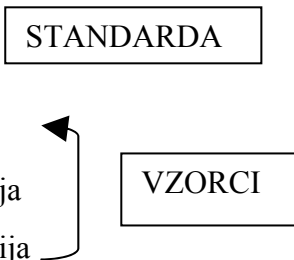
Folin-Ciocalteujev reagent je raztopina polimernega ionskega kompleksa iz fosfomolibdenskih in fosfovolframovih kislin. Reagira s fenolnimi spojinami in nefenolnimi reducenti, s katerimi tvori kromogene, ki jih detektiramo spektrofotometrično. Pri reakciji med fenolnimi spojinami in FC reagentom pride do oksidacije fenolatov, pri čemer zaradi redukcije fosfomolibdenskih in fosfovolframovih kislin nastane moder kompleks.

Ker so fenolati prisotni le v alkalnem mediju, v katerem pa so tako reagent kot nastali produkti nestabilni, izvajamo reakcijo v šibko alkalnem mediju ob visoki koncentraciji reagenta. Zato raztopini vzorca, ki vsebuje polifenolne spojine dodamo FC reagent, čez nekaj minut pa še raztopino natrijevega karbonata. Po določenem času, ko reakcija poteče, izmerimo absorbanco raztopine pri 765 nm.

Priprava 20% raztopine natrijevega karbonata

V čaši smo 20 g brezvodnega natrijevega karbonata raztopili v 80 mL vode. Raztapljali smo ga s pomočjo ultrazvočne kadičke.

Priprava standardov in vzorcev (koncentracija 0,1 mg/ml)

- Pirogalol
 - Galna kislina
 - Vodna frakcija
 - Butanolna frakcija
 - Petroletna frakcija
- 
- STANDARDA
- VZORCI

Vzorce in standarde smo nanegli na mikrotitrsko ploščico. V prvo vdolbinico smo nanegli 170 μL pirogalola, v drugo 170 μL galne kisline, v tretjo 170 μL vodne frakcije, v četrto 170 μL butanolne frakcije in v peto vdolbinico 170 μL petroletrne frakcije. V vseh pet vdolbinic smo nato dodali 10 μL Folin-Ciocalteujevega reagenta in po treh minutah še 20 μL raztopine natrijevega karbonata.

Absorbance raztopin smo izmerili 60 min po dodatku obeh reagentov pri valovni dolžini 765 nm. Rezultate vsebnosti fenolov podajamo kot ekvivalente pirogalola oz. galne kisline v mg/g.

3.5 Poskusne živali

Za poskuse na živalih smo pridobili dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije št. 323-02-234/2005/2 z dne 18.05.2005. Pri izvedbi poskusov smo uporabili samce podgan seva Wistar domače reje (Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani), ki so tehtali od 260 do 320 g. Uporabili smo od 11 do 20 tednov stare živali. Živali so bile hranjene s standardno prehrano za podgane v obliki pelet (Krka, Novo mesto, Slovenija), ves čas so imele na razpolago vodo. Vzgojene so bile v konstantnih klimatskih razmerah (temperatura okolja $24 \pm 1^\circ\text{C}$) z menjavo dnevno-nočne osvetlitve na 12 ur. Poskuse smo opravili med 8. in 18. uro v obdobju od oktobra do januarja 2009.

3.6 Izolirana podganja aorta

Anestezijo smo izvedli z intraperitonealno injekcijo uretana v odmerku 0,7 mL matične raztopine (0,14 g uretana)/100 g telesne mase živali. Za preprečitev strjevanja krvi smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin v odmerku 1000 i.e./100 g telesne mase živali. Ko so bile živali v primerno globoki anesteziji, smo pričeli s preparacijo.

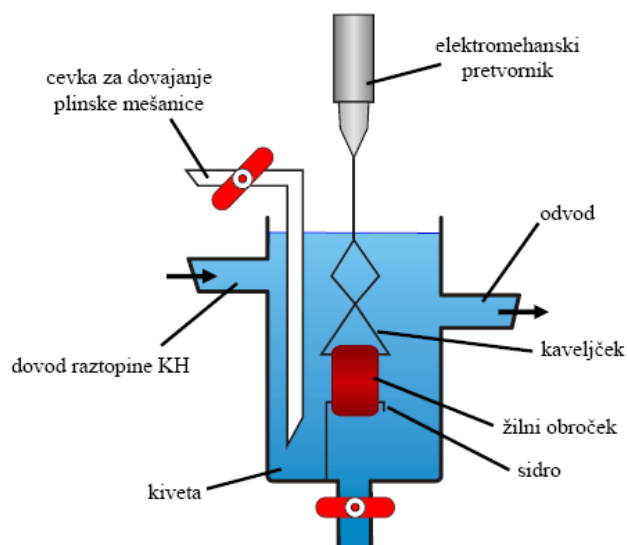
Trebušno steno smo odprli v višini 2 cm pod ksifoidnim izrastkom spodnjega dela prsnice. Z odstranitvijo trebušne prepone smo si prikazali srce in velike žile v mediastinumu. Žival smo izkrvaveli s prečno prekinitvijo spodnje vene kave. Po odprtju prsnega koša smo od descendentne torakalne aorte odstranili sosednje vezivo in maščevje. S pripravo žilnih obročkov smo pričeli v višini 5 mm pod izhodiščem leve arterije subklavije in pripravili 8 žilnih obročkov dolžine 3-4 mm.

Žilne obročke smo namestili v kivete naprave za poskuse na izoliranih žilah, ki so bile napolnjene z K-H raztopino. Čas, ki je potekel od izkrvavitve živali do namestitve žilnih obročkov, je bil v povprečju 5-10 minut.

3.7 Naprava za poskuse na izoliranih žilah

Naprava za poskuse na izoliranih žilah je bila izdelana v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Sestavljena je iz vodne kopeli v katero je potopljenih pet kivet prostornine 10 mL. Kivete imajo ločen dovodni in odvodni sistem za izmenjavo hranilne K-H raztopine (Slika 15). V vsako kiveto je nameščena cev za dovajanje plinske zmesi za oksigenacijo raztopine. Raztopino smo prepihovali s 95% O₂ in 5% CO₂. Termostatsko nadzorovana vodna črpalka je vzdrževala konstantno temperaturo vodne kopeli pri 37,0 °C ± 0,5 °C. Ostale reagente smo v kivete dodajali skozi zgornjo odprtino z avtomatskimi pipetami.

Skozi lumen žilnih obročkov smo vstavili dve vzporedni nerjaveči kovinski žici. Spodnja žica (sidro) je bila nepremično vpeta v kiveto, zgornja žica (kaveljček) pa je bila povezana z elektromehanskim pretvornikom (ITIS, Ljubljana, Slovenija). Elektromehanski pretvornik je spremembo sile izometričnega krčenja žilnih obročkov pretvarjal v spremembo električne napetosti. Električno napetost smo preko ojačevalca in A/D pretvornika (National Instruments, NI PCI-6013, ZDA) zapisovali na trdi disk osebnega računalnika. Tako dobljene podatke smo obdelovali s programsko opremo DEWESoft 6.5 (DEWESoft d.o.o., Trbovlje, Slovenija).

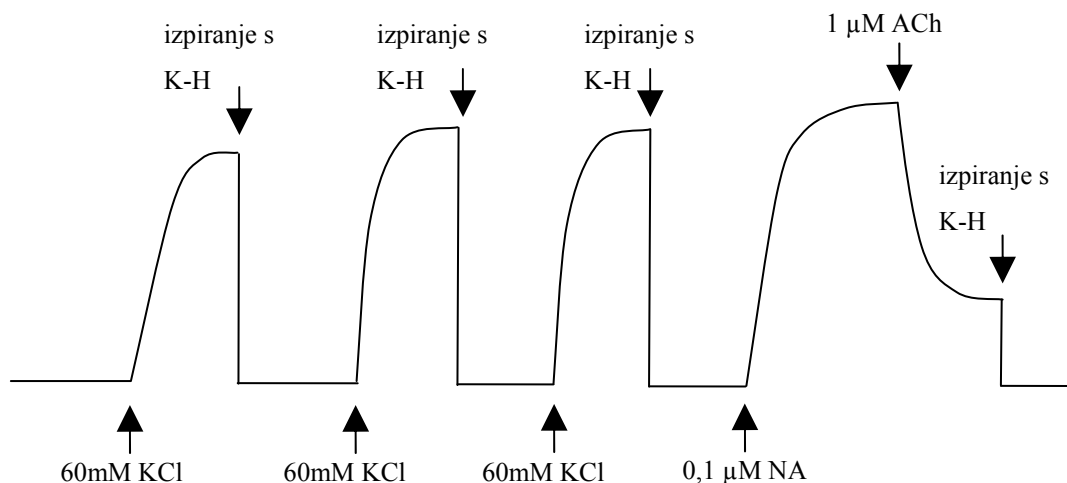


Slika 15: Shematski prikaz naprave za poskuse na izoliranih žilah

3.8 Protokol poskusov

Pred izvajanjem poskusov na žilnih obročkih moramo le-te stabilizirati. Žilne obročke smo v 90 minutah uravnotežili s konstantno silo 20 mN. Med tem časom smo raztopino K-H menjali vsakih 5-15 minut, da smo izprali ostanke krvi. Ko so se žilni obročki stabilizirali pri 20 mN, smo njihovo odzivnost preizkusili z raztopino kalijevega klorida (KCl), katere končna koncentracija v kiveti je znašala 60 mmol/L. Ko je skrčitev dosegla stabilni plato, smo žilne obročke izprali in postopek ponavljali z enako koncentracijo KCl kot prej, dokler nismo dosegli enakomernosti odziva (Slika 15).

Po izpiranju in stabilizaciji v raztopini K-H smo vsak žilni obroček skrčili z NA, v končni koncentraciji 0,1 $\mu\text{mol/L}$. Ko je skrčitev dosegla stabilen plato, smo z acetilholinom (ACh), v končni koncentraciji 1 $\mu\text{mol/L}$, dosegli delno sprostitvev, katere velikost je bila odvisna od endotelija. (Slika 16) Sprostitev žilnega obročka za več kot 50% je pomenila, da je endotelij ohranjen. Po kontrolnih odzivih smo žilne obročke sprali z raztopino K-H in tako povzročili, da se je napetost vrnila na mirovno vrednost.



Slika 16: Shematski prikaz uravnoteženja žilnih obročkov (doseganje enakomernosti odziva) in določanje prisotnosti funkcionalnega endotelija v žilnih obročkih. Osi: x = čas, y = sila kontrakcije na žilni obroček.

3.8.1 Vpliv vina Cabernet sauvignona na žilne obročke z ohranjenim endotelijem

Po uravnoteženju žilnih obročkov in preizkusu endotelija smo v poskusu uporabili le tiste žilne obročke, ki so imeli ohranjen endotelij. V kiveto smo dodali KCl v končni koncentraciji 60 mmol/L. Ko je skrčitev žilnega obročka dosegla vrh in stabilni plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem ustreznega volumna vina, tako da smo v 10 mL kivetu dobili 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4% in 5% raztopine vina.

