

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA JANŽEK

**VPLIV NEKATERIH SNOVI IN FRAKCIJ RDEČEGA
VINA NA KRČENJE IZOLIRANE AORTE PODGANE**

**EFFECTS OF CERTAIN SUBSTANCES AND FRACTIONS
OF RED WINE ON ISOLATED RAT AORTA
CONTRACTION**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala v laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete pod mentorstvom prof. dr. Samo Krefta in somentorstvom viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška.

Zahvale

Zahvaljujem se prof. dr. Samo Kreftu, mag. farm. za mentorstvo pri nalogi ter za vzpodbudne in tehtne pripombe ob nastajanju tega dela.

Zahvaljujem se viš. znan. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, univ. dipl. biol., ki mi je omogočil raziskovalno delo v laboratoriju za srčno-žilno farmakologijo, za vse nasvete, tehtne pripombe in vzpodbudo med samim delom.

Zahvaljujem se Mojci Lunder, dr. med., mladi raziskovalki na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, za nasvete in pomoč pri delu.

Zahvaljujem se Mileni Trandafilović, dr. med., in Petri Ponebšek za tehnično pomoč pri delu.

Iskreno se zahvaljujem tudi svoji družini, staršem in prijateljem za podporo, vse lepe trenutke v času študija ter da so me vzpodbujali, mi pomagali in verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

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

Član komisije: doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

Ljubljana, 2011

Martina Janžek

A. Vsebina

A.	Vsebina	iii
B.	Kazalo slik	v
C.	Povzetek	vi
D.	Seznam okrajšav	vii
1.	Uvod	1
1.1.	Zgradba žilne stene	1
1.2.	Mehanizem krčenja in sproščanja gladkomišičnih celic	3
1.3.	Uravnavanje koncentracije kalcija v gladkomišični celici	4
1.4.	Vloga endotelija	6
1.5.	Dušikov oksid in N ω -nitro-L-arginin	6
1.6.	Vino	7
1.7.	Fenolne spojine	9
2.	Namen in hipoteze	14
3.	Uporabljeni materiali in reagenti	15
3.1.	Reagenti uporabljeni pri poskusih na izolirani podganji aorti	15
3.2.	Aparature, pribor in oprema	16
3.3.	Poskusne živali	17
3.4.	Priprava matičnih raztopin	19
4.	Potek dela	21
4.1.	Protokol poskusa	21
4.2.	Kontrolni poskusi za preizkus vpliva topila	27
4.3.	Obdelava podatkov	28

5.	Rezultati	30
5.1.	Kontrolne vrednosti sproščanja predhodno skrčenih izoliranih žilnih obročkov aorte podgane	30
5.2.	Vpliv nekaterih spojin, ki se nahajajo v vinu, na predhodno skrčene izolirane žilne obročke aorte podgane	31
5.3.	Vpliv vinskih frakcij na sprostitutev žilnih obročkov	39
5.4.	Vpliv dealkoholiziranega vina	48
5.5.	Inkubacija z L-NNA	49
6.	Razprava	51
6.1.	Izolirani žilni obročki podganje aorte	51
6.2.	Vpliv polifenolnih spojin in nekaterih snovi iz vina na sprostitutev žilnih obročkov	52
6.3.	Vpliv vinskih frakcij na sprostitutev žilnih obročkov	54
6.4.	Vpliv dealkoholiziranega vina na sproščanje žilnih obročkov	56
6.5.	Vpliv nekaterih snovi izoliranih iz vina na sproščanje žilnih obročkov po predhodni inkubaciji z L-NNA	57
6.6.	Kontrolni poskusi	57
7.	Sklep in načrti za nadaljnje delo	59
8.	Literatura	61

B. Kazalo slik

Slika 1.1.	Zgradba žilne stene	2
Slika 1.2.	Prikaz žilne stene arterije.....	3
Slika 1.3.	Shema regulacije krčenja gladkomišične celice.	4
Slika 1.4.	Regulacija Ca^{2+} v celici	5
Slika 1.5.	Struktura L-NNA	7
Slika 1.6.	Prerez grozdne jagode	9
Slika 1.7.	Osnovni strukturi stilbenov	10
Slika 1.8.	Struktura trans-resveratrola	11
Slika 1.9.	Osnovna struktura flavonoidov	12
Slika 3.1.	Shematski prikaz naprave za poskuse na izoliranih žilah	18
Slika 4.1.	Shematski prikaz poteka poskusa z ohranjenim endotelijem	22
Slika 4.2.	Shematski prikaz poteka poskusa z odstranjenim endotelijem	24
Slika 4.3.	Shematski prikaz poteka poskusa z ohranjenim endotelijem in inkubacijo žilnih obročkov v L-NNA	26
Slika 4.4.	Grafični prikaz vrednosti, ki jih potrebujemo za normalizacijo	29

C. Povzetek

V naši kulturi velja prepričanje o pozitivnih učinkih žlahtne kapljice na naše počutje in zdravje. Vino vsebuje več kot 500 različnih snovi, ki mu dajejo značilne karakteristike. Kakšen pa je dejanski vpliv vina in snovi, ki jih vino vsebuje? Danes so v razvitem svetu srčno-žilne bolezni eden vodilnih vzrokov smrti. S terminom »francoski paradoks« je predstavljena nizka smrtnost Francozov kljub veliki količini maščob v prehrani. Razlog naj bi bilo pitje rdečega vina.

V naši raziskavi smo preverili vpliv vina, vinskih frakcij (vodna, butanolna, etilacetatna, dietiletrna, petroletrna, etanolni ostanek in ostanek po destilaciji) in nekaterih snovi, ki se nahajajo v vinu (resveratrol, 4-etilgvajakol, 2-feniletanol, 3-(2-hidroksietil)indol, 4-alil-2,6-dimetoksifenol in 2,6-dimetoksifenol) ter ugotoviti kakšen je njihov vpliv na predhodno skrčene izolirane žilne obročke podgane.

Uporabili smo obročke torakalne aorte podgane, ki smo jih namestili v kivete, napolnjene z oksigenirano raztopino po Krebs-Henseleitu. Naše poskuse smo razdelili v tri skupine: poskusi, kjer so imeli izolirani žilni obročki ohranjen endotelij; poskusi, kjer so imeli žilni obročki odstranjen endotelij; in poskusi, kjer smo žilne obročke z ohranjenim endotelijem predhodno inkubirali v N ω -nitro-L-argininu (L-NNA) in tako zavrli tvorbo dušikovega oksida (NO). S pomočjo izometričnega elektromehanskega pretvornika smo merili skrčenje po dodatku izbranega vazokonstriktorja ter nato sprostitev po kumulativnem dodajanju preiskovanih snovi in vinskih frakcij.

Rezultati kažejo, da se žilni obročki z ohranjenim endotelijem najbolj sproščajo po dodajanju 2-feniletanola, 4-etilgvajakola in resveratrola. Vino na sproščanje ni imelo vpliva. Izmed vinskih frakcij etilacetatna in vodna frakcija najbolj sproščata žilne obročke, butanolna frakcija pa jih še dodatno krči. Po predhodni inkubaciji žilnih obročkov v L-NNA je dodajanje preiskovanih snovi povzročilo dodatno krčenje. Preiskovane snovi na žilne obročke z odstranjenim endotelijem niso imele vpliva.

Z raziskavo smo potrdili, da nekatere sestavine vina blagodejno vplivajo na krvožilni sistem.

D. Seznam okrajšav

cAMP	ciklični adenzin monofosfat
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
DAG	diacil glicerol
DMSO	dimetilsulfoksid
ET-1	endotelin-1
ETA/B	endotelinski A (ali B) receptorji
IP ₃	inozitol-3-fosfat
K-H raztopina	Krebs-Henseleit puferska raztopina
L-NNA	N ω -nitro-L-arginin
MLCK	kinaza lahke verige miozina (<i>Myosine Light Chain Kinase</i>)
Phy	fenilefrin (<i>Phenylephrine</i>)
PIP ₂	fosfatidilinozitol difosfat
PKA	protein kinaza
PKG	proteinska kinaza odvisna od cGMP
SEM	standardna napaka ocene aritmetične sredine (<i>Standard error of the mean</i>)
SR	sarkoplazmatski retikulum

1. Uvod

Osnovna funkcija krvožilnega sistema je oskrba telesa, to je tkiv in celic, s hranili, kisikom ter odstranjevanje metabolitov in produktov celic. Krvožilni sistem tako vzdržuje primerno okolje za optimalno delovanje organizma. Krvne žile so poleg srca in krvi, ki predstavljata še ostali dve večji komponenti krvožilnega sistema, izjemno pomembne za preživetje organizma, zato je njihovo delovanje zelo natančno uravnavano. Krčenje in sproščanje žilnih sten je eden izmed ključnih mehanizmov s katerim krvne žile izpolnjujejo svoje poslanstvo (1).

Po podatkih statističnega urada Republike Slovenije smo se Slovenci v letu 2008 strogo držali pravila »Kozarec vina po kosilu za zdravo srce«, saj smo v povprečju spili 1 dl vina na dan (2). Povprečno zaužita količina žlahtne kapljice pa ne odraža dejstva, da nekateri to mejo močno presežejo. Del učinkov uživanja vina bi morda lahko dosegli že s kozarcem grozdnega soka in se s tem izognili dokazano negativnim vplivom prekomerne količine alkohola na možgane, ledvica, jetra, živčni sistem, žile in srce.

Glede na to, da smo Evropejci v svetovnem vrhu po porabi vina, Slovenci pa pridno sledimo evropskemu povprečju, smo se v naši raziskavi odločili preizkusiti vpliv nekaterih snovi in frakcij iz vina na krčenje oz. sproščanje izolirane aorte podgane (3).