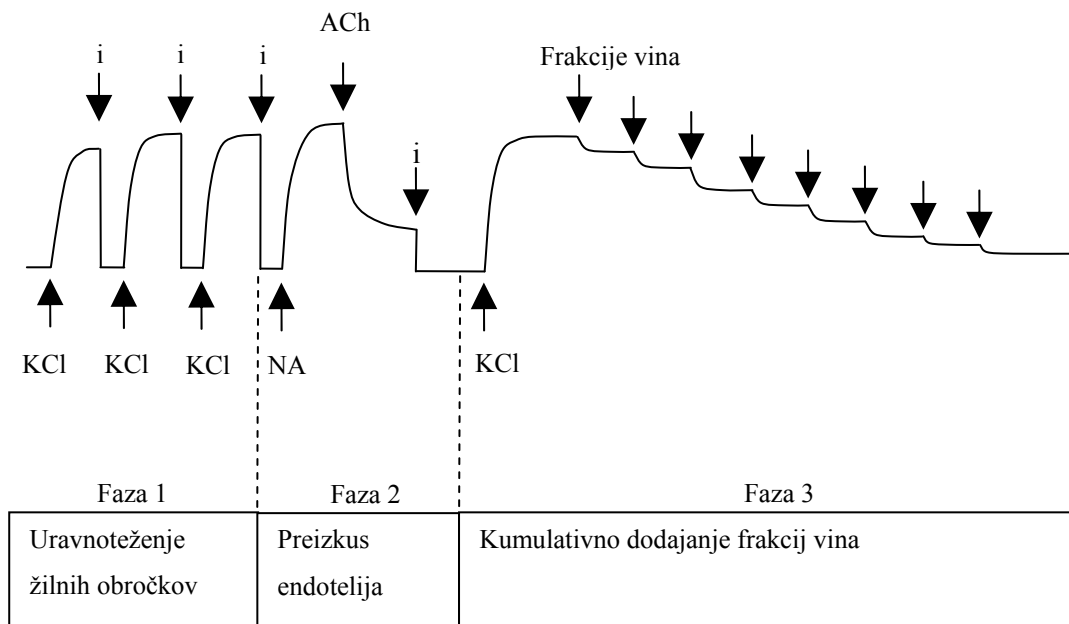
3.8.2 Vpliv vinskih frakcij na žilne obročke z ohranjenim endotelijem

Začetek poskusa poteka na enak način, kot je opisano v točki 3.8.1. Ko je skrčitev žilnega obročka dosegla vrh in stabilen plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem ustreznih redčitev pripravljenih frakcij. Predhodno smo si pripravili 1000-, 100-, 10-kratne redčitev frakcije in osnovno frakcijo.

Na grafu so prikazani dodatki v kiveto. Upoštevati moramo, da se je ob dodajanju vzorca v 10 ml kiveto, njegova koncentracija še 100-krat razredčila.

Tabela 3: Prikaz dodajanja frakcij vina v kiveto ter oznake na grafih

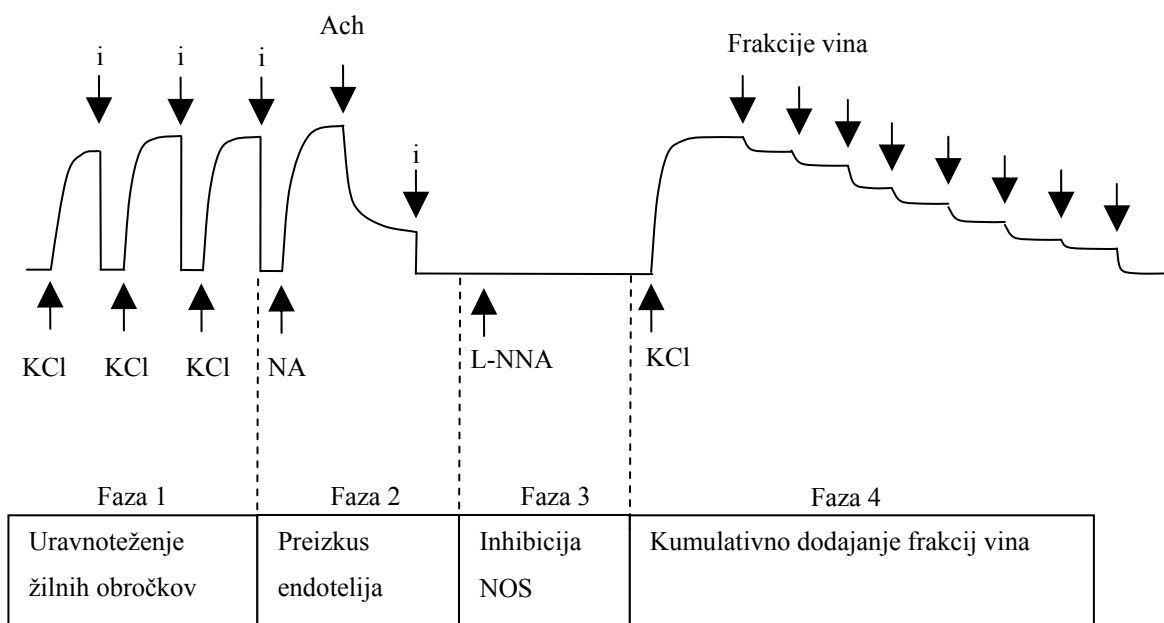
Dodatek v kiveto	Oznaka na grafu	Logaritem oznake (graf)	V kivetu (še 100× redčitev)
100 µL 1000× redčitve frakcije	0,001	-3	0,00001
200 µL 1000× redčitve frakcije	0,003	-2,52	0,00003
70 µL 100× redčitve frakcije	0,01	-2	0,0001
200 µL 100× redčitve frakcije	0,03	-1,52	0,0003
70 µL 10× redčitve frakcije	0,1	-1	0,001
200 µL 10× redčitve frakcije	0,3	-0,52	0,003
70 µL frakcije	1	0	0,01
200 µL frakcije	3	0,47	0,03



Slika 17: Shematski prikaz poteka dela. Osi: x = čas, y = sila kontrakcije na žilni obroček. Legenda: i- izpiranje s K-H raztopino, KCl= 60 mM, NA= 0,1 μ M, Ach= 1 μ M, frakcije vina smo dodajali po postopku opisanem v tabeli 3.

3.8.3 Vpliv vinskih frakcij na žilne obročke ob predhodnem dodatku L-NNA

V tem sklopu poskusov smo žilne obročke po uravnoteženju in določanju prisotnosti delujočega endotelija za 30 minut inkubirali v K-H raztopini, ki je vsebovala inhibitor NO sintaze L-NNA v končni koncentraciji 0,36 mmol/L. Nato smo izzvali skrčitev žilnih obročkov s KCl. Ko je skrčitev dosegla vrh in stabilen plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem ustreznih volumnov frakcij vina, kot je opisano v tabeli 3.



Slika 18: Shematski prikaz poteka poskusov vpliva frakcij vina na predhodno skrčene žilne obročke s KCl z ohranjenim endotelijem in zavrtim encimom NOS. Osi: x = čas, y = sila kontrakcije na žilni obroček. Frakcije vina smo dodajali po postopku opisanem v tabeli 3.

3.9 Obdelava podatkov

S pomočjo računalniškega programa za zajem in obdelavo podatkov DeweSoft 6.5 (DEWESoft d.o.o., Trbovlje, Slovenija) smo določili višino platojev (silo izometrične kontrakcije) pri posameznih poskusih. Podatke smo nato statistično in grafično obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, ZDA). Rezultate meritev pri posameznih koncentracijah smo povprečili in izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM). Število žilnih obročkov v posamezni skupini smo prikazali v rezultatih. Število obročkov v posamezni poskusni skupini smo prikazali v rezultatih.

Pri poskusih smo za vsako redčitev v kiveti izračunali odstotek sprostitve tako, da smo za 100 % referenčno vrednost vzeli razliko med višino platoja, ki jo je dosegel predhodno skrčen žilni obroček s KCl in mirovnim stanjem. Iz odvisnosti med redčitvijo frakcije vina in relativno sprostitvijo žilnih obročkov smo izdelali graf za vsako skupino poskusov.

Z dvofaktorsko analizo variance (*two-way ANOVA*) smo primerjali aritmetične sredine odzivov pri različnih redčitvah frakcij in med posameznimi frakcijami. Statistično pomembno razliko pri primerjavi rezultatov je predstavljala vrednost $p < 0,05$.

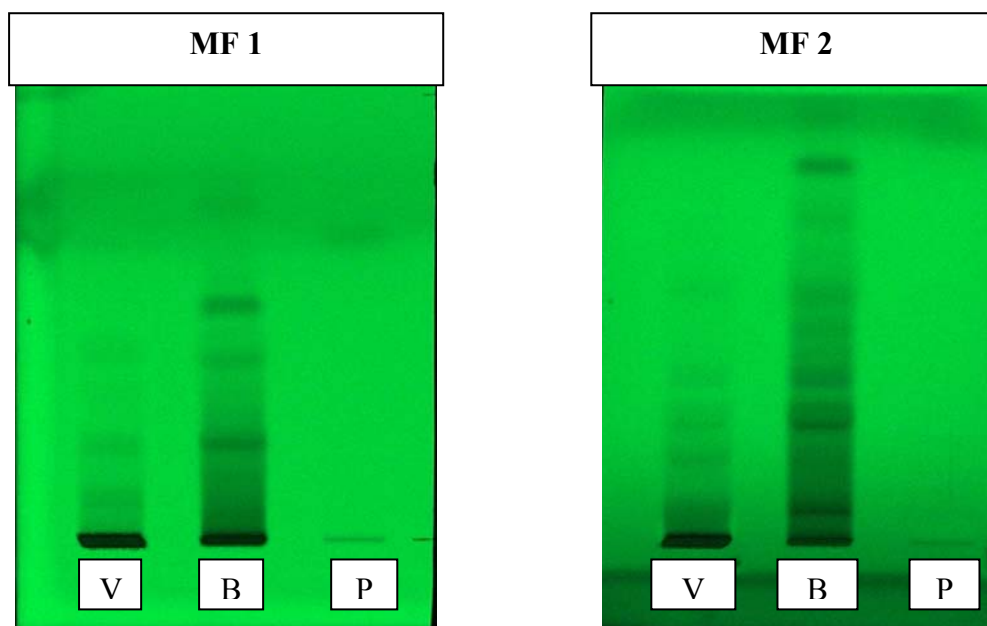
4. REZULTATI

4.1 Izolacija frakcij vina

Suhe mase treh frakcij pridobljenih iz vina Cabernet Sauvignon so:

FRAKCIJA	MASA (g)			
	1	2	3	4
Petroletna	0,11	0,18	0,0122	0,0103
Vodna	9,83	/	/	/
Butanolna	1,39	/	/	/
Volumen vina	500 mL	250 mL	500 mL	100mL

4.2 Rezultati tankoplastne kromatografije

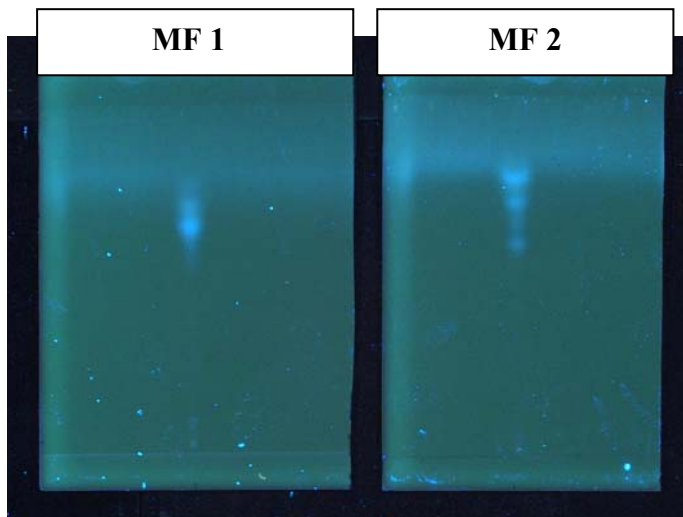


Slika 19: Kromatograma frakcij vina slikana pri valovni dolžini 254 nm.

MF 1= toluen/acetona/mravljična kislina (3/3/1, v/v/v)

MF 2= etilacetat/ocetna kislina/mravljična kislina/voda (100/11/11/26, v/v/v/v)

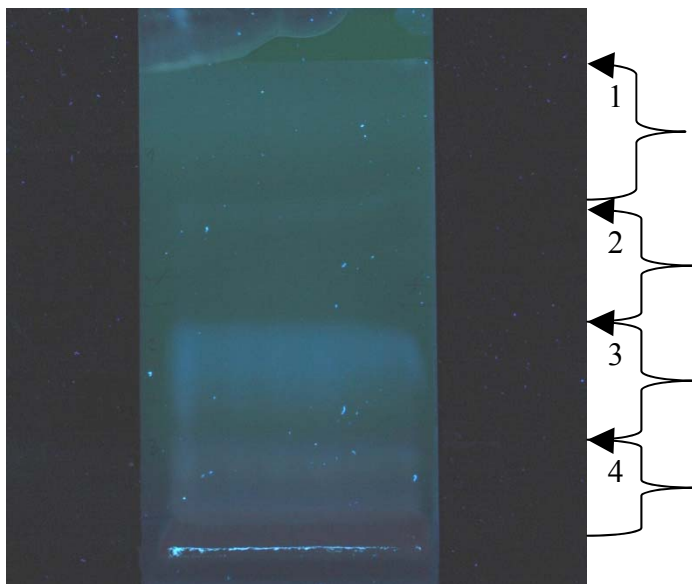
V= vodna frakcija, B= butanolna frakcija, P= petroletna frakcija



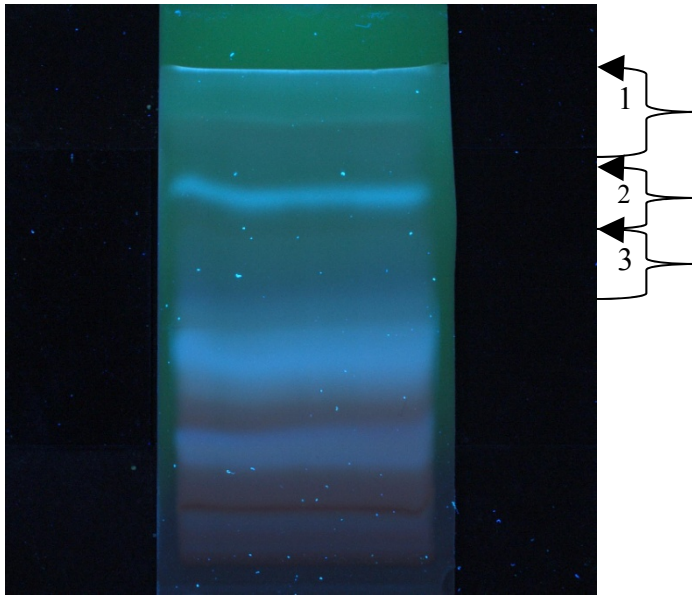
Slika 20: Kromatograma petroletrne frakcije z dvema mobilnima fazama. Slikana pri valovni dolžini 366 nm.

MF 1= etilacetat/ metanol (9/1, v/v)

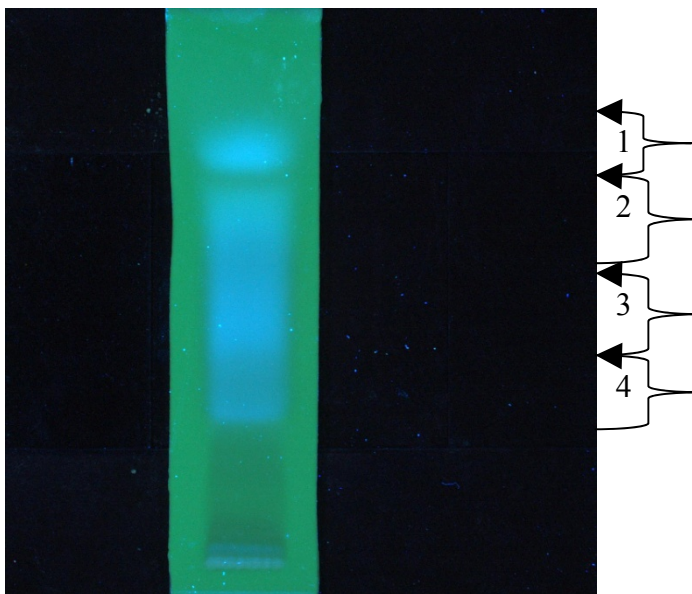
MF 2= kloroform/metanol (9/1, v/v)



Slika 21: Preparativna TLC z vodno frakcijo. Mobilna faza: etilacetat/ocetna kislina/mravljična kislina/voda (100/11/11/26, v/v/v/v). Z zavirimi oklepaji so označene podfrakcije, ki smo jih pripravili s preparativno TLC.



Slika 22: Preparativna TLC z butanolno frakcijo. Mobilna faza: etilacetat/ocetna kislina/mravljična kislina/voda (100/11/11/26, v/v/v/v). Z zavirimi oklepaji so označene podfrakcije, ki smo jih pripravili s preparativno TLC.



Slika 23: Preparativna TLC s petroletrno frakcijo. Mobilna faza: kloroform/metanol (95/5, v/v). Z zavirimi oklepaji so označene podfrakcije, ki smo jih pripravili s preparativno TLC.

4.3 Določanje vsebnosti polifenolov s Folin-Ciocalteujevo metodo

Koncentracija polifenolov je

- glede na pirogalol:

vodna frakcija = 190 mg/g frakcije

butanolna frakcija = 220 mg/g frakcije

petroletrna frakcija = 110 mg/g frakcije

- glede na galno kislino

vodna frakcija = 160 mg/g frakcije

butanolna frakcija = 180 mg/g frakcije

petroletrna frakcija = 90 mg/g frakcije

4.4 Masna spektrometrija

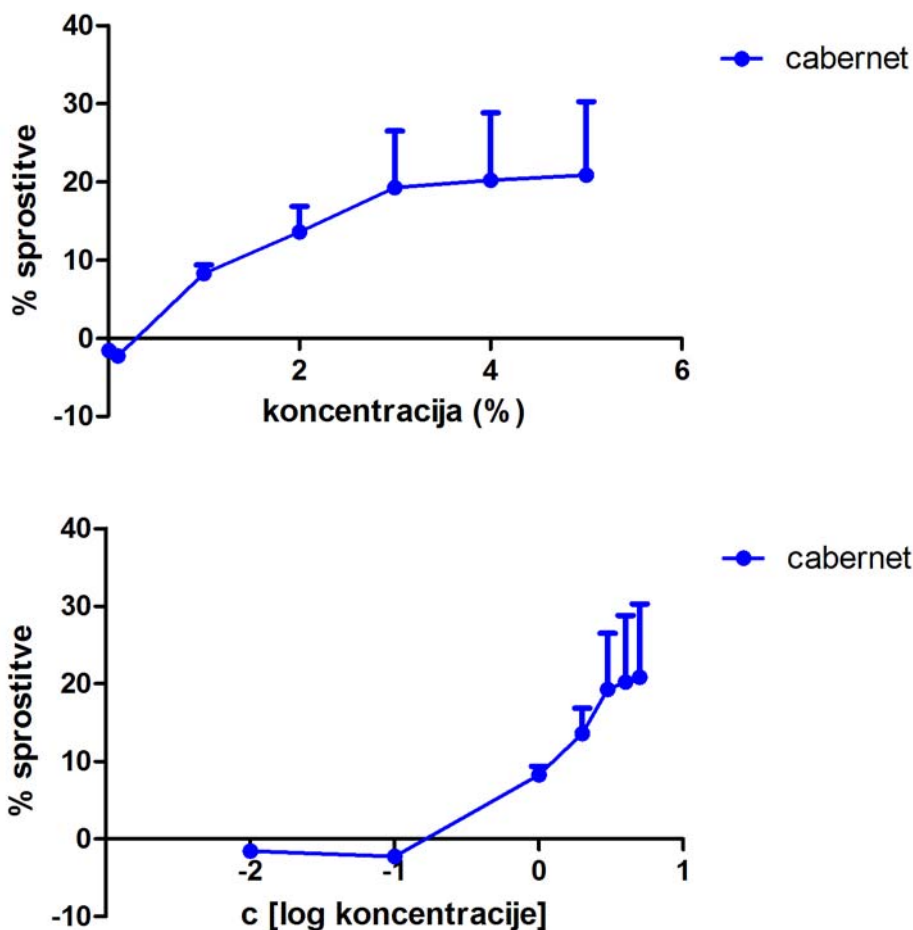
Petroletni podfrakciji 3 in 4 smo analizirali z masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan. Dobili smo molsko maso za vsako podfrakcijo (podfrakcija 3: $M = 556,2$ in podfrakcija 4: $M = 513,2$).

Tabela 4: Molske mase (iz literature) nekaterih spojin, ki so prisotne v vinu za primerjavo z dobljenimi molskimi masami.

Spojina	Molska masa
Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$)	228,2
Katehin ($C_{15}H_{14}O_6$)	290,3
Galokatehin ($C_{15}H_{14}O_7$)	306,3
Epikatehin galat ($C_{22}H_{18}O_{10}$)	442,4
Epigalokatehin galat ($C_{22}H_{18}O_{11}$)	458,4
Spojina, ki se nahaja v petroletrni podfrakciji 4	513,2
Spojina, ki se nahaja v petroletrni podfrakciji 3	556,2
Procianidin B ₂ ($C_{30}H_{26}O_{12}$)	578,5
Galotanin ($C_{27}H_{24}O_{18}$)	636,5