1.1. Zgradba žilne stene

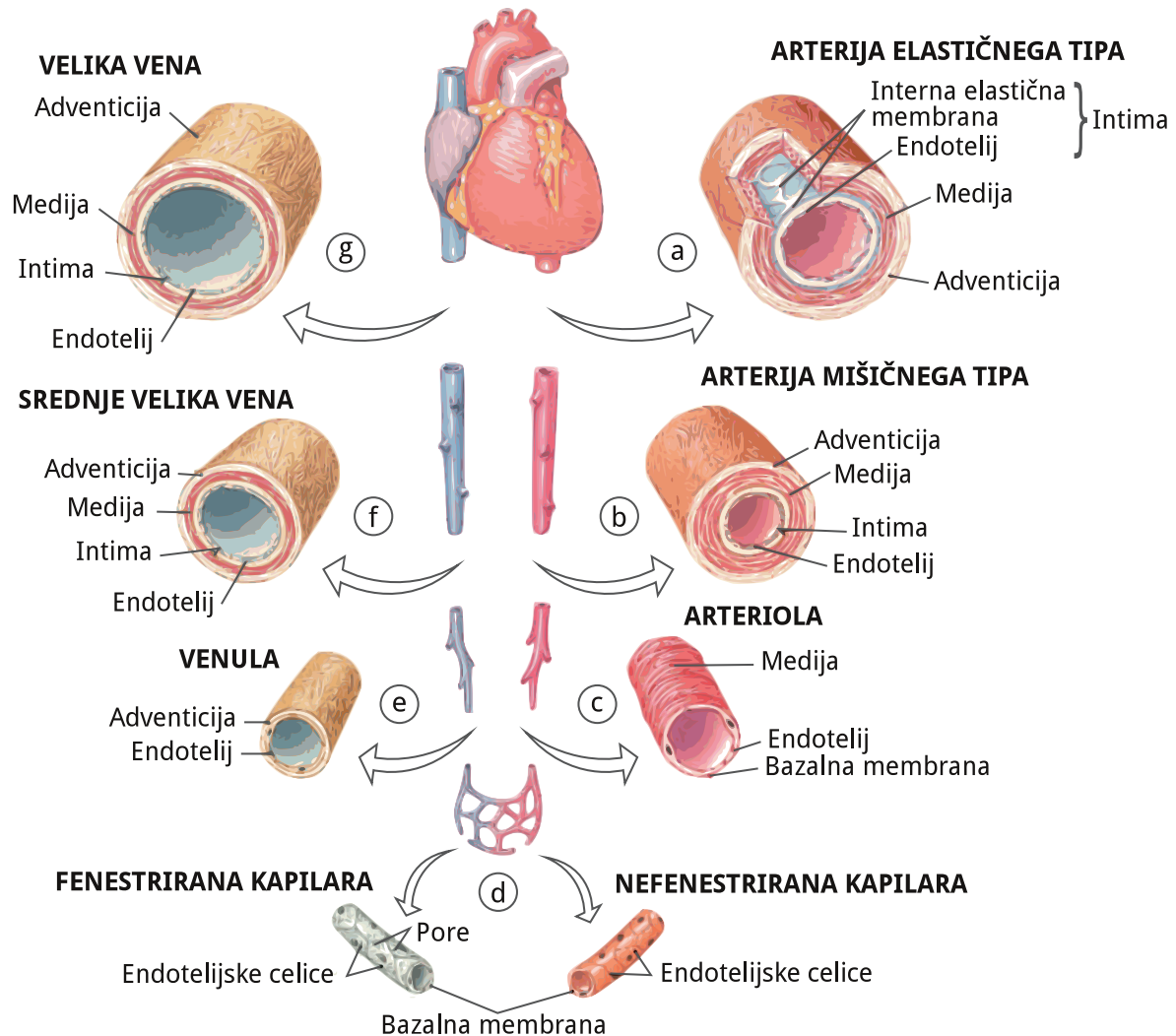
Ožilje je sestavljeno iz arterij (elastičnega tipa, mišičnega tipa, arteriol), kapilar (nefenestriranih, fenestriranih, sinusoidov) in ven (velikih, srednjih, venul). Različni tipi žil se med seboj razlikujejo po zgradbi žilne stene in po funkciji, ki jo opravljajo.

Žilno steno sestavljajo od lumna proti zunanosti žile:

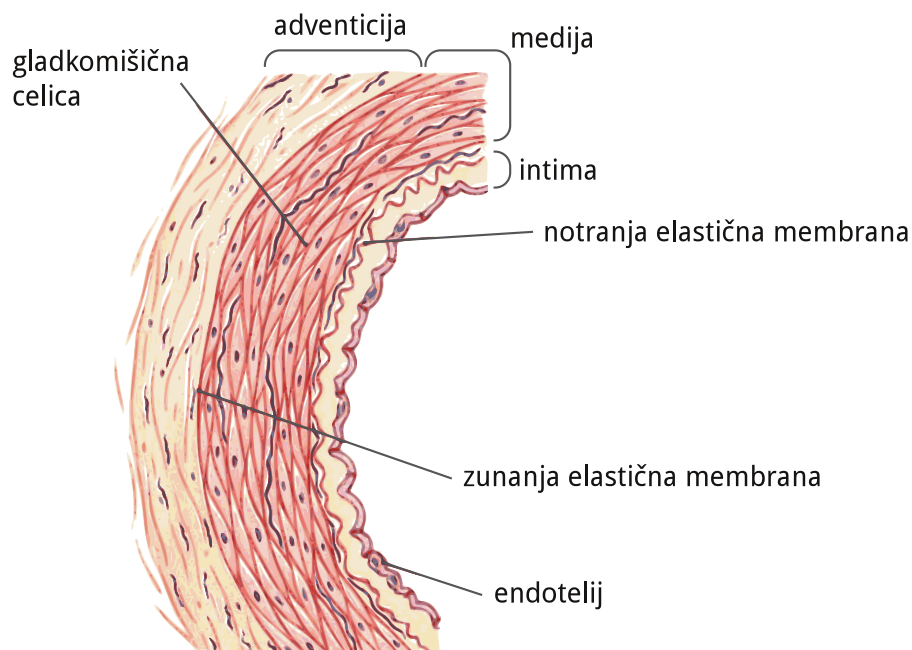
- Intima, ki predstavlja notranji sloj žilne stene. Sestavljena je iz enojne plasti endotelijskih celic, bazalne lamine in nekaj podpornega vezivnega tkiva (4).
- Medija, ki je zgrajena iz slojev mišičnih vlaken, med katera se vrivajo elastična, kolagenska in retikularna vlakna, proteoglikani in glikoproteini (4).

- Adventicija, ki je zunanja plast žilne stene in pritrjuje žilo na sosednje strukture. Sestavljena je iz kolagenskih in elastičnih vlaken ter živčnih končičev avtonomnega živčnega sistema. Večje žile imajo v adventiciji prisotne tudi manjše žile, ki zagotavljajo prehrano žilni steni (5).

Razlike v zgradbi žilne stene pri posameznih vrstah žil so prikazane na sliki 1.1.



Slika 1.1. Zgradba žilne stene (prirejeno po 6). a — Medija arterij elastičnega tipa vsebuje več elastičnih vlaken, ki omogočajo večje raztezanje žile in blaženje tlačnih razlik. b — Medija arterij mišičnega tipa vsebuje velik delež gladkomišičnih celic in je pod nadzorom avtonomnega živčevja. c — Arteriole so precej manjše od arterij mišičnega tipa in skoraj nimajo adventicije. d — Kapilare so zgrajene iz endotelija in bazalne lamine. e — Venule so podobne kapilaram in nimajo medije. f — Srednje velike vene imajo vse tri plasti stene, medija pa je izredno tanka. g — Velike vene so zgrajene podobno kot srednje velike vene z malo debelejšo medijo.



Slika 1.2. Prikaz žilne stene arterije (prirejeno po 6).

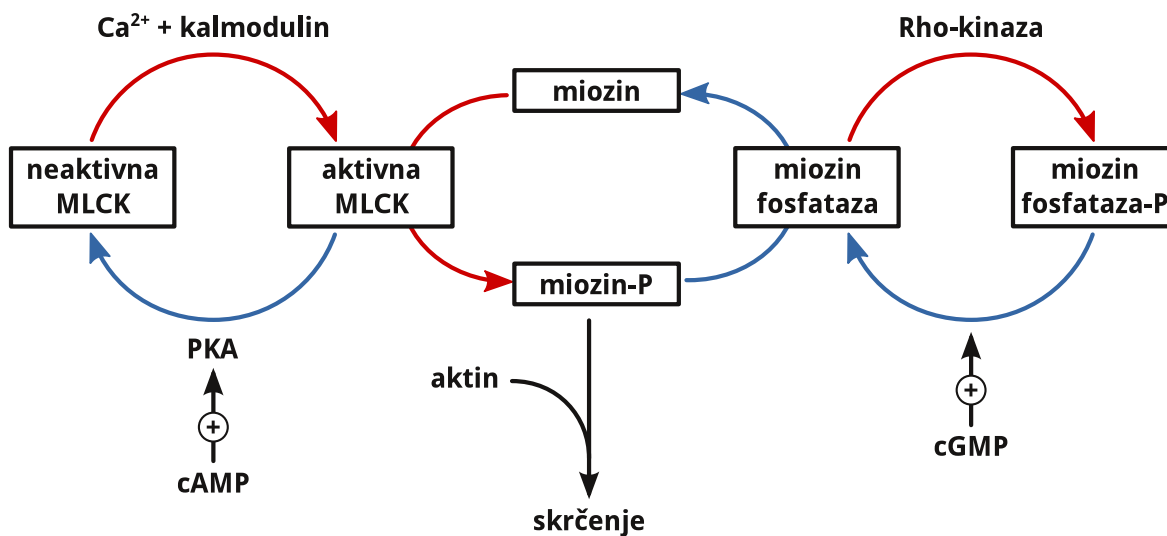
1.2. Mehanizem krčenja in sproščanja gladkomišičnih celic

Gladkomišične celice vzdržujejo tonus žil, ki se spreminja pod vplivom avtonomnega živčevja, hormonov in lokalno prisotnih vazoaktivnih snovi (7). Osnova krčenja gladkomišične celice je interakcija med aktinom in fosforilirano lahko verigo miozina.

Skrčitev je posledica povečanja koncentracije kalcijevih ionov (Ca^{2+}) v citoplazmi gladkomišičnih celic ali pa povečane občutljivosti znotrajceličnih struktur zanje. Ca^{2+} s kalmodulinom tvori kompleks, ki aktivira kinazo lahke verige miozina (MLCK). Ta fosforilira regulatorno enoto lahke verige miozina in tako omogoči interakcijo miozina z aktinom. Nastanejo prečni aktinsko-miozinski mostički in gladka mišica se skrči (8, 9).

Gladkomišična celica se sprosti, ko se lahke verige miozina defosforilirajo. Do defosforilacije prihaja spontano, encim miozin fosfataza pa defosforilacijo pospeši. Sprostitev gladkomišične celice je tako odvisna od zmanjšanja aktivnosti MLCK in delovanja miozin fosfataze. Regulacija aktivnosti MLCK in miozin fosfataze predstavlja kompleksen proces, ki nadzoruje krčenje in sproščanje gladkomišične celice (1).

Sprostitev gladkomišične celice povzročajo snovi, ki preprečijo vstop Ca^{2+} v celico preko napetostno odvisnih Ca^{2+} -kanalov ali pa indirektno s hiperpolarizacijo membrane. Do sproščanja gladkomišičnih celic pa pride tudi ob povečani koncentraciji adenozin-3',5'-monofosfata (cAMP) in gvanozin-3',5'-monofosfata (cGMP) v celici. Povečana koncentracija cAMP v celici aktivira protein kinazo (PKA), ki inaktivira MLCK in tako poveča izhajanje Ca^{2+} iz celice. Povišana koncentracija cGMP pa aktivira proteinsko kinazo odvisna od cGMP (PKG), ki zavira sproščanje Ca^{2+} iz sarkoplazmatskega retikuluma (SR) (1).

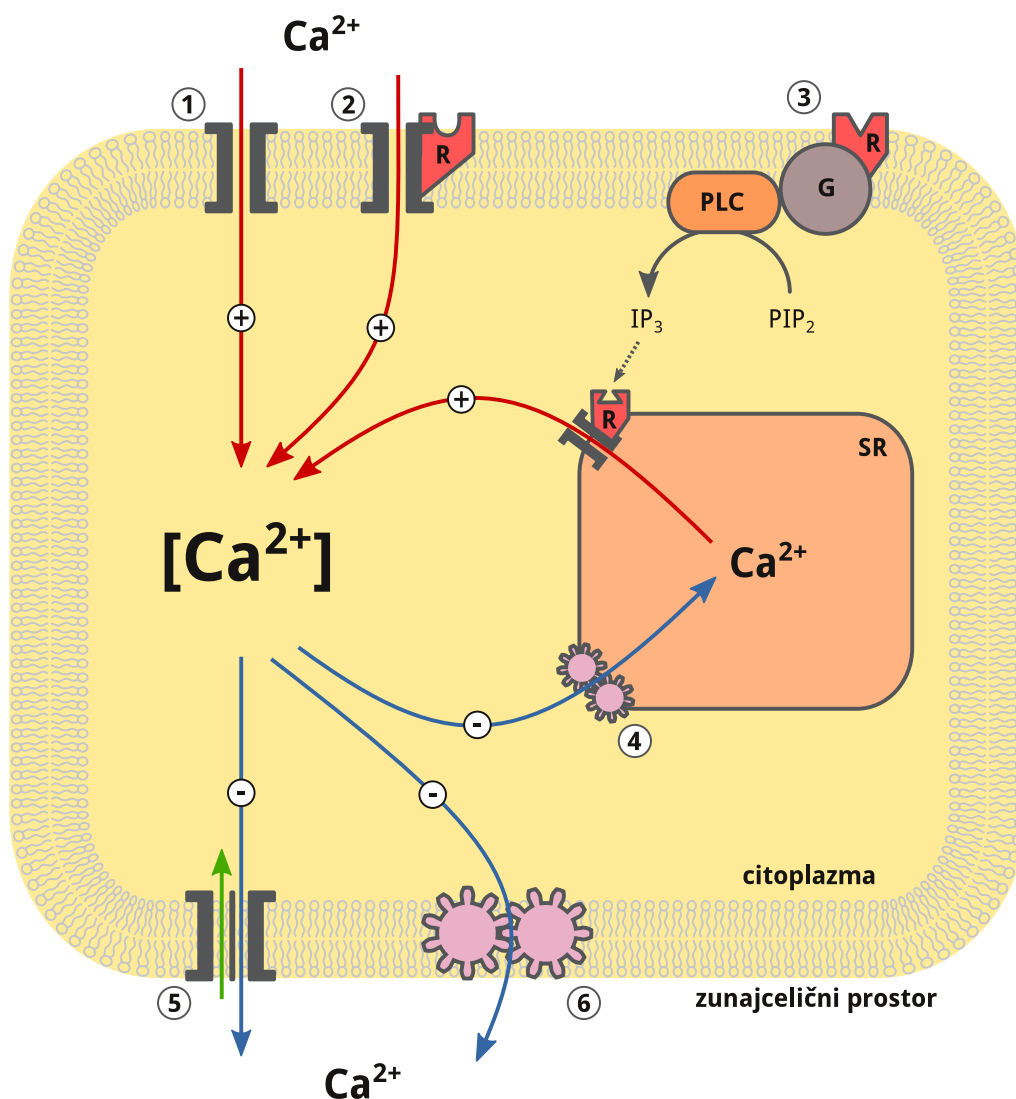


Slika 1.3. Shema regulacije krčenja gladkomišične celice. Ca^{2+} ioni s kalmodulinom tvorijo kompleks, ki aktivira MLCK. MLCK fosforilira enoto lahke verige miozina. Miozin in aktin tvorita prečne mostičke in gladka mišica se skrči. Aktivno obliko MLCK v neaktivno vrača PKA, ki jo aktivira povišanje koncentracije cAMP. Miozin fosfataza defosforilira lahke verige miozina. Rho-kinaza inaktivira miozin fosfatazo in tako viša nivo fosforilirane lahke verige miozina v celici. (cAMP - adenozin-3',5'-monofosfat, cGMP - gvanozin-3',5'-monofosfat, MLCK - kinaza lahke verige miozina)

1.3. Uravnavanje koncentracije kalcija v gladkomišični celici

Kalcij doteka v citosol gladkomišične celice iz dveh virov. Preko celične membrane vstopa kalcij v celico (zunajcelični vir kalcija), znotraj celice pa je skladiščen v sarkoplazmatskem retikulumu. Za razliko od skeletne mišice, ki za krčenje ne potrebuje kalcija iz zunajceličnega izvora, pa je ta izredno pomemben za krčenje gladkomišične celice.

Preko kalcijevih kanalov, ki so receptorsko ali napetostno odvisni, vstopa kalcij v celico iz zunajceličnega prostora. Aktivacija receptorsko reguliranih kanalov lahko povzroči depolarizacijo in tako vpliva na odpiranje napetostno odvisnih kanalov. Kalcij se vrača v zunajcelični prostor preko Ca^{2+} -ATPaze in $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ izmenjevalca na membrani (1).



Slika 1.4. Regulacija Ca^{2+} v celici. 1 – Napetostno odvisen Ca^{2+} -kanal skozi katerega vstopa Ca^{2+} v celico. 2 – Receptorsko odvisen Ca^{2+} -kanal, ki se ob vezavi agonista odpre in omogoči vstop Ca^{2+} v notranjost celice. 3 – Membranski receptor povezan z G-proteinom. Ob vezavi agonistov aktivira fosfolipazo C in posredno poveča koncentracijo Ca^{2+} v celici. 4 – Ca^{2+} -ATPaza v membrani sarkoplazmatskega retikuluma vrača Ca^{2+} iz citosola v sarkoplazmatski retikulum. 5 – $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ izmenjevalec v membrani celice izloča Ca^{2+} iz celice. 6 – Ca^{2+} -ATPaza v membrani celice vrača Ca^{2+} v zunajcelični prostor. (G – G protein, IP_3 – inozitol-3-fosfat, PIP_2 – fosfatidilinozitol difosfat, PLC – fosfolipaza C, R – receptor, SR – sarkoplazmatski retikulum)

Sprostitev kalcija iz SR se začne z vezavo agonistov (endotelin, noradrenalin, angiotenzin II ...) na membranski receptor, ki je povezan z G-proteinom. To aktivira fosfolipazo C (PLC), ki hidrolizira fosfatidilinozitol difosfat (PIP_2) v inozitol-3-fosfat (IP_3) in diacilglicerol. IP_3 se veže na receptorje na SR in kalcij se izloči skozi posebne kalcijeve kanale (10). Ca^{2+} -ATPaza SR prenaša kalcij nazaj v SR in tako veča znotrajcelične zaloge Ca^{2+} (11).

1.4. Vloga endotelija

Žilni endotelij je vir mnogih kemijskih mediatorjev in deluje kot dinamična pregrada med plazmo in zunajcelično tekočino. Predstavlja selektivno prepustno oviro, izloča vazoaktivne snovi in vsebuje številne receptorje za snovi, ki vplivajo na tonus žile. Aktivno se odziva na spremembe v parcialnem tlaku kisika (O_2) in ogljikovega dioksida (CO_2) ter na hemodinamske spremembe (strižne sile). Endotelij uravnava upornost žil in vpliva na krvni tlak ter pretok krvi skozi tkiva. V fizioloških pogojih tako vzdržuje ravnotežje med sproščanjem (dušikov oksid, prostaciklini in drugi vazodilatatorji) in krčenjem (endotelin in ostali vazokonstriktorji) žil (12). Porušenje žilne homeostaze povzroči nagnjenje k povečanemu krčenju žil, vezavi levkocitov na žilno steno, aktivaciji trombocitov, mitogenezi gladkomišičnih celic, vnetju in remodeliranju krvnih žil ter nastanku ateroskleroze (13).

Endotelijska disfunkcija predstavlja motnjo v delovanju endotelija, ki privede do porušenja med vazodilatornim in vazokonstriktornim delovanjem (14). Nesposobnost razširitve žil in povečanje pretoka v njej po fizioloških in farmakoloških dražljajih je verjetno najzgodnejša motnja v delovanju endotelijskih celic (15). Pri določenih stanjih kot so sladkorna bolezen, ateroskleroza, povišan krvni tlak (hipertenzija), povišana količina maščob v krvi (hiperlipidemija) ter pri kajenju, se zmanjša tvorba dušikovega oksida in poveča tvorba snovi, ki krčijo gladkomišične celice (16).

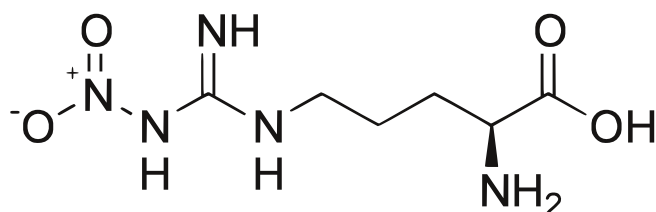
1.5. Dušikov oksid in $N\omega$ -nitro-L-arginin

NO ima na krvožilni sistem več učinkov: deluje kot vazodilatator, inhibira vezavo trombocitov in levkocitov na žilni endotelij ter zavira hiperplazijo gladkomišičnih celic (17).

NO nastaja v endotelijskih celicah pod vplivom NO-sintaze iz aminokisline L-arginina. Iz endotelijske celice nato prehaja v gladkomišično celico, kjer aktivira gvanilciklazo, ki poveča proizvodnjo cGMP (17). Povišana koncentracija cGMP prek večih mehanizmov povzroči sproščanje gladkomišične celice:

1. aktivira PKG,
2. zavira vstop Ca^{2+} v celico in zmanjšuje njegovo znotrajcelično koncentracijo,
3. aktivira K^+ kanale, kar vodi do hiperpolarizacije in sproščanja.

L-NNA je nitro derivat aminokisline arginin (slika 1.5). Deluje kot zaviralec encima NO-sintaze in ga uporabljajo kot biokemijsko orodje pri raziskavah učinkov NO.



Slika 1.5. Struktura L-NNA (18).

1.6. Vino

Vino že stoletja velja za pijačo, ki pri zmernem uživanju ob hrani blagodejno vpliva na človeški organizem (19, 20). Grozd je v Mezopotamiji predstavljal simbol zdravja in življenjske moči. Vinogradništvo je bilo zelo razvito v antični dobi, pravi razcvet pa je doživelo v srednjem veku s povečanjem cerkvene oblasti. Ti so pridelovali vino tudi za verske obrede. V 19. stoletju se je začela sistematična pridelava vina, ki vključuje izbor sort, vzgojnih oblik in tehnike kletarjenja (21, 22). Danes je gojenju vinske trte namenjenih 72.500 kvadratnih kilometrov po celem svetu oz. približno toliko, kot je velika Republika Irska (3). Vedno večji poudarek pa je na kakovosti vina in ne samo na njegovi pridelani količini.