4.5 Vpliv Cabernet sauvignona na sprostitve žilnih obročkov

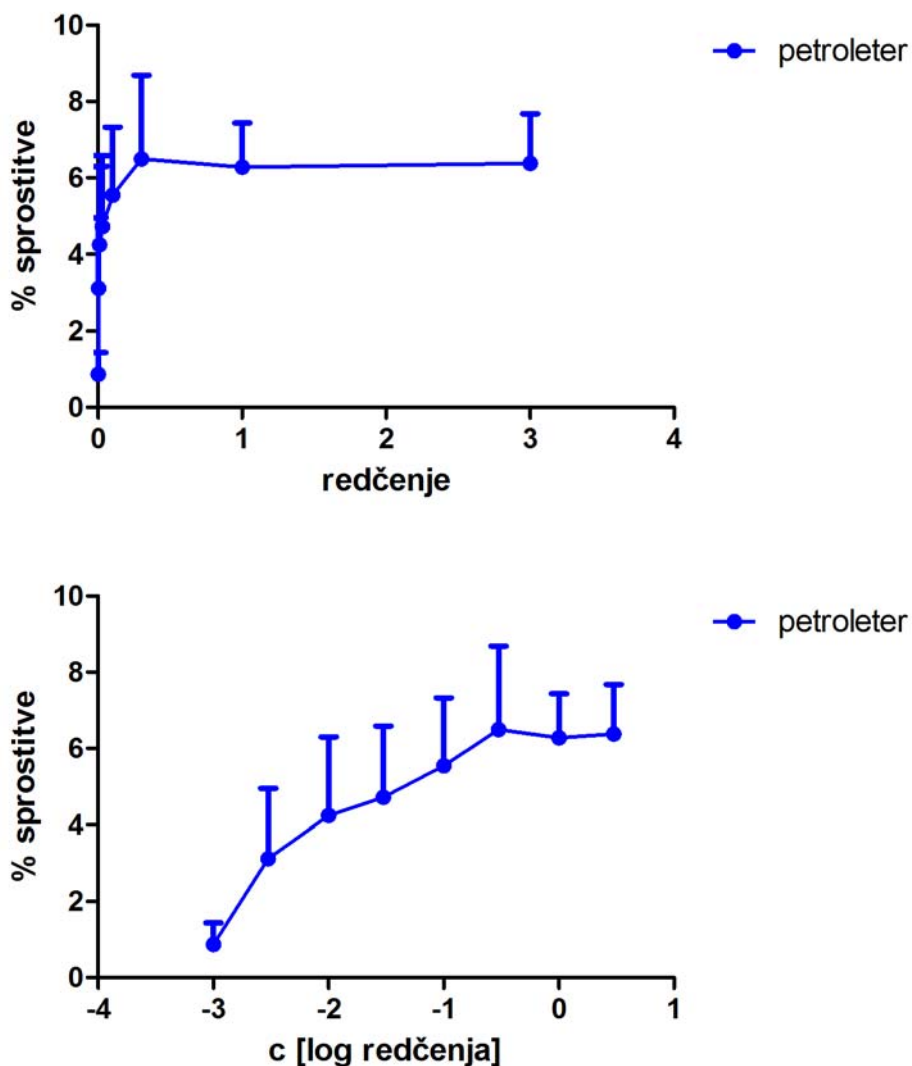
Ugotavljali smo sprostitve žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah vina Cabernet sauvignona.



Slika 24: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitev predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju vina Cabernet sauvignona. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od koncentracije vina v kivetu (%) (zgornji diagram) oziroma logaritma koncentracije vina (%) (spodnji diagram). Poskus je bil izveden na šestih žilnih obročkih.

4.6 Vpliv petroletrne frakcije vina na sprostitve žilnih obročkov

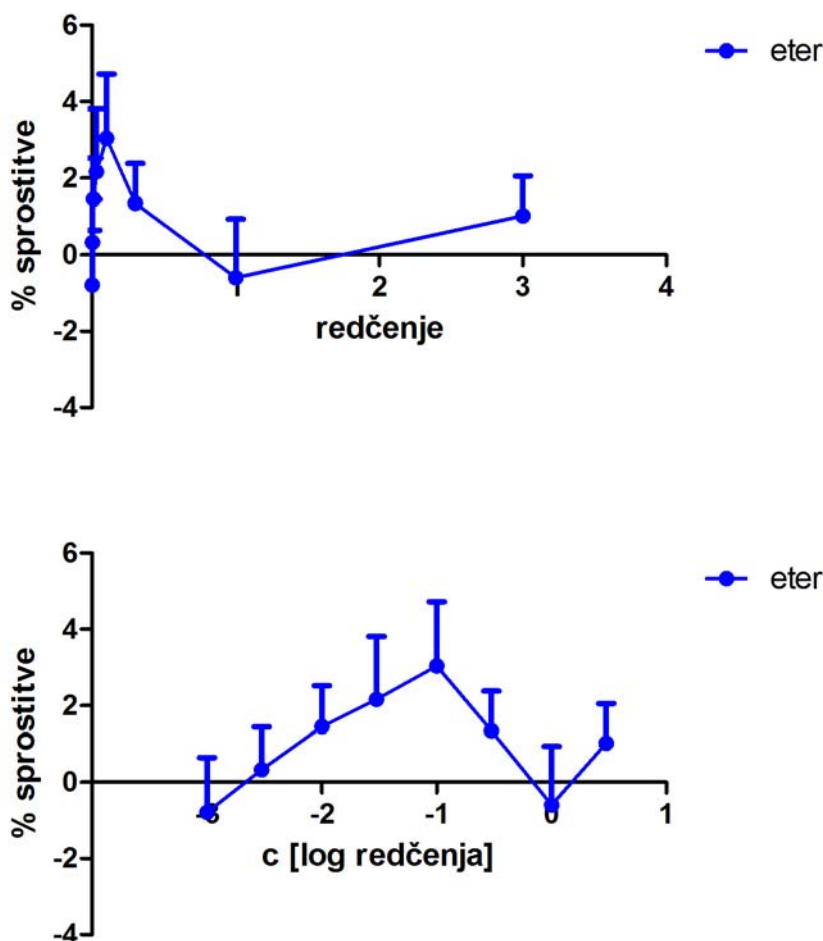
Ugotavljali smo sprostitve žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah petroletrne frakcije vina.



Slika 25: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitev predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju petroletrne frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) petroletrne frakcije vina. Krivulja prikazuje povprečje rezultatov meritev 2 neodvisno pripravljenih petroletrnih izvlečkov, testiranih na skupno 7 žilnih obročkih. Točke na grafu predstavljajo dodatke frakcij v kiveto. Postopek opisan v tabeli 3.

4.7 Vpliv etrne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov

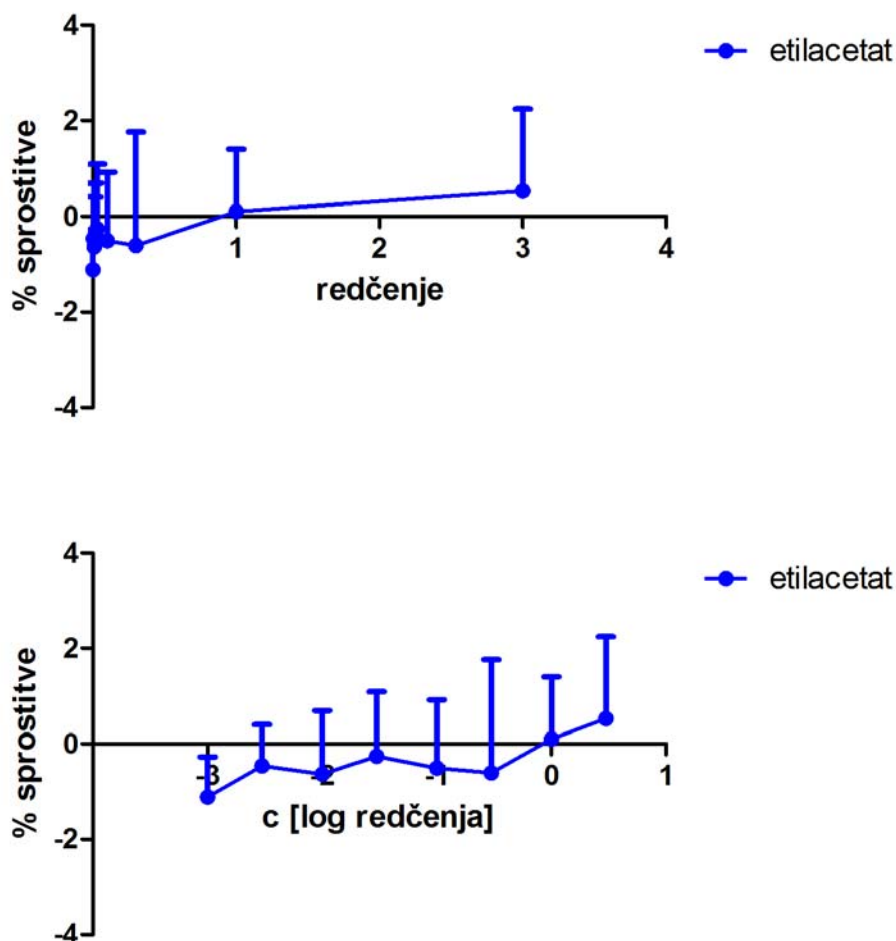
Ugotavljali smo sprostitvev žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah etrne frakcije vina.



Slika 26: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitvev predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju etrne frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) etrne frakcije vina. Krivulja prikazuje povprečje rezultatov meritev 1 izvlečka, testiranega na 7 žilnih obročkih. Točke na grafu predstavljajo dodatke frakcij v kiveto. Postopek opisan v tabeli 3.

4.8 Vpliv etilacetatne frakcije vina na sprostitve žilnih obročkov

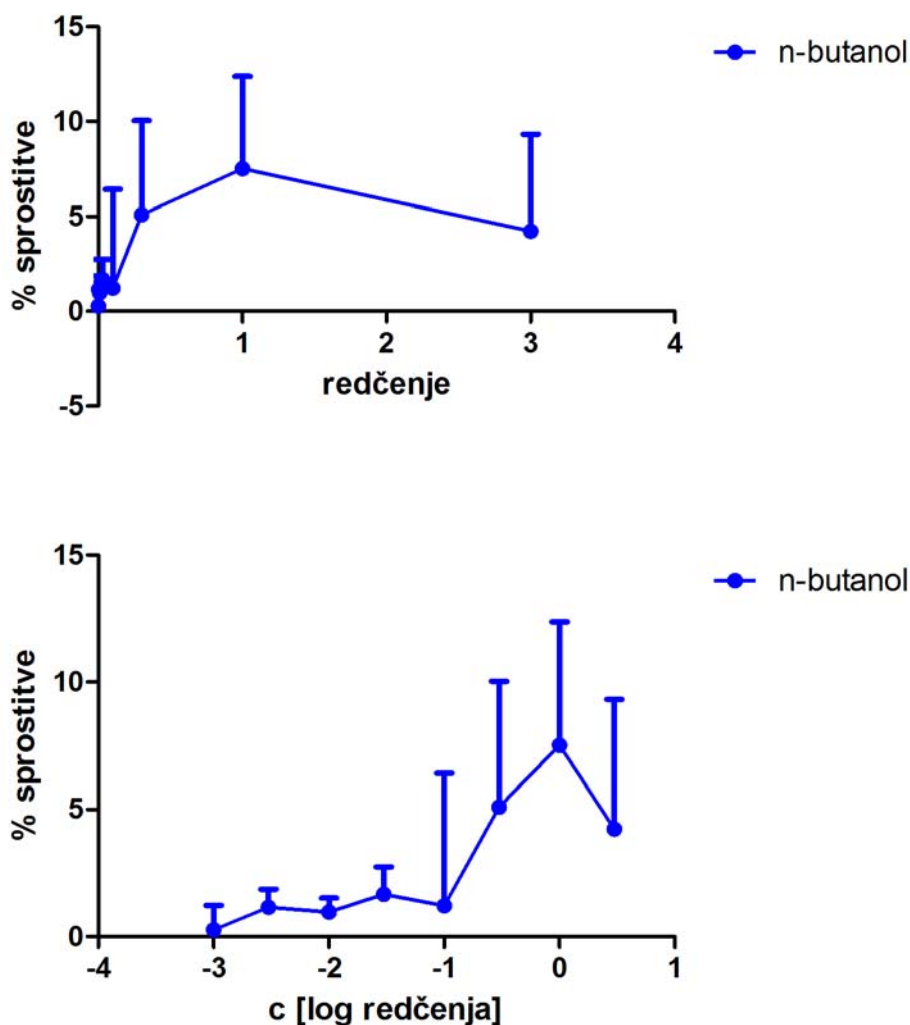
Ugotavljali smo sprostitve žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah etilacetatne frakcije vina.