1.6.1. Sestava vina

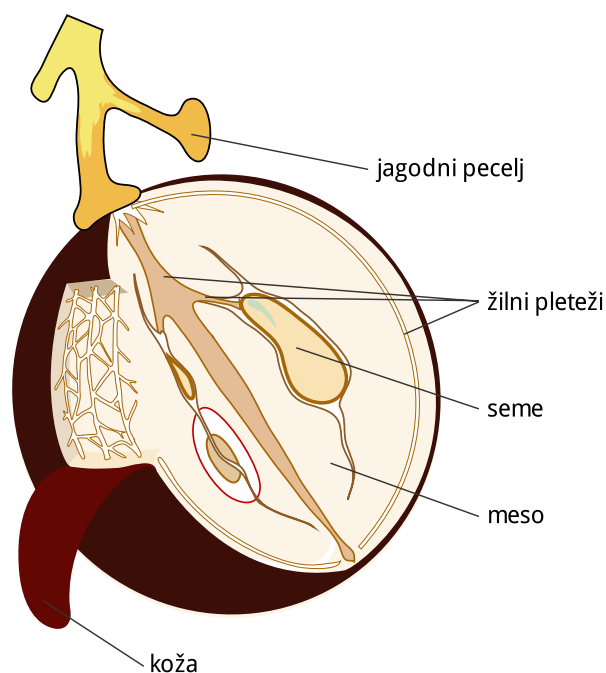
Vino pridobivamo s kontroliranim alkoholnim vrenjem iz grozdja plemenite vinske trte *Vitis vinifera*. Vsebuje več kot 500 različnih spojin, a le nekatere v količini večji od 100 mg/l: voda, etanol, glicerol, sladkorji in organske kisline. V manjših količinah pa so prisotne aromatične snovi, polifenoli, vitamini, mineralne snovi in dušikove spojine. Na sestavo in kakovost vina vpliva sorta vinske trte, geografsko poreklo, mikroklima, sestava tal in način pridelave grozdja (23).

1.6.2. Pridelava vina

Predelava grozdja v vino se imenuje vinifikacija in poteka v več stopnjah: trgateg, maceracija in fermentacija. Za trgateg je najpomembnejša zrelost grozdnih jagod. To spremljamo z merjenjem zmanjšane količine kisline in povečanjem sladkorja v grozdni jagodi. Maceracija je postopek, kjer pustimo grozdno brozgo stati povprečno 3–6 dni in jo izvajamo večinoma pri pridelavi rdečega vina. Največ lahko vplivamo na kakovost vina v postopku maceracije. V tej fazi prihaja do številnih procesov kot so: razkroj antocianov in drugih fenolnih snovi, reakcija med polifenoli in ostalimi celičnimi sestavinami grozdja, vključitev antocianov v tekoči del grozdnih jagod ter modifikacija barvnih snovi zaradi oksidoreduktivnih reakcij in polimerizacije. Temu pa sledi fermentacija oz. alkoholno vrenje (predelava sladkorja v etanol). Tako dobimo mlado vino, ki ga po potrebi še žveplamo in čistimo. Vino nato miruje in v sodih ali steklenicah zori (24, 25, 26).

1.6.3. Sestava grozdja

Grozdje sestavljajo grozdni in jagodni pecelj ter grozdne jagode, v katerih je grozdno meso in sok, jagodna kožica in pečka (slika 1.6). Grozdno meso vsebuje največ vode in sladkorja, kožica in pečka pa aromatične in polifenolne snovi (26).



Slika 1.6. Prerez grozdne jagode (prirejeno po 27).

1.7. Fenolne spojine

Fenolne spojine so vse spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in nanj vezanih eno ali več hidroksilnih (OH) skupin. Običajno je pri naravnih fenolih na glavno molekulo vezanih več OH skupin in tako se je uveljavilo splošno poimenovanje polifenoli (28).

Polifenoli so zelo močni antioksidanti, ki jih najdemo v nekaterih delih posameznih rastlin (29). Kemijsko jih karakteriziramo po prisotnosti večjega števila fenolnih enot, ki sestavljajo molekulo. Spojine, ki jih tako uvrščamo med polifenole, imajo značilne biološke, kemijske in fizikalne lastnosti. Rastline jih proizvajajo tudi kot odgovor na poškodbo, stres, glivično okužbo ali ultravijolično (UV) sevanje (30).

V raziskavah so bili potrjeni številni ugodni učinki polifenolov na zdravje ljudi. Spojine varujejo naš organizem pred oksidacijskim stresom ter pred radikali, delujejo protivnetno in blago protimikrobno. Zavirajo zlepljanje trombocitov in peroksidacijo maščob (31, 32). Tako bi naj upočasnili nastajanje ateroskleroze in preprečevali srčno-žilne bolezni, ki so glavni vzrok smrti v današnjem zahodnem svetu (33, 34). Prav tako varujejo genetski material celice pred poškodbo, spodbujajo odpornost in izboljšajo elastičnost žil.

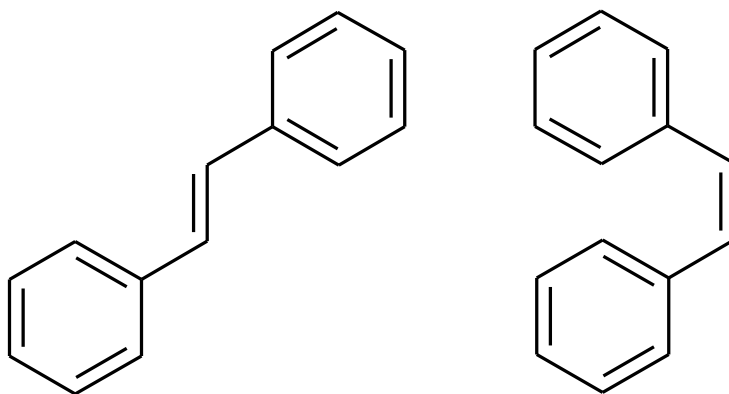
Polifenolne spojine delimo na neflavonoide in flavonoide (35, 36).

1.7.1. Neflavonoidi

Med neflavonoide uvrščamo stilbene, derivate hidroksicimetne kisline in derivate hidroksibenzojske kisline (35). Najbolj raziskana spojina, ki jo uvrščamo med neflavonoide je resveratrol.

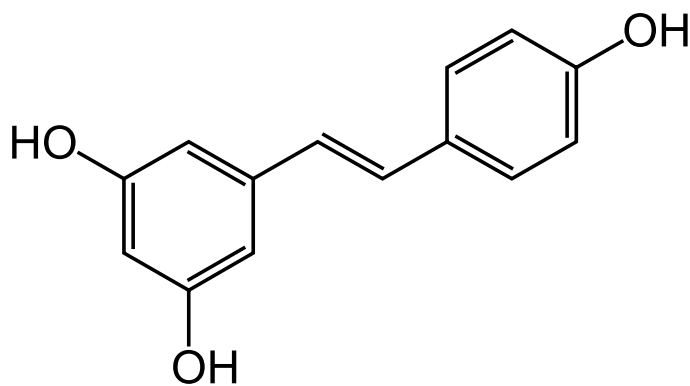
Stilbeni

Stilbeni so skupina fenolnih spojin, ki imajo osnovno molekulsko strukturo $C_6C_2C_6$ (slika 1.7). Glavni predstavnik je resveratrol (slika 1.8) (37). Nahaja se v grozdju, rdečem vinu, arašidih in v jagodah Vaccinum vrst, vključno z borovnicami in brusnicami (38, 39, 40). Resveratrol bi naj bil odgovoren za »francoski paradoks«¹ in kljub temu, da ta fenomen ni potrjen (razlike v načinu življenja ljudi so velike in samo pitje rdečega vina ni razlog za manjšo pojavnost srčno-žilnih bolezni), je postal v zadnjih letih predmet številnih raziskav (42).



Slika 1.7. Osnovni strukturi stilbenov (trans in cis oblika) (43).

1 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 (41).



Slika 1.8. Struktura trans-resveratrola (44).

Preglednica 1.1. Skupna količina resveratrola v nekaterih izbranih živilih (38, 39, 40).

živilo	količina živila	skupna količina resveratrola (mg)
surovi arašidi	1 skodelica (146 g)	0,01 – 0,26
kuhani arašidi	1 skodelica (180 g)	0,32 – 1,28
rdeče grozdje	1 skodelica (160 g)	0,24 – 1,25
sok iz rdečega grozdja	1 kozarec (250 ml)	0,17 – 1,30

V vinu se nahaja v štirih različnih oblikah: cis in trans resveratrol ter cis in trans glukozid resveratrola (45). Nahaja se samo v jagodni kožici, zato se njegova količina med maceracijo hitro povečuje in v rdečih vinih doseže koncentracije do 30 mg/l (46, 47).

Resveratrol ima in vitro (poskusi na različnih celičnih linijah) veliko zaščitnih učinkov na srce in ožilje. Zavira zlepljanje trombocitov, spodbuja vazodilatacijo s povečanjem proizvodnje dušikovega oksida in inhibira encime, ki so vključeni v procese vnetja (31, 48, 49, 50). Nevtralizira radikale ter inducira apoptozo v številnih rakavih celičnih linijah (51). Zanimivo je, da lahko deluje kot agonist in antagonist estrogena (52). V kulturah rakastih celic dojk je v odsotnosti naravnega estrogena (17 β -estradiol) deloval kot agonist (53, 54). Ko pa je bil estrogen prisoten, pa je resveratrol prevzel vlogo antagonist (54, 55).

Koncentracije resveratrola so v teh raziskavah višje, kot so bile izmerjene v plazmi ljudi po zaužitju večjih količin resveratrola. Večina resveratrola, ki ga zaužijemo, zapade metabolizmu prvega prehoda (56, 57). Količina, ki prehaja v kri, je tako majhna, da težko izkoristi ves svoj potencial (58). Resveratrol prav tako zavira aktivnost encima citokroma P450 3A4 in vitro (30). Tako bi lahko visoki odmerki resveratrola povečali delovanje, hkrati pa tudi toksičnost zdravilnih učinkovin, ki imajo velik delež metabolizma preko prvega

prehoda. Med te uvrščamo statine, antagoniste Ca^{2+} -kanalov, antiaritmike, imunosupresive, antihistaminike, benzodiazepine in učinkovine za zdravljenje erektilne disfunkcije (59, 60).

Derivati hidroksibenzojske kisline

Najpomembnejši predstavniki so galna, vanilijeva in siringinska kislina. V rdečih vinih je njihova koncentracija okrog 80 mg/l, v belih pa dosežejo le koncentracijo do 10 mg/l (36).

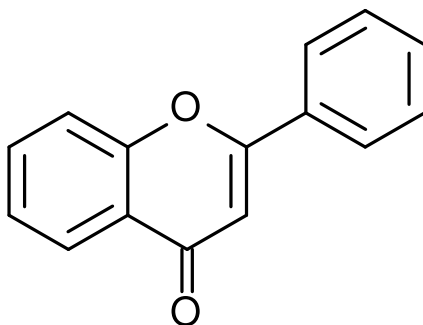
Derivati hidroksicimetne kisline

So glavni fenoli v grozdnem soku tako pri belih kot rdečih vinih. V rdečem vinu je koncentracija med 20 in 120 mg/l, pri belih vinih pa dosežejo do 60 mg/l. Najpogostejše kisline, ki so prisotne v vinu so kutarna, kaftarna in fertarna kislina (36).

1.7.2. Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine sestavljene iz 15-C atomov z osnovno formulo $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$, ki jo imenujemo flavan oz. 2-fenilbenzopiran. V rastlinah so to predvsem rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev in lubja. Flavonoidi naj bi imeli protivnetni, antialergijski, antivirusni, antikancerogeni in antimikrobni učinek (61, 62, 63).

Flavonoidi predstavljajo v rdečih vinih več kot 85 % vseh polifenolnih spojin, v belih vinih pa je ta delež okrog 20 %. Nahajajo se predvsem v trdih delih grozdne jagode, njihove koncentracije v vinu pa so zelo nizke. Med flavonoide uvrščamo flavonole, flavan-3-ole, proantocianidine in antociane (64).