Slika 27: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitve predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju etilacetatne frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) etilacetatne frakcije vina. Krivulja prikazuje povprečje rezultatov meritev 1 izvlečka, testiranega na 7 žilnih obročkih. Točke na grafu predstavljajo dodatke frakcij v kiveto. Postopek opisan v tabeli 3.

4.9 Vpliv butanolne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov

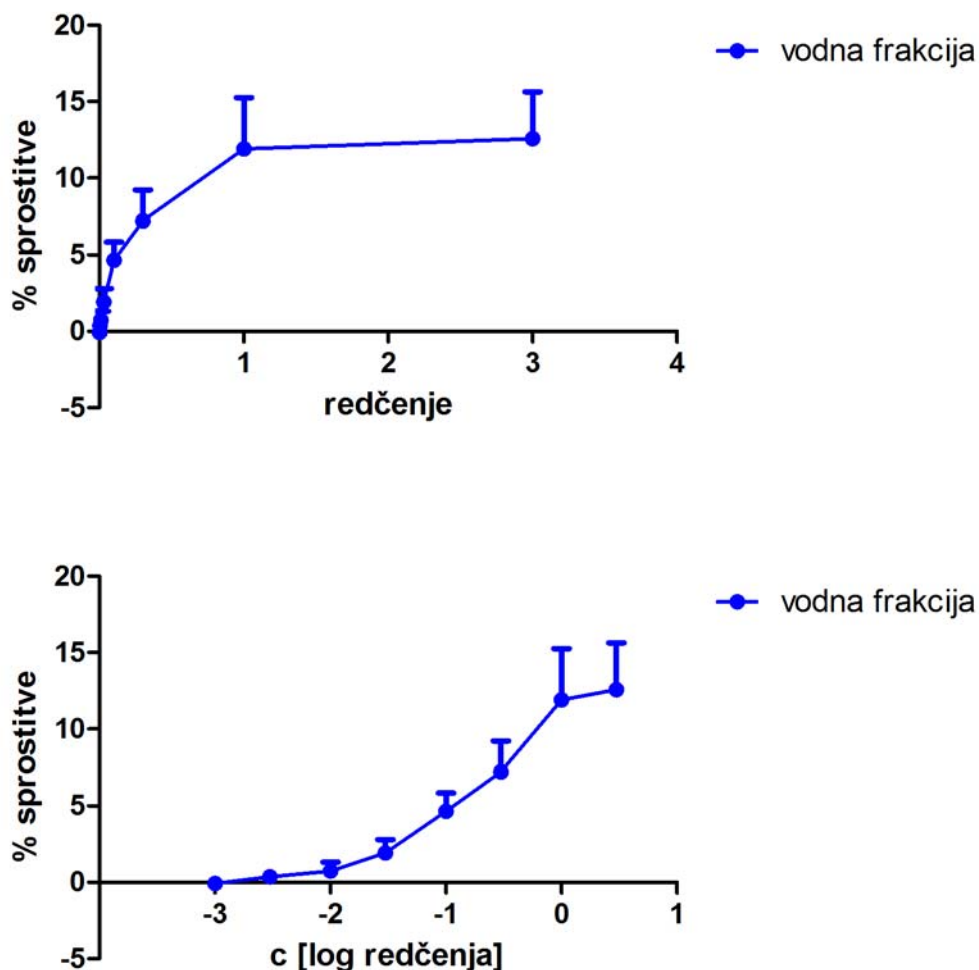
Ugotavljali smo sprostitvev žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah butanolne frakcije vina.



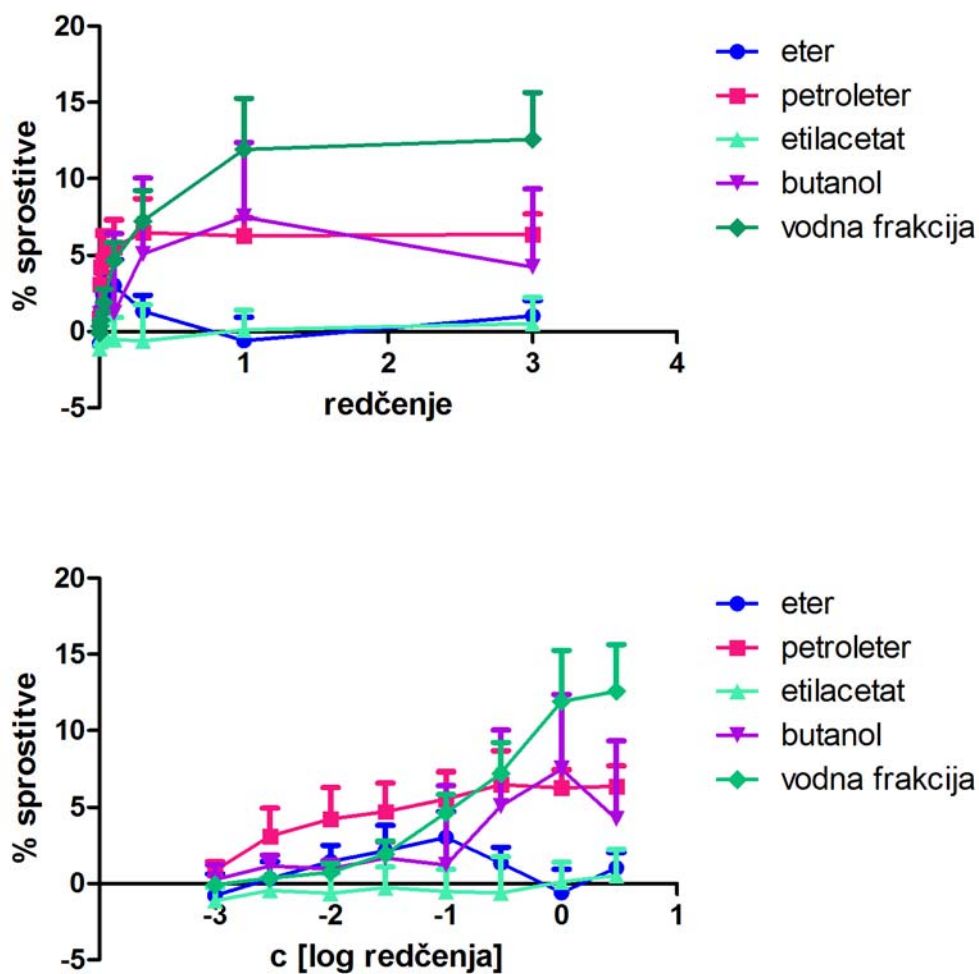
Slika 28: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitvev predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju butanolne frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) butanolne frakcije vina. Krivulja prikazuje povprečje rezultatov meritev 2 neodvisno pripravljenih butanolnih izvlečkov, testiranih na skupno 10 žilnih obročkih. Točke na grafu predstavljajo dodatke frakcij v kiveto. Postopek opisan v tabeli 3.

4.10 Vpliv vodne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov

Ugotavljali smo sprostitvev žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah vodne frakcije vina.



Slika 29: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitvev predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju vodne frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) vodne frakcije vina. Krivulja prikazuje povprečje rezultatov meritev 2 neodvisno pripravljenih petroletrnih izvlečkov, testiranih na skupno 8 žilnih obročkih. Točke na grafu predstavljajo dodatke frakcij v kiveto. Postopek opisan v tabeli 3.



Slika 30: Koncentracijsko-relaksacijske krivulje vseh frakcij. Sprostitev predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju vseh frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) vodne frakcije vina. Točke na grafu predstavljajo dodatke frakcij v kiveto. Postopek opisan v tabeli 3.

Rezultati dvofaktorske analize variance (two way ANOVA) so strnjeni v tabeli 5. Med sabo smo primerjali vse frakcije.

Tabela 5: Primerjava frakcij z dvofaktorsko analizo variance (two way ANOVA).

s pomeni signifikantno razliko, ns pa nesignifikantno razliko.

* Petroletna frakcija se signifikantno razlikuje z etrno frakcijo v točki 1 ($p < 0,05$).

* Petroletna frakcija se signifikantno razlikuje z etilacetatno frakcijo v točki 0,3 ($p < 0,05$).

** Etilacetatna frakcija se signifikantno razlikuje vodno frakcijo v točkah 0,3 ($p < 0,05$); 1 in 3 ($p < 0,001$).

*** Vodna frakcija se signifikantno razlikuje v točkah 1 in 3 ($p < 0,001$) z etrno frakcijo.

	petroleter	eter	etilacetat	butanol	voda
petroleter	/	s (1) *	s (0,3) *	ns	ns
eter	s (1) *	/	ns	ns	s (1;3) ***
etilacetat	s (0,3) *	ns	/	ns	s (0,3;1;3) **
butanol	ns	ns	ns	/	ns
voda	ns	s (1;3) ***	s (0,3;1;3) **	ns	/

Petroletna frakcija se v primerjavi z butanolno in vodno frakcijo signifikantno ne razlikuje v nobeni točki na grafu. Ta frakcija se signifikantno razlikuje z etrno frakcijo v točki 1 ($p < 0,05$) in z etilacetatno frakcijo v točki 0,3 ($p < 0,05$).

Etrna frakcija se v primerjavi s petroletrno frakcijo signifikantno razlikuje v točki 1 ($p < 0,05$), z vodno frakcijo pa se signifikantno razlikuje v točkah 1 in 3 ($p < 0,001$). Z drugima dvema frakcijama se etrna frakcija signifikantno ne razlikuje v nobeni točki.

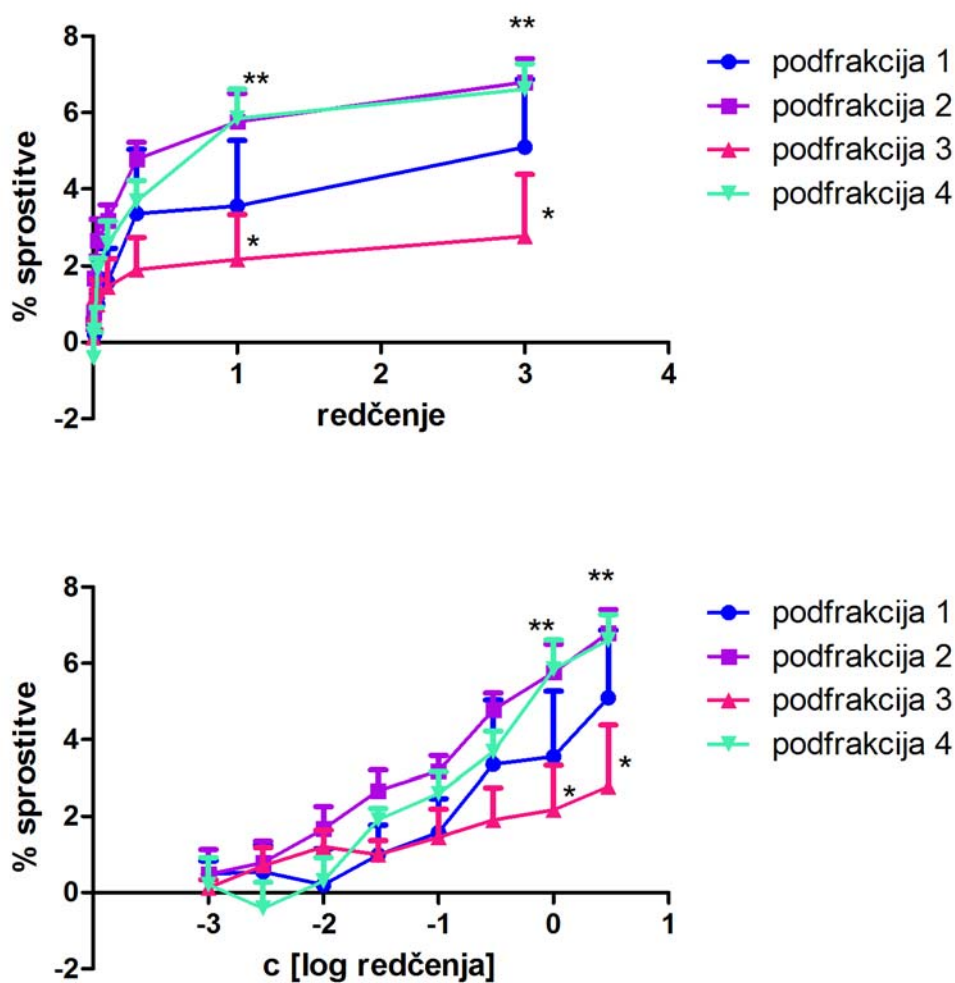
Etilacetatna frakcija se z etrno in butanolno frakcijo signifikantno ne razlikuje v nobeni točki. Signifikantno se razlikuje s petroletrno frakcijo v točki 0,3 ($p < 0,05$) in z vodno frakcijo v točkah 0,3 ($p < 0,05$); 1 in 3 ($p < 0,001$).