Slika 1.9. Osnovna struktura flavonoidov (65).

Flavan-3-oli

So najpomembnejši fenoli v rdečih vinih. Nahajajo se v trdih delih grozdne jagode, njihova količina v vinu pa je majhna. V rdečem vinu je količina flavan-3-olov večja kot v belem vinu zaradi načina pridelave rdečega vina, ki vključuje maceracijo (66).

Proantocianidini

Vino vsebuje veliko število oligomernih procianidinov, ki so glavni vazoaktivni polifenoli v rdečem vinu. Testirali so 165 vrst vina iz različnih predelov Evrope. V rdečih vinih v južnem delu Francije je bila njihova količina največja. Zavirajo proizvodnjo endotelina 1 (ET-1) ter imajo antioksidativno delovanje (67).

Antocianidini

So barvila, ki so odgovorna za rdečo barvo vin. Koncentracija skupnih antocianidinov se giblje med 40 in 1300 mg/l in je odvisna od sorte. Ugotovili so, da antocianidini optimizirajo proizvodnjo NO v endoteliju arterij, jih sproščajo ter tako omogočajo boljši pretok krvi in nižji krvni tlak (66).

Flavonoli

V grozdju jih najdemo v grozdni kožici in peclju. V mladih rdečih vinih je koncentracija flavonolov okrog 50 mg/l. Pri starejših vinih pa se količina snovi zmanjša zaradi vezave spojin na tanine in doseže vrednosti okrog 10 mg/l (66).

2. Namen in hipoteze

Vino je že dolgo znano kot pijača, katerega sestavine po številnih novejših raziskavah ugodno vplivajo na srce, zdravje ter splošno dobro počutje, vendar le ob zmernem uživanju. Tako je vino postalo predmet raziskav, kjer razčlenjujejo njegovo sestavo in ocenjujejo delovanje in aktivnost posameznih snovi.

Namen našega dela je ovrednotiti vpliv nekaterih snovi, ki se nahajajo v vinu, in nekaterih vinskih frakcij na odzivnost žilnih obročkov izolirane podganje aorte.

Primerjali bomo vpliv preiskovanih snovi na žile z ohranjenim in odstranjenim endotelijem pri uporabi dveh snovi za predhodno krčenje žil: KCl, ki deluje neposredno na gladkomišične celice, in fenilefrina, ki deluje preko vezave na membranske receptorje in aktivacije G-proteinov.

Naše delovne hipoteze so:

- vino bo sproščalo predhodno skrčene izolirane žilne obročke tako s KCl kot s fenilefrinom skrčeni žili;
- nekatere snovi, ki se nahajajo v vinu, bodo sproščale predhodno skrčene žilne obročke preko žilnega endotelija;
- vinske frakcije bodo imele različen vpliv na predhodno skrčene žilne obročke glede na prisotnost oz. odsotnost žilnega endotelija;
- polarne vinske frakcije bodo bolj sproščale predhodno skrčene žilne obročke z ohranjenim endotelijem;
- po predhodni inkubaciji žilnih obročkov z ohranjenim endotelijem v L-NNA preiskovane snovi iz vina na sproščanje ne bodo vplivale.

3. Uporabljeni materiali in reagenti

Naše delo je obsegalo pripravo matičnih raztopin spojin, izolacijo torakalne aorte podgane in merjenje spremembe izometrične sile na žilnih obročkih.

3.1. Reagenti uporabljeni pri poskusih na izolirani podgani aorti

Acetilholin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA; $M = 181,7 \text{ g/mol}$). Matična raztopina ima koncentracijo 10 mmol/l .

Fenilefrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA; $M = 167,2 \text{ g/mol}$) je selektiven agonist na adrenergičnih receptorjih α_1 . Veže se na adrenergične receptorje in tako viša krvni tlak. Koncentracija v matični raztopini je bila 1 mmol/l .

Heparin (Heparin®, Krka, Novo mesto, Slovenija) se uporablja kot antikoagulant. V viali je 5 mL raztopine za injiciranje, ki vsebuje 25000 i.e. heparina v obliki natrijeve soli. Živalim smo vbrizgali heparin intraperitonealno pred izolacijo aorte v odmerku $0,4 \text{ ml/žival}$ (približno $1000 \text{ i.e.} / 100 \text{ g}$ telesne mase živali).

Karbogen (plinska mešanica $95 \% \text{ O}_2$ in $5 \% \text{ CO}_2$; jeklenke polni Messer, Slovenija) smo uporabili za prepihanje raztopine K-H v kivetah.

KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija; $M = 74,56 \text{ g/mol}$). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 3 mol/l .

Modificirana raztopina po Krebs-Henseleitu (K-H raztopina) vsebuje:

- 118 mmol/l NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- $4,7 \text{ mmol/l KCl}$ (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- $1,2 \text{ mmol/l MgSO}_4$ (Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija);
- $1,2 \text{ mmol/l KH}_2\text{PO}_4$ (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- $25 \text{ mmol/l NaHCO}_3$ (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).

L-NNA (N ω -nitro-L-arginin), (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija) je inhibitor NO-sintaze. Deluje kot vazokonstriktor. Koncentracija v matični raztopini je bila 36 mmol/l.

Uretan (etil karbamat) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija, M = 89,09 g/mol): je anestetik, ki se uporablja za terminalno anestezijo. Pripravili smo matično raztopino koncentracije 2,24 mol/l (20 g uretana/100 ml). Za anestezijo smo uporabili 0,65 ml raztopine na 100 g telesne teže živali.

Vse matične raztopine smo pripravili v bidestilirani vodi in jih redčili do koncentracij, ki so navedene pri posameznih reagentih.

3.2. Aparature, pribor in oprema

Shranjevanje vzorcev:

- hladilnik, +4 °C Gorenje (Velenje, Slovenija)
- zmrzovalnik, -20 °C Gorenje (Velenje, Slovenija)

Tehtanje:

- analizna tehtnica KERN ALS 120-4, Kern&Son GmbH (Balingen, Nemčija)

Raztapljanje:

- polavtomatske pipete, Biohit (Helsinki, Finska)
- bučke 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml
- ultrazvočna kadička SONIS 2 GT, Iskra PIO, d.o.o. (Šentjernej, Slovenija)

Izolacija torakalne aorte:

- | | |
|------------------------------|--------------|
| • škarje | • čaša 20 ml |
| • pinceta (majhna in velika) | • pean |

3.3. Poskusne živali

Za poskuse smo uporabili podgane linije Wistar, vzrejene na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo. Tehtale so od 230–350 g in bile stare od 3–6 mesecev. Živali so bile hranjene s peleti (Krka, Novo mesto, Slovenija), ki so standardna prehrana za podgane. Ves čas so imele na razpolago vodo, dnevno nočni ritem pa je bil ustvarjen z menjavanjem svetlobe in teme vsakih 12 ur. Temperatura okolja v katerem so bivale je bila konstantna (24 ± 1 °C). Poskuse smo opravili v času od septembra do novembra med 7 in 16 uro.

3.3.1. Izolirana podganja aorta

Anestezijo smo izvedli z uretanom (0,65 ml/100 g telesne teže podgane), ki smo ga injicirali intraperitonealno. Za preprečitev strjevanja krvi smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin (1000 i.e./100 g telesne teže podgane). Ko so bile živali v globoki anesteziji, smo pričeli z izolacijo.

Trebušno steno smo odprli 2 cm pod ksifoidnim izrastkom spodnjega dela prsnice. Z odstranitvijo trebušne prepone smo si prikazali srce in velike žile v prsnem košu in trebušni votlini podgane. Žival smo izkrvaveli s prekinitvijo spodnje vene kave. Od torakalne aorte smo ločili sosednje vezivno tkivo in maščevje ter izrezali torakalno aorto iz živali. Iz aorte smo nato pripravili 8 žilnih obročkov, ki so bili široki 3–4 mm.

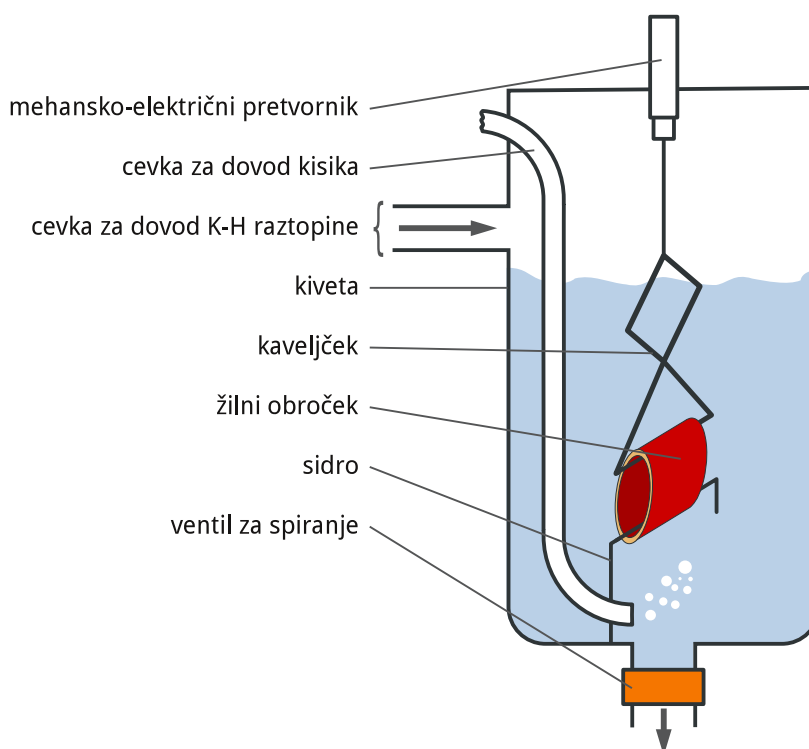
Te smo namestili v kivete naprave za poskuse na izoliranih žilah, ki so bile napolnjene z raztopino K-H. Pri poskusih brez endotelija smo le tega pred namestitvijo žilnih obročkov v kivete mehansko odstranili z leseno palčko. Čas, ki je potekel od izkrvavitve živali do namestitve žilnih obročkov, je bil v povprečju 10–15 minut.

3.3.2. Naprava za poskuse na izoliranih žilah

Naprava za poskuse na izoliranih žilah je bila izdelana na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Sestavljena je iz vodne kopeli, v kateri je med seboj povezanih osem kivet s prostornino 10 ml. Kivete imajo ločen dovodni in odvodni sistem za izmenjavo medija (raztopina H-K) ter dovod plina.

Raztopino smo prepihovali s plinsko mešanico 95 % O₂ in 5 % CO₂. Temperaturo vodne kopeli smo vzdrževali s pomočjo termostatsko nadzorovane vodne črpalke pri 37,0 ± 0,5 °C. Ostale reagentne smo dodajali v kivete skozi zgornjo odprtino s polavtomatskimi pipetami.

Žilne obročke smo vpeli med dve vzporedni nerjaveči kovinski žici. Prva (sidro) je bila pritrjena na držalo znotraj kivete, druga (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. To smo nato preko ojačevalca in A/D pretvornika (National Instruments NI PCI-6013, ZDA) zapisovali na trdi disk osebne računalnika. Podatke, ki smo jih dobili, smo obdelali s programsko opremo DEWESoft 6.5 (DEWESoft d.o.o., Trbovlje, Slovenija).



Slika 3.1. Shematski prikaz naprave za poskuse na izoliranih žilah.

3.4. Priprava matičnih raztopin

Na začetku izvajanja raziskave smo pripravili matične raztopine preiskovanih snovi, ki smo jih nato ustrezno redčili.

3.4.1. Polifenoli v vinu in spojine iz vodne frakcije

Resveratrol, 2-feniletanol, 4-etilgvajakol in 4-alil-2,6-dimetoksifenol so topni v dimetilsulfoksidu (DMSO-ju). Spojine smo zatehtali in jih raztopili v minimalni količini topila, nato pa smo jih do matične raztopine ($c = 0,01 \text{ M}$) redčili z bidestilirano vodo.

3-(2-hidroksietil)indol in 2,6-dimetoksifenol sta topna v vodi. Spojini smo zatehtali in redčili z bidestilirano vodo ter pripravili matični raztopini v koncentraciji $c = 0,01 \text{ M}$.

3.4.2. Vinske frakcije

Vinske frakcije so bile pripravljene na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo. Najprej so 100 mL vina (Cabernet sauvignon, Goriška Brda, letnik 2004) odparili pri znižanem tlaku ($T = 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$) do 60 mL. Kar je odparelo, smo poimenovali etanolni ostanek. Preostalih 60 ml pa ostanek po destilaciji. Nato so izvajali zaporedno ekstrakcijo v liju ločniku s 50 mL izbranega topila (petroleter, dietileter, etilacetat, 1-butanol), in sicer dvakrat z vsakim topilom. Tako so dobili pet frakcij (petroletrna, dietiletrna, etilacetatna, butanolna) in vodni preostanek - vodna frakcija. Vse so do suhega uparili. Iz razlike v masi med prazno in polno bučko so dobili maso suhe frakcije. Preden so osušene frakcije shranili, so jih vedno prepihali z argonom.

Vse vinske frakcije smo redčili z bidestilirano vodo. Matične raztopine so vsebovale takšne količine snovi, kot so prisotne v vinu.

Preglednica 3.1. Koncentracije matičnih raztopin vinskih frakcij, ki smo jih uporabili pri delu.

Vinska frakcija	c (g/ml)	c (ml/ml)
vodna frakcija	0,0660	
petroletrna frakcija	0,0099	
dietiletrna frakcija	0,0765	
etilacetatna frakcija	0,0449	
butanolna frakcija	0,0930	
etanolni ostanek		0,1000
ostanek po destilaciji		0,1000

3.4.3. Dealkoholizirano vino

Pri delu smo uporabili dealkoholizirano vino znamke Dingač (letnik 2004), ki smo ga redčili z bidestilirano vodo. Matična raztopina je bilo 200 μ l neredčenega vina.

4. Potek dela

Na začetku raziskave smo določili potek dela in protokol poskusa. Tako smo izvajali poskuse po vedno enakem postopku in zagotovili ponovljivost poskusa.

4.1. Protokol poskusa

Poskuse smo razdelili na več skupin: poskusi z ohranjenim endotelijem, poskusi z odstranjenim endotelijem in poskusi z ohranjenim endotelijem s predhodno inkubacijo žilnih obročkov v L-NNA.

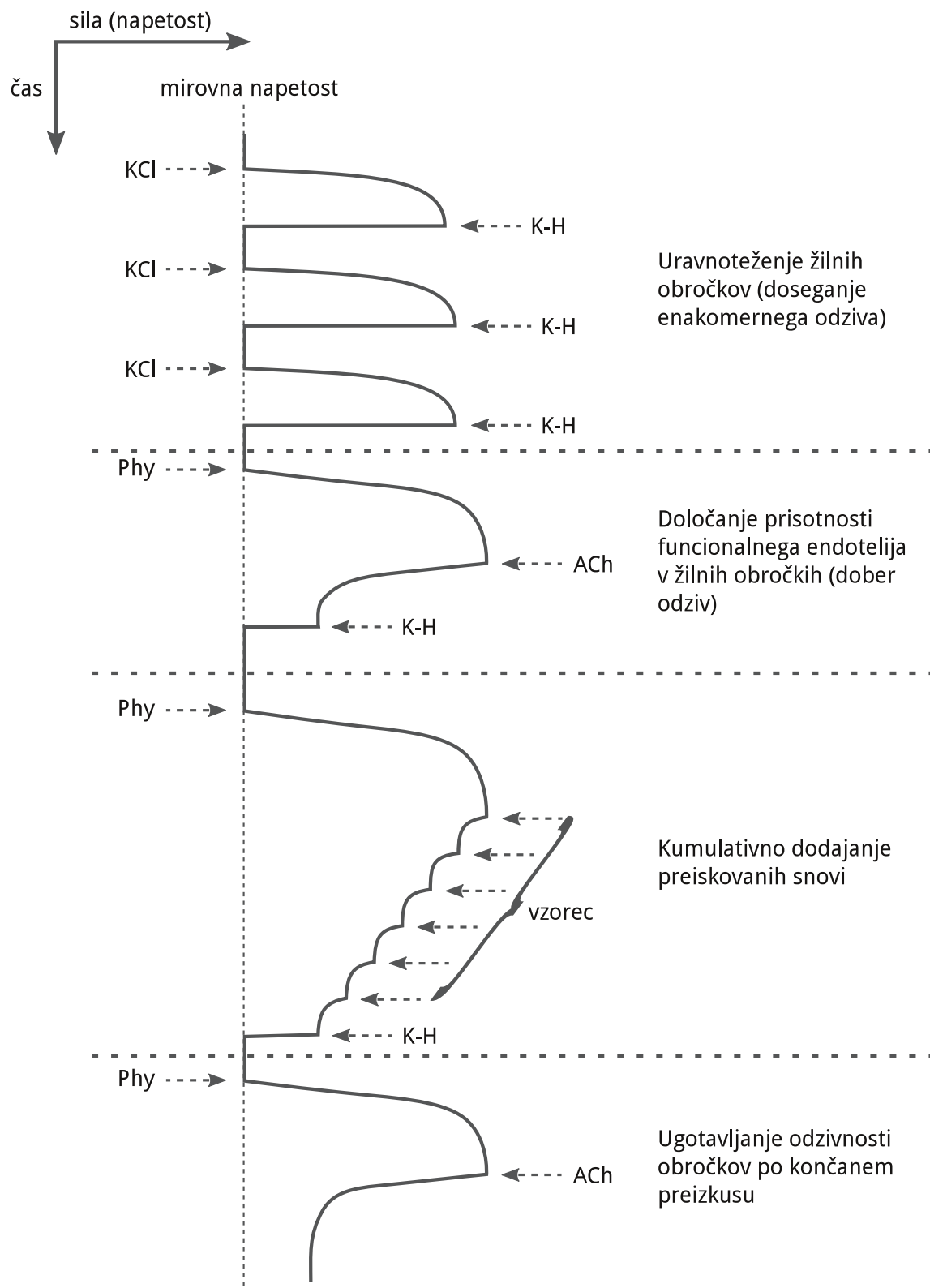
4.1.1. Poskusi z ohranjenim endotelijem

Žilne obročke smo vpeli med sidro in kaveljček ter jih potopili v kiveto s K-H raztopino. Pred poskusom smo jih 90 minut uravnavali na mirovno napetost 20 mN. V tem času smo vsakih 15 minut menjali K-H raztopino, da smo sprali ostanke krvi in zagotovili zadostno prehranjenost žilnih obročkov.

Ko je bila mirovna napetost stabilna, smo preverili odzivnost obročkov. V kiveto smo dodali KCl do končne koncentracije 60 mM. Ko je bila skrčitev konstantna, smo obročke izprali s K-H raztopino. Postopek smo ponavljali do enakomernosti odziva. Obročke smo sprali s K-H raztopino ter skrčili s fenilefrinom, katerega koncentracija v raztopini je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Ko je skrčitev dosegla plato, smo z acetilholinom (koncentracija v kiveti je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$) izzvali od endotelija odvisno sprostitvev žilnih obročkov. Sprostitev, ki je bila večja od 50 %, je pomenila, da je endotelij ohranjen. Žilne obročke smo nato sprali s K-H raztopino.

Po uravnoteženju žilnih obročkov in preizkusu endotelija smo uporabili le tiste obročke z ohranjenim endotelijem. V kiveto smo dodali fenilefrin v končni koncentracij 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Ko je skrčitev žilnega obročka dosegla plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem preiskovanih snovi. Po končanem poskusu smo obročke sprali z raztopino K-H, počakali, da so se uravnali na mirovno napetost, jih skrčili s fenilefrinom (koncentracija v kiveti je bila

0,1 $\mu\text{mol/l}$) in sprostili z acetilholinom (koncentracija v kivetih je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$). Tako smo preverili odziv žilnih obročkov. Po končanem poskusu smo žilne obročke zavrgli.



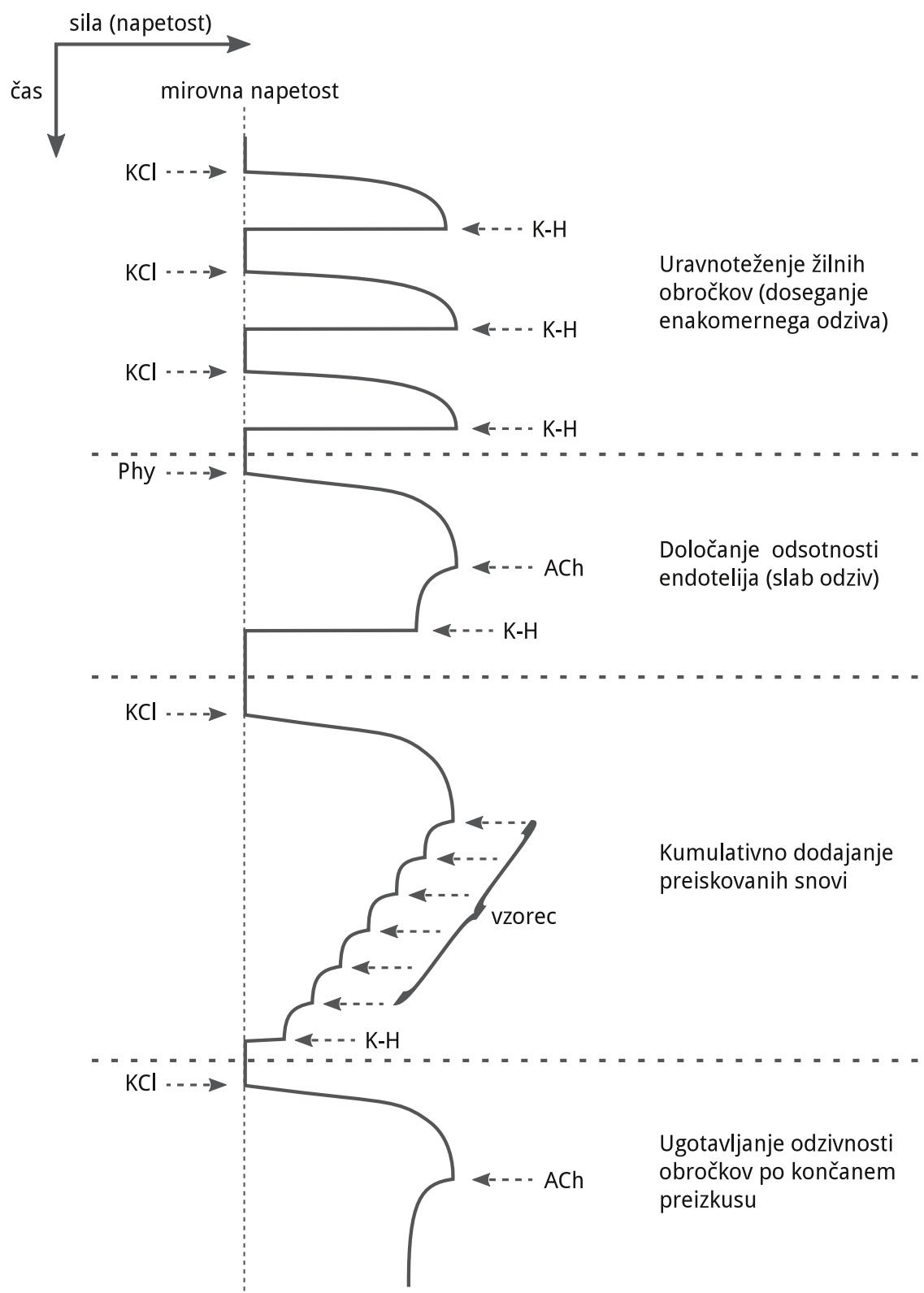
Slika 4.1. Shematski prikaz poteka poskusa z ohranjenim endotelijem.