Butanolna frakcija se v primerjavi z nobeno frakcijo signifikantno ne razlikuje.

Vodna frakcija se signifikantno razlikuje v točkah 1 in 3 ($p < 0,001$) z etrno frakcijo in v točkah 0,3 ($p < 0,05$); 1 in 3 ($p < 0,001$) z etilacetatno frakcijo. S petroletrno in butanolno frakcijo pa se signifikantno ne razlikuje v nobeni točki.

4.11 Vpliv podfrakcij petroletrne frakcije vina na sprostitve žilnih obročkov

Ugotavljali smo sprostitve žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah podfrakcij petroletrne frakcije vina.



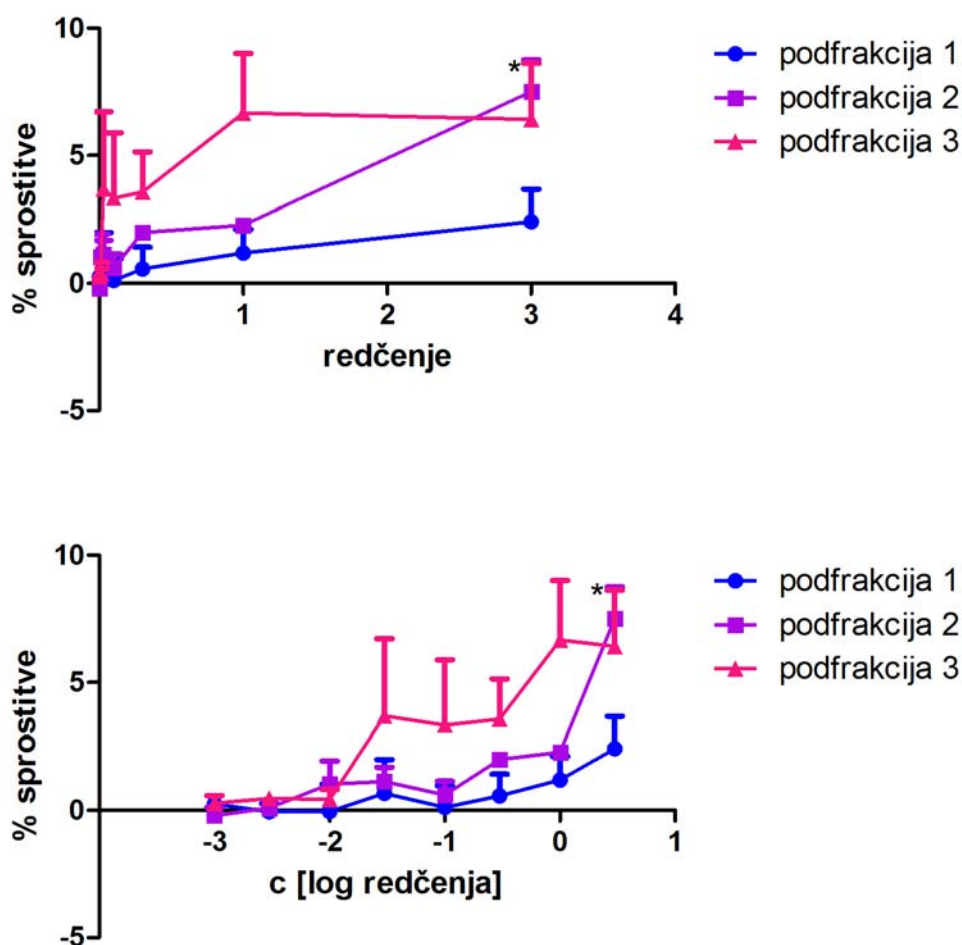
Slika 31: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitve predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju podfrakcij petroletrne frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) podfrakcij petroletrne frakcije vina. Krivulje prikazujejo povprečje rezultatov meritev 1 izvlečka testiranega na skupno 18 žilnih obročkih, od tega podfrakcija 1 na 6 žilnih obročkih, ostale podfrakcije pa vsaka na 4 žilnih obročkih.

(* je $p < 0,01$; podfrakcija 2 v primerjavi s podfrakcijo 3; ** je $p < 0,01$; podfrakcija 3 v primerjavi s podfrakcijo 4)

Dvofaktorska analiza variance (two way ANOVA) je pokazala, da se koncentracijsko-relaksacijska krivulja podfrakcije 2 statistično značilno razlikuje od podfrakcije 3 v točki 1 in 3 ($p < 0,01$). Podfrakcija 3 se od podfrakcije 4 signifikantno razlikuje v točkah 1 in 3 ($p < 0,01$). Ostale podfrakcije se med sabo statistično pomembno ne razlikujejo v nobeni točki. (Slika 31)

4.12 Vpliv podfrakcij butanolne frakcije vina na sprostitvev žilnih obročkov

Ugotavljali smo sprostitvev žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah podfrakcij butanolne frakcije vina.



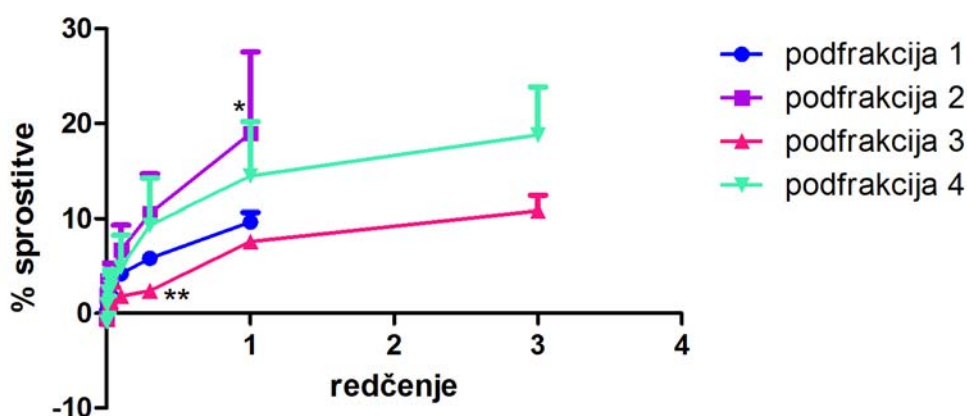
Slika 32: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitev predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju podfrakcij butanolne frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) podfrakcij butanolne frakcije vina. Krivulje prikazujejo povprečje rezultatov meritev 1 izvlečka testiranega na skupno 15 žilnih obročkih, od tega podfrakcija 1 na 6 žilnih obročkih, podfrakcija 2 na 4-ih in podfrakcija 3 na 5 žilnih obročkih.

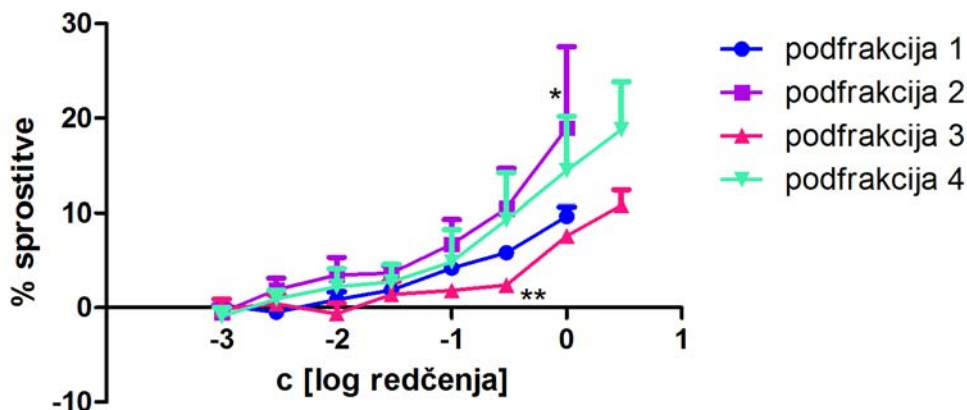
(* je $p < 0,01$; podfrakcija 1 v primerjavi s podfrakcijo 2)

Dvofaktorska analiza variance (two way ANOVA) je pokazala, da se koncentracijsko-relaksacijska krivulja podfrakcije 1 statistično značilno razlikuje od podfrakcije 2 v točki 3 ($p < 0,01$). Druge podfrakcije se med seboj statistično pomembno ne razlikujejo v nobeni točki. (Slika 32)

4.13 Vpliv podfrakcij vodne frakcije vina na sprostitve žilnih obročkov

Ugotavljali smo sprostitve žilnih obročkov, predhodno skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah podfrakcij vodne frakcije vina.





Slika 33: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitev predhodno s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju podfrakcij vodne frakcije vina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) podfrakcij vodne frakcije vina. Pri tem sklopu poskusov nam je pri podfrakcijah 1 in 2 zmanjkalo vzorca, zato nimamo podatkov % sprostitve pri zadnjem dodatku vzorca. Krivulje prikazujejo povprečje rezultatov meritev 1 izvlečka testiranega na skupno 9 žilnih obročkih, od tega podfrakcija 1 na 3 žilnih obročkih, ostale podfrakcije pa vsaka na 2 žilnih obročkih.