4.1.2. Poskusi z odstranjenim endotelijem

Žilnim obročkom smo mehansko odstranili endotelij z leseno palčko. Obročke smo vpeli med sidro in kaveljček ter jih potopili v kiveto s K-H raztopino. Pred začetkom poskusa, smo jih 90 minut uravnavali na mirovno napetost 20 mN. V tem času smo vsakih 15 minut menjali K-H raztopino, da smo sprali ostanke krvi in zagotovili zadostno prehranjenost žilnih obročkov.

Ko je bila mirovna napetost stabilna, smo preverili odzivnost obročkov. V kiveto smo dodali KCl do končne koncentracije 60 mmol/l. Ko je bila skrčitev stabilna, smo obročke izprali s K-H raztopino. Postopek smo ponavljali do enakomernosti odziva. Obročke smo nato sprali s K-H raztopino ter skrčili s fenilefrinom, katerega koncentracija v raztopini je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Ko je skrčitev dosegla plato, smo dodali acetilholin v koncentraciji 0,1 $\mu\text{mol/l}$ v kivetu. Če smo žilnim obročkom endotelij uspešno odstranili, je bila sprostitvev obročka manjša od 20 %. Žilne obročke smo nato sprali s K-H raztopino.

Pri poskusih z odstranjenim endotelijem smo uporabili le tiste z odstranjenim endotelijem. V kiveto smo dodali KCl v končni koncentraciji 60 mmol/l. Ko je skrčitev dosegla plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem preiskovanih snovi. Po končanem poskusu smo obročke sprali z raztopino K-H, jih uravnavali na mirovno napetost ter skrčili s KCl (končna koncentracija v kivetu je bila 60 mmol/l). Tako smo preverili ustrezen odziv žilnih obročkov. Po končanem poskusu smo žilne obročke zavrgli.



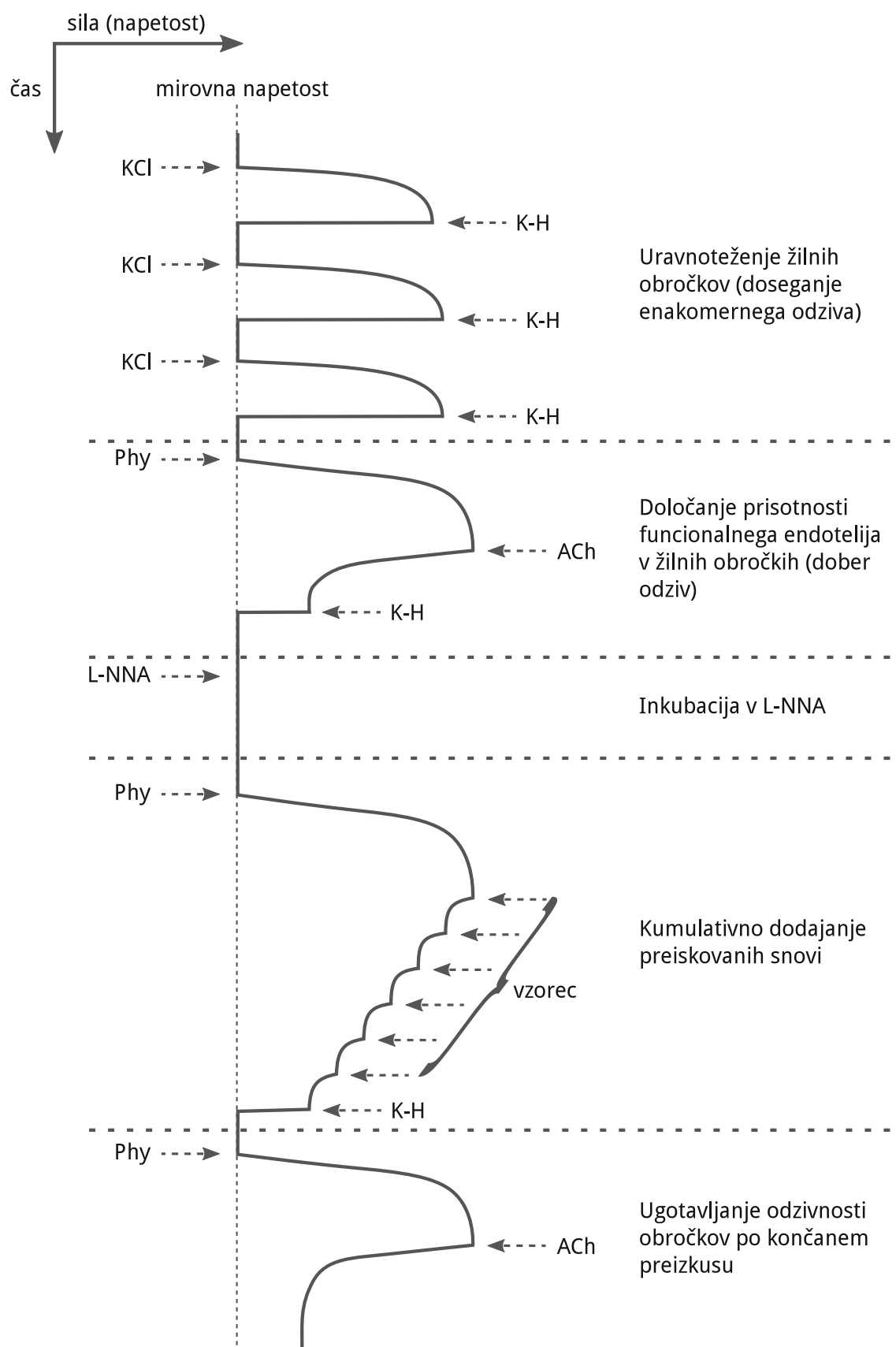
Slika 4.2. Shematski prikaz poteka poskusa z odstranjenim endotelijem.

4.1.3. Inkubacija žilnih obročkov z L-NNA

Žilne obročke smo vpeli med sidro in kaveljček ter jih potopili v kiveto s K-H raztopino. Pred poskusom smo jih 90 minut uravnavali na mirovno napetost 20 mN. V tem času smo vsakih 15 minut menjali K-H raztopino, da smo sprali ostanke krvi in zagotovili zadostno prehranjenost žilnih obročkov.

Ko je bila mirovna napetost stabilna, smo preverili odzivnost obročkov. V kiveto smo dodali KCl do končne koncentracije 60 mM. Ko je bila skrčitev stabilna, smo obročke izprali s K-H raztopino. Postopek smo ponavljali do enakomernosti odziva. Obročke smo sprali s K-H raztopino ter jih skrčili s fenilefrinom, katerega koncentracija v raztopini je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Ko je skrčitev dosegla plato, smo z acetilholinom, katerega končna koncentracija v kiveti je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$, izzvali od endotelija odvisno sprostitvev žilnih obročkov. Sprostitev, ki je bila večja od 50 %, je pomenila, da je endotelij ohranjen. Žilne obročke smo nato sprali s K-H raztopino.

V našem poskusu smo uporabili le tiste žilne obročke z ohranjenim endotelijem. Počakali smo, da so se obročki uravnali na mirovno napetost. V kiveto smo dodali L-NNA v končni koncentraciji 0,36 mmol/l in žilne obročke inkubirali 30 min. Nato smo izzvali skrčitev žilnih obročkov s fenilefrinom (koncentracija v kiveti je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$). Ko je skrčitev dosegla plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem preiskovanih snovi. Po končanem poskusu, smo žilne obročke sprali s K-H raztopino, počakali, da so se uravnali na mirovno napetost, jih skrčili s fenilefrinom (koncentracija 0,1 $\mu\text{mol/l}$ v kiveti) in sprostili z acetilholinom, ki je dosegel koncentracijo 0,1 $\mu\text{mol/l}$ v kiveti. Žilne obročke smo po končanem delu zavrgli.



Slika 4.3. Shematski prikaz poteka poskusa z ohranjenim endotelijem in inkubacijo žilnih obročkov v L-NNA.

4.2. Kontrolni poskusi za preizkus vpliva topila

S kontrolnimi poskusi smo ovrednotili vpliv topila in vazokonstriktorja na sproščanje izoliranih žilnih obročkov.

4.2.1. Poskusi z ohranjenim endotelijem

Potek poskusa je enak kot je opisano v točki 4.1.1. Žilne obročke smo uravnali na mirovno napetost, preverili delovanje endotelija in začeli s kontrolnim poskusom. Žilne obročke smo skrčili s fenilefrinom, katerega koncentracija v kiveti je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Ko je skrčitev dosegla plato, smo v kiveto kumulativno dodajali DMSO v časovnih intervalih, ki sovpadajo s kumulativnim dodajanjem preiskovanih snovi. Tega smo dodali v takšnih količinah, kot je bil prisoten v raztopinah s spojinami, ki se nahajajo v vinu. Po končanem poskusu smo žilne obročke sprali s K-H raztopino in počakali da so se uravnali na mirovno napetost. Obročke smo skrčili s fenilefrinom (končna koncentracija v kiveti 0,1 $\mu\text{mol/l}$) in sprostili z acetilholinom (končna koncentracija v kiveti 0,1 $\mu\text{mol/l}$).