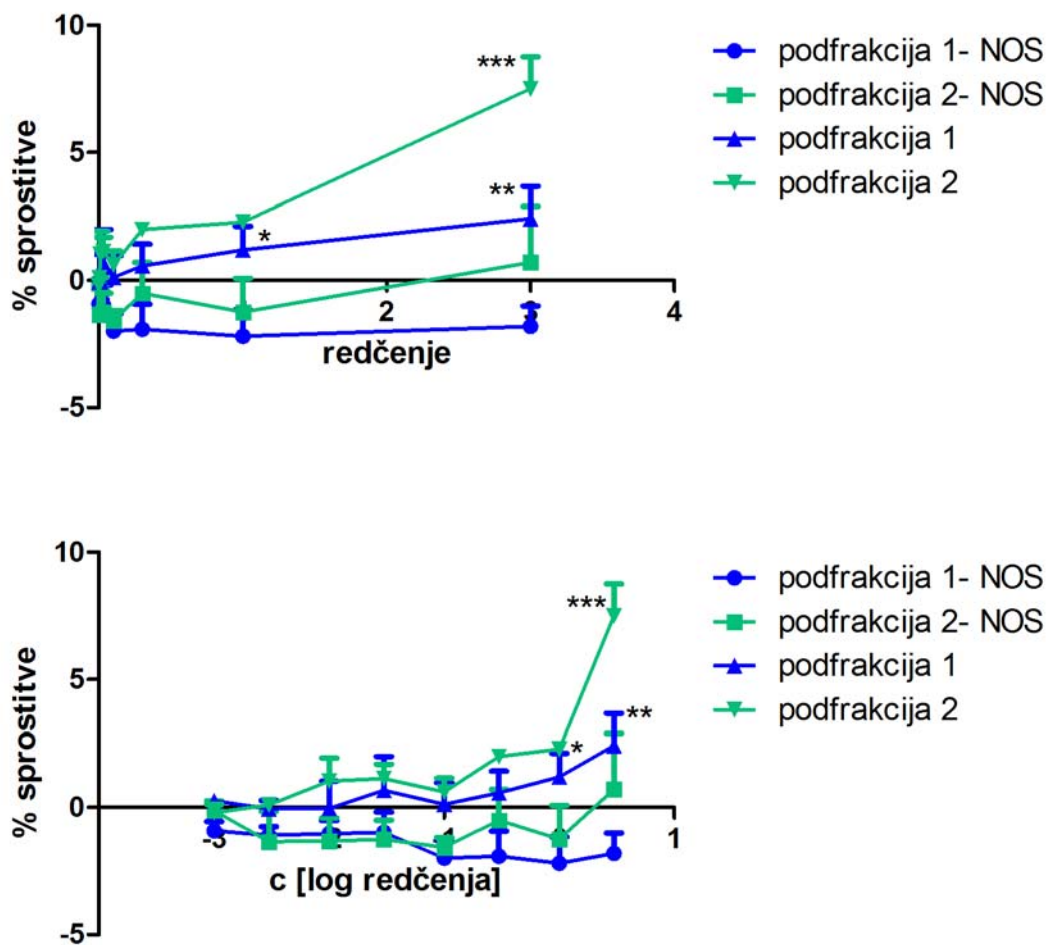
(* je $p < 0,05$; podfrakcija 1 v primerjavi s podfrakcijo 2; ** je $p < 0,05$; podfrakcija 1 v primerjavi s podfrakcijo 3)

Dvofaktorska analiza variance (two way ANOVA) je pokazala, da se koncentracijsko-relaksacijska krivulja podfrakcije 1 statistično značilno razlikuje od podfrakcije 2 v točki 1 ($p < 0,05$) in podfrakcija 1 se od podfrakcije 3 signifikantno razlikuje v točki 0,3 ($p < 0,05$). Druge podfrakcije se med seboj statistično pomembno ne razlikujejo v nobeni točki. (Slika 33)

4.14 Vpliv vinskih podfrakcij na žilne obročke ob predhodnem dodatku

L-NNA

Ugotavljali smo sprostitve žilnih obročkov, predhodno inkubiranih v L-NNA in skrčenih s KCl, pri različnih redčitvah podfrakcij 1 in 2 butanolne frakcije vina.



Slika 34: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitev predhodno inkubiranih v L-NNA in s KCl skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju podfrakcij 1 in 2 butanolne frakcije vina brez in z inkubacijo v L-NNA. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitve v odvisnosti od redčitve (zgornji diagram) oziroma logaritma redčitve (spodnji diagram) podfrakcij butanolne frakcije 1 in 2 vina. Krivulja prikazuje povprečje rezultatov

meritev 1 izvlečka testiranega na skupno 20 žilnih obročkih, obe podfrakciji 1 na 6 žilnih obročkih in obe podfrakciji 2 na 4 žilnih obročkih.

(* je $p < 0,05$; podfrakcija 1 butanolne frakcije v primerjavi z butanolno podfrakcijo 1, ki je bila inkubirana v *L-NNA* v točki 1; ** je $p < 0,01$; podfrakcija 1 butanolne frakcije v primerjavi z butanolno frakcijo 1, ki je bila inkubirana v *L-NNA* v točki 3; *** je $p < 0,001$; podfrakcija 2 butanolne frakcije z V *L-NNA* inkubirano butanolno podfrakcijo 2 pri točki 3)

Z dvofaktorsko analizo variance (two way ANOVA) smo primerjali podfrakcije 1 in 2 butanolne frakcije brez inkubacije v *L-NNA* in iste podfrakcije s predhodno inkubacijo v *L-NNA*. Ugotovili smo, da se podfrakciji 1 med seboj statistično pomembno razlikujeta v točki 1 ($p < 0,05$) in v točki 3 ($p < 0,01$). Podfrakciji 2 pa se statistično pomembno razlikujeta v točki 3 ($p < 0,001$). (Slika 34)

5. RAZPRAVA

5.1 Izolacija frakcij vina

Po osnovnih meritvah na žilah s petimi frakcijami smo se osredotočili na tri, in sicer na petroletrno, butanolno in vodno frakcijo. Slednje so povzročile največjo vazorelaksacijsko aktivnost na žilah, oziroma je bil njihov učinek signifikantno različen od nič.

Mase suhih frakcij kažejo, da je največ snovi ostalo v preostanku-vodni frakciji, ki je tudi povzročila največje sproščanje žilnih obročkov med frakcijami. Vendar sta tudi butanolna in petroletrna frakcija bili aktivni, čeprav je bila njuna suha masa precej nižja od vodne. Iz tega sklepamo, da so tudi v teh dveh frakcijah prisotne snovi, ki kažejo sprostivne učinke na žilah.

Ekstrakcijo iz vina smo večkrat ponovili, vendar vedno po istem postopku. Pri povečanju volumna vina smo ustrezno povečali volumne ostalih topil zato, da smo dosegli enaka razmerja kot pri prvi ekstrakciji. Ekstrakcijo s petroletrom smo štirikrat ponovili, ker so bile suhe mase izredno nizke. Tak rezultat je nepričakovan, kar kaže na nerobustnost sistema.

5.2 Tankoplastna kromatografija

Osnovne TLC ploščice smo razvijali zato, da smo našli ustrezne mobilne faze za preparativno TLC.

Po razvijanju vodne, butanolne in petroletrne frakcije v dveh mobilnih fazah (Slika 19) smo ugotovili, da je druga mobilna faza (etilacetat/ocetna kislina/mravljična kislina/voda, 100/11/11/26) boljša, ker je boljša resolucija. Slabost te mobilne faze je, da vodna frakcija večinoma ostane na startu. Vzrok je verjetno v profilu spojnin, ki so prisotne v vodni frakciji. Prav tako je petroletrna frakcija ostala na startu. V tej frakciji so prisotne verjetno bolj neparne spojine, zato je ta mobilna faza neprimerna za petroletrno frakcijo. Kasneje smo uporabili drugo mobilno fazo (kloroform/metanol, 95/5). (Slika 23)

V članku J.C. Fantinelli in sod. (35) smo zasledili štiri frakcije rdečega vina, ki so podobne našim. In sicer frakcije diklorometana (I), etilacetata (II), butanola (III) in vodni preostanek (IV). Njihov profil spojin je naslednji: v frakciji I in II so prisotni resveratrol, flavonoli (kvercetin) in flavan-3-oli. V frakciji III in IV pa so večinoma prisotni antociani in proantocianidini. Navajajo, da so antociani večinoma prisotni v frakciji III, proantocianidini pa v frakciji IV.

Predvidevamo, da je v naših frakcijah podoben profil spojin. V butanolni frakciji so prisotni antociani, saj so se na kromatogramu obarvali modrovijolično. (Slika 22) Vodna frakcija je večinoma ostala na startu, kar dokazuje prisotnost proantocianidinov, ki so zaradi svoje velikosti dokaj nemobilni. Prisotni so tudi antociani, kar vidimo po modrovijolično obarvanih lisah na kromatogramu. (Slika 21) Petroletna frakcija pa je ostala neznanka. Na kromatogramu (Slika 20) se vidijo tri lise, po čemer sklepamo, da je v frakciji prisotnih več spojin. Najverjetneje so prisotne bolj nepolarne spojine, podobne tem v diklorometanski frakciji iz omenjenega članka.

5.3 Določanje vsebnosti polifenolov s Folin-Ciocalteujevo metodo

Vrednosti skupnih polifenolov so primerljive z objavljenimi vrednostmi v literaturi (35). Preseneča pa dejstvo, da je najvišja vrednost v butanolni frakciji, ne pa v vodni. To je v nasprotju z navedbami iz literature. So pa vrednosti višje pri izražanju glede na pirogalol kot pri izražanju glede na galno kislino.

5.4 Masna spektrometrija

Rezultati masne spektrometrije 3. in 4. podfrakcije petroletnih frakcij so nam prinesli podatke o molski masi, ki se ne ujemajo s podatki v literaturi glede molskih mas spojin prisotnih v vinu. (Tabela 4) Dobili smo premalo vrhov fragmentov, da bi lahko ugotovili strukturo spojin, ki so prisotne v petroletni frakciji 3 in 4. Zaradi treh lis na kromatogramu (Slika 20) sklepamo, da gre za zmes komponent.

5.5 Izolirani žilni obročki podganje aorte

Poskusi so bili izvedeni na izoliranih žilnih obročkih aorte podganjih samcev seva Wistar. Bistvena prednost uporabe manjših živalskih modelov, kamor spada podgana, je lažja in cenejša vzreja živali v laboratorijskih pogojih. Veliki sesalci, med katere spada npr. prašič, so ustrežnejši živalski model za primerjavo s človekom (37).

Vpliv okolja na živali je bil nadzorovan s konstantno temperaturo, vlažnostjo in primerno menjavo svetlobe. V naši raziskavi nismo preverjali vpliva cirkadianih ritmov na variabilnost rezultatov. Vsekakor pa bi se lahko izognili morebitnim vplivom cirkadianih ritmov in dosegli večjo skladnost rezultatov tako, da bi opravili večino meritev v krajšem časovnem obdobju in s pričetkom ob isti uri dneva.

Prednost *in vitro* poskusov na izoliranih žilah je, da lahko nadziramo koncentracijo učinkovine na mestu delovanja, tj. ob receptorju. Izognemo se tudi vplivu ostalih organskih sistemov (npr. vegetativno živčevje, endokrini sistem), ki lahko z izločanjem določenih snovi vplivajo na opazovani učinek.

Za anestezijo živali smo izbrali uretan, ki v uporabljenih odmerkih nima vpliva na srčno-žilni sistem podgane (38). Sam postopek priprave živali in izolacije aorte je bil vedno enak, standardiziran in hiter. Predhodno smo preizkusili, kateri del aorte je najbolj primeren za pričujočo raziskavo. Pri poskusih na izoliranih obročkih ascendentne aorte smo v povprečju dobili višje, vendar neenakomerne odzive. Tudi sama priprava je bila daljša in zahtevnejša, kar je povečalo možnost poškodbe žilnega obročka. Odsek ascendentne aorte je precej krajši in omogoča pripravo največ treh žilnih obročkov, medtem ko jih lahko iz odseka descendente aorte pripravimo osem. Iz navedenih razlogov smo se torej odločili, da poskuse izvedemo na izolirani descendenti torakalni aorti podgane.

Stopnja skrčenja žilnih obročkov je odvisna od koncentracije vazokonstriktorja in ostalih dejavnikov, kot so npr. variabilnost debeline gladkega mišičnega sloja in premer žilnega obročka.

5.6 Vpliv frakcij vina na sprostitvev žilnih obročkov

Določali smo od redčitve frakcij vina odvisen sprostitveni odziv na žilnih obročkih z ohranjenim delujočim endotelijem in tudi na žilnih obročkih z inhibirano NO- sintazo. Vsi žilni obročki so bili predhodno skrčeni s KCl, ki povzroči depolarizacijo membrane gladke mišične celice v steni krvne žile in odprtje napetostno odvisnih Ca²⁺-kanalov tipa L. Temu sledi vdor Ca²⁺ in skrčenje gladkih mišičnih celic. Mehanizem delovanja KCl na krčenje žilnega obročka je torej neodvisen od endotelija in receptorjev (39).

V različnih študijah so dokazali, da polifenolne spojine iz rdečega vina povzročijo od endotelija odvisno vazorelaksacijo, zato smo naše poskuse izvajali le na žilnih obročkih z ohranjenim endotelijem. Od endotelija neodvisna relaksacija, in s tem direkten vpliv na gladke mišične celice, nastopi le pri visokih koncentracijah polifenolov (40).

Vse frakcije, razen etrne in etilacetatne, so povzročile sprostitveni odziv na žilnih obročkih, po predhodni skrčitvi le teh. Zato smo ti dve frakciji po prvem sklopu poskusov opustili. Tudi kasnejša statistična obdelava podatkov je pri vodni in petroletrni frakciji potrdila, da se statistično značilno razlikujeta od etrne in etilacetatne. Butanolna frakcija se sicer od nobene druge frakcije ne razlikuje statistično značilno, vendar je njen odziv različen od nič. Iz tega razloga smo to frakcijo proučevali tudi v nadaljnjem delu.

Pri poskusih s čistim vinom je potrebno pri rezultatih upoštevati tudi vpliv etanola, ki ga nismo predhodno odstranili. Smo pa v literaturi zasledili, da etanol v koncentracijah prisotnih v vinu, nima vpliva na žile (40).

Pri frakcijah smo se vplivu etanola in ostalih topil izognili z odparevanjem pri znižanem tlaku, vendar nismo izvajali kontrolnih poskusov s posameznimi topili. Predpostavili smo, da je ostanek topil v frakcijah tako majhen, da ne vpliva na žilne obročke.

Od frakcij je bila najbolj aktivna vodna, sledili sta ji petroletrna in butanolna frakcija. Vendar z nobeno frakcijo nismo dosegli odstotka relaksacije, ki smo ga dosegli s čistim vinom. Pri vinu je bila najvišja preizkušena koncentracija 5 vol/vol % vina v končni raztopini ob tkivu, pri frakcijah pa 3 vol/vol %. Če predpostavimo, da bi testirana frakcija vsebovala eno aktivno snov, ki bi se ekstrahirala samo v eno frakcijo, bi bila koncentracija

te snovi v izvlečku 3,3-krat večja od koncentracije te snovi v vinu. To izračunamo tako, da začetni volumen vina za ekstrakcijo (100 mL) delimo s končnim volumnom frakcij (30 mL). Ker pa odstotek sprostitve žile pri frakcijah ni večji od odstotka sprostitve žile pri vinu sklepamo, da gre za sinergistični učinek več spojin.

Pri podfrakcijah sta najobetavnejše rezultate kazali 2. in 4. podfrakcija vodne frakcije, ki sta po višini maksimalne sprostitve žil primerljivi z rezultati vina. Sklepamo, da so v teh dveh frakcijah prisotni tisti polifenoli, ki imajo največji sprostitveni vpliv na žile.

Petroletni frakciji 2 in 4 sta dosegli odstotek relaksacije, ki je podoben butanolnima frakcijama 2 in 3. Je pa petroletna frakcija zanimiva predvsem s tega stališča, da je profil spojin še popolnoma neznan.

V večini objavljenih študij pripisujejo največji del sprostitvenega učinka na žile antocianom, proantocianidinom in kondenziranim taninom (39). Vendar aktivnost petroletne frakcije nakazuje na to, da so v vinu prisotne tudi bolj nepolarne spojine s sprostitvenim učinkom na žile.

Poskusi, ki smo jih izvedli na žilnih obročkih, na katerih smo predhodno inhibirali NOS, so potrdili dejstvo, da vinski polifenoli povzročijo sprostitvev žilnih obročkov preko endotelijskega NOS sistema.

6. SKLEP IN NAČRTI ZA NADALJNJE DELO

Z raziskavo nam je uspelo dokazati, da frakcije vina povzročajo od endotelija odvisno sprostitvev žilnih obročkov. Prav tako smo pokazali, da je glavno mesto delovanja frakcij vina znotraj endotelijske celice in da temelji na aktivaciji encimskega sistema NO sintaze. Prav slednja lastnost skupaj z antioksidativnimi lastnostmi polifenolov v vinu predstavlja osnovo za preprečevanje endotelijske disfunkcije, ki je pogosta prva stopnja v patogenezi številnih srčno-žilnih bolezni. S tankoplastno kromatografijo smo dokazali, da so v frakcijah poleg antocianov in proantocianidinov prisotne tudi druge spojine, ki jih je potrebno v nadaljevanju raziskave še določiti.

Rezultate našega dela, ki smo ga izvedli na izolirani torakalni aorti podgane, je potrebno preveriti še na drugih živalskih modelih. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno uporabiti prašičje koronarne arterije ali izolirane žile drugih večjih sesalcev, ki so ustrežnejši živalski model za primerjavo s človekom. Potrditev rezultatov pri večjih sesalcih je predpogoj za pričetek kliničnih preizkušanj in potrjevanje novih terapevtskih indikacij posameznih učinkovin, prisotnih v teh frakcijah.

V nadaljnjem raziskovalnem delu bi bilo potrebno pripraviti frakcije s kakšno drugo metodo, s katero bomo sestavine vina bolj ločili med sabo (v več frakcij) in jih bomo na ta način tudi lažje kemijsko identificirali. Z natančnim preučevanjem mehanizmov delovanja teh vazoprotektivnih učinkovin se lahko nadejamo sinteze novih spojin vodnic in kmalu farmakoloških učinkovin tako za preprečevanje kot tudi zdravljenje srčno-žilnih bolezni.

7. LITERATURA

1. Ross, Michael H., *Histology: Text And Atlas*. 4th Ed., Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2003, 329-337
2. Trybus, K.M. Regulation of smooth muscle myosin. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; 18: 81-85.
3. Trybus, K.M., Warshaw, D.M. Regulation of the interaction between smooth muscle myosin and actin. *J Cell Sci Suppl* 1991; 14: 87-89.
4. Rang HP, et al., *The Vascular System, Pharmacology*, D.M. Rang HP, Ritter JM, Moore PK, Editor., Churchill Livingstone: Edinburgh. 2003: 285-305.
5. Vanhoutte, P.M. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J* 2003; 67: 572-575.
6. Luscher, T.F., Noll, G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118 Suppl: S81-90.
7. Dhein, S., et al. Characterization of a peptide endothelium-derived constricting factor EDCF. *Pharmacol Res* 1997; 35: 43-50.
8. Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1-9.
9. de Wit, C., Wolfle, S.E. EDHF and gap junctions: important regulators of vascular tone within the microcirculation. *Curr Pharm Biotechnol* 2007; 8: 11-25.
10. Yanga, Q., Yima, A.P., He, G.W. The significance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human circulation. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5: 85-92.
11. Buchwalow, I.B., et al. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *Faseb J* 2002; 16: 500-508.
12. Busse, R., Fleming, I. Vascular endothelium and blood flow. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 43-78.
13. Wang, L., Feng, G. Nitric oxide and prostacyclin mediate coronary shear force-induced alterations in cardiac electrophysiology. *Med Hypotheses* 2004; 63: 434-437.
14. Fukuda, S., et al. Prostaglandin E1-induced vasorelaxation in porcine coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260: 1128-1132.

15. Quignard, J.F., et al. Role of endothelial cell hyperpolarization in EDHF-mediated responses in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1103-1112.
16. Feletou, M., Vanhoutte, P.M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 525-534.
17. Feletou, M., Vanhoutte, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21: 1-18.
18. Nagao, T., Illiano, S., Vanhoutte, P.M. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol* 1992; 263: H1090-1094.
19. Poredos, P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol* 2002; 21: 109-116.
20. Celermajer, D.S., et al. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1468-1474.
21. Haller, H., Risk factors for cardiovascular disease and the endothelium, *Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities*, B. GVR and S. CJ, Editors., Schattauer: Stuttgart. 1997: 273-286.
22. Milena Suwa Stanojević, Tehnologija vina, Višješolski strokovni program živilstvo in prehrana
23. Andrej Kovačič, Vpliv dodatka enoloških sredstev na antioksidativno stabilnost vina sorte Modri pinot, Diplomsko delo, Biotehnična fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2006
24. Alfredo C Cordova in sod., The Cardiovascular Protective Effect of Red Wine, *Journal of the American College of Surgeons*, Volume 200, Issue 3, 2005, 428-439
25. Handbook of Antioxidants, 2nd Ed., Leslie Packer and Enrique Cadenas, Eds. Marcel Dekker, New York, 2002, 21-36
26. Miklavčič Ana, Priprava in karakterizacija ekstraktov liofiliziranih vin, Diplomsko delo, Biotehnična fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2008
27. James W. E. Rush in sod., Chronic Resveratrol Enhances Endothelium Dependent Relaxation but does not alter eNOS Levels in Aorta of spontaneously hypertensive rats, University of Waterloo, Canada, *Exp Biol Med (Maywood)* 2007, 232: 814-822
28. http://www.tanin.si/podstrani_slo/prehrana/tanivin.php (22.4.2009)

29. Jackson Ron S., Wine science: principles, practice, perception, 2nd Ed., Academic Press, San Diego, 2000, 232-275
30. Patricia M. Aron, Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity, Department of Food Science and Technology, USA, Mol Nutr Food Res, 2008, 52: 79-104
31. http://en.wikipedia.org/wiki/Alcohol_and_cardiovascular_disease (22.4.2009)
32. Mario Dell Agli in sod., Vascular effects of wine polyphenols, Faculty of Pharmacy, Milan, Italy, Cardiovasc Res, 2004, 63: 593-602
33. W. Zenebe, Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxid bioactivity, Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic, Physiol Res, 2003, 52: 425-432
34. J.F. Leikert, Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells, Department of Pharmacy, Munich, Germany, Circulation, 2002, 106: 1614- 1617
35. J.C. Fantinelli, Effects of different fractions of red wine non-alcoholic extract on ischemia-reperfusion injury, Universidad nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina, Life Sci, 2005, 76: 2721-2733
36. Hughes, G.C., et al. Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. J Appl Physiol 2003; 94: 1689-1701.
37. Maggi, C.A. and A. Meli. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. Experientia 1986; 42: 292-297.
38. Ratz, P.H., et al. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calciumsensitizing stimulus. Am J Physiol Cell Physiol 2005; 288: C769-783.
39. Emile Andriambelason in sod., Natural Dietary Polyphenolic compounds cause endothelium dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta, Laboratoire de Pharmacologie, Universite Louis Pasteur de Strasbourg, J Nutr, 1998, 128: 2324-33
40. Markus Flesch in sid., Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries, Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln, Germany, Am J Physiol, 1998, 275: H1183-90