Vinske frakcije smo do matičnih raztopin redčili z bidestilirano vodo. Potek kontrolnega poskusa je enak kot je opisano v točki 4.1.1. Žilne obročke smo uravnali na mirovno napetost, preverili delovanje endotelija in začeli s kontrolnim poskusom. Žilne obročke smo skrčili s fenilefrinom, katerega koncentracija v kiveti je bila 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Ko je skrčitev dosegla plato, smo v kiveto dodajali vodo in merili spremembo izometrične sile v časovnih intervalih, ki sovpadajo s časovnim potekom dodajanja preiskovanih snovi v kiveto. Po končanem poskusu smo žilne obročke sprali s K-H raztopino in počakali da so se uravnali na mirovno napetost. Obročke smo skrčili s fenilefrinom (končna koncentracija v kiveti 0,1 $\mu\text{mol/l}$) in sprostili z acetilholinom (končna koncentracija v kiveti 0,1 $\mu\text{mol/l}$). Po končanem poskusu smo žilne obročke zavrgli.

4.2.2. Poskusi z odstranjenim endotelijem

Potek poskusa je enak kot je opisano v točki 4.1.2. Žilne obročke smo uravnali na mirovno napetost, preverili delovanje endotelija in začeli s kontrolnim poskusom. Žilne obročke smo skrčili s KCl v končni koncentraciji 60 mmol/l v kiveti. Ko je skrčitev dosegla plato, smo v kiveto kumulativno dodajali DMSO v časovnih intervalih, ki sovpadajo s kumulativnim dodajanjem preiskovanih snovi. DMSO smo dodali v takšnih količinah, kot je prisoten v raztopinah s spojinami, ki se nahajajo v vinu. Po končanem poskusu smo žilne obročke sprali s K-H raztopino in počakali da so se uravnali na mirovno napetost. Obročke smo še enkrat skrčili s KCl v končni koncentraciji 60 mmol/ in tako preverili njihovo odzivnost.

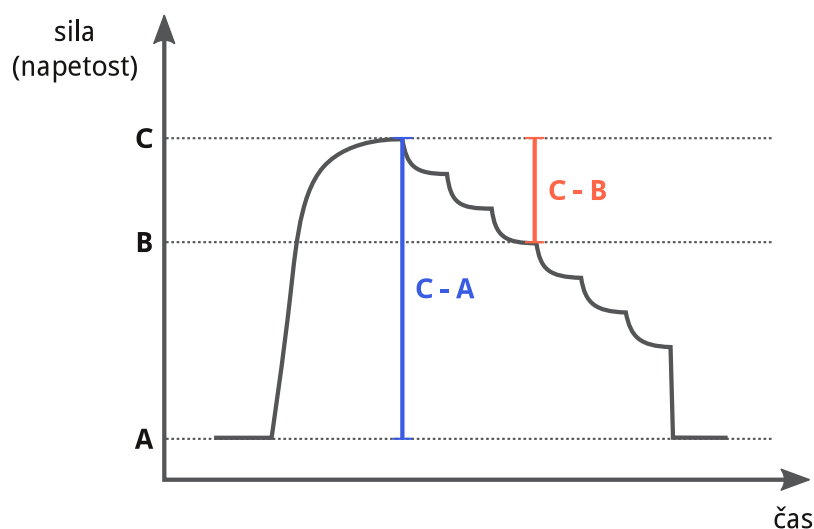
Pri poskusih z vinskimi frakcijami je potek poskusa enak kot je opisano v točki 4.1.2. Žilne obročke smo uravnali na mirovno napetost, preverili delovanje endotelija in začeli s kontrolnim poskusom. Žilne obročke smo skrčili s KCl v končni koncentraciji 60 mmol/l v kiveti. Ko je skrčitev dosegla plato, smo v kiveto dodajali vodo in merili spremembo izometrične sile v časovnih intervalih, ki sovpadajo s časovnim potekom dodajanja preiskovanih snovi v kiveto. Po končanem poskusu smo žilne obročke sprali s K-H raztopino in počakali da so se uravnali na mirovno napetost. Obročke smo še enkrat skrčili s KCl v končni koncentraciji 60 mmol/l in tako preverili njihovo odzivnost. Žilne obročke smo po končanem poskusu zavrgli.

4.3. Obdelava podatkov

S pomočjo računalniškega programa DeweSoft 6.1 (DEWESoft d.o.o., Trbovlje, Slovenija) smo določili višino platojev (silo izometrične kontrakcije) pri posameznih poskusih. Podatke smo normalizirali po enačbi 4.1. Za vsako redčitev smo izračunali odstotek sprostitve (ΔY) tako, da smo spremembo napetosti ($C - B$) delili z maksimalno spremembo napetosti, ki jo je dosegel predhodno skrčen žilni obroček ($C - A$).

$$\Delta Y = \frac{C - A}{C - B} \times 100$$

Enačba 4.1. Normalizacija sprememb napetosti



Slika 4.4. Grafični prikaz vrednosti, ki jih potrebujemo za normalizacijo.

Dobljene podatke smo nato statistično in grafično obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism 5.01 (GraphPad, ZDA). Rezultate meritev pri posameznih koncentracijah smo povprečili in izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM). Število obročkov v posamezni poskusni skupini smo prikazali v rezultatih.

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Enačba 4.2. Izračun SEM (SEM – standardna napaka ocen aritmetičnih sredin, s – standardni odklon vzorca statistične populacije, n – število vzorcev).

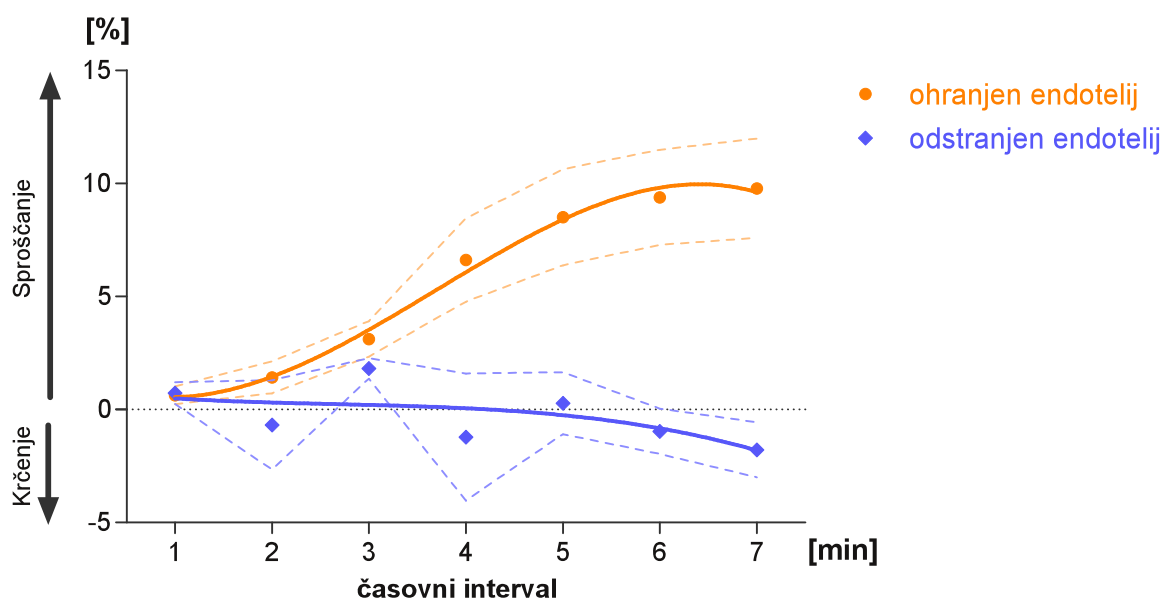
S t-testom smo primerjali odzive s kontrolnimi vrednostmi. Statistično pomembno razliko pri primerjavi rezultatov je predstavljala vrednost $p < 0,05$. Iz odvisnosti med redčitvijo v kivetu in relativno sprostitvijo žilnih obročkov smo izdelali graf za vsako skupino poskusov. Na grafih je prikazan dejanski vpliv preiskovanih snovi pri predhodno skrčenih izoliranih žilnih obročkih (kontrolne vrednosti so odštete od izmerjenih).

5. Rezultati

Rezultate, ki smo jih dobili med raziskavo smo analizirali, grafično prikazali in statistično ovrednotili. Točke na grafih predstavljajo povprečne vrednosti meritev pri posameznih koncentracijah, od katerih so že odštete kontrolne vrednosti. Interval med prekinjenima črtama predstavlja SEM. Krivulja tako opiše le oceno učinka. V preglednicah pod grafi smo navedli nekaj osnovnih podatkov o posameznem poskusu ter vrednosti t-testa.

5.1. Kontrolne vrednosti sproščanja predhodno skrčenih izoliranih žilnih obročkov aorte podgane

Ugotavljali smo sprostitvev žilnih obročkov, ki smo jih predhodno skrčili s fenilefrinom (obročki z ohranjenim endotelijem) ali KCl (obročki z odstranjenim endotelijem). Sprostitev smo ugotavljali v rednih časovnih intervalih, ki sovpadajo z intervali dodajanja ostalih snovi.

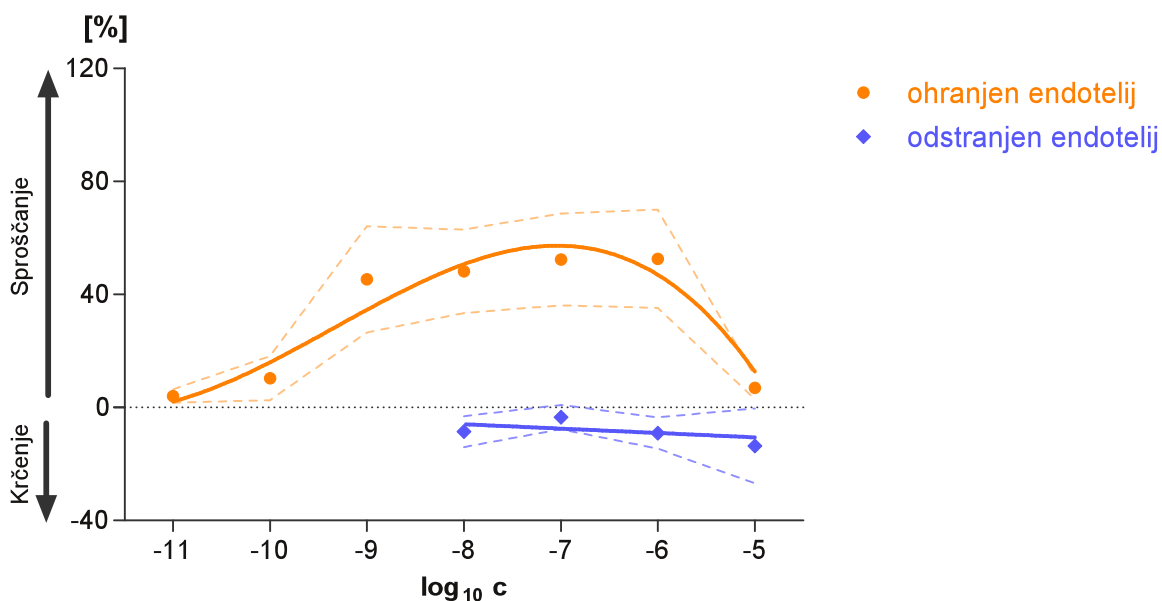


Graf 5.1. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov v odvisnosti od časovnega poteka brez dodajanja preiskovanih snovi. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od časovnega poteka poskusa. (Število testiranih obročkov z ohranjenim in odstranjenim endotelijem je bilo v obeh primerih 5.)

5.2. Vpliv nekaterih spojin, ki se nahajajo v vinu, na predhodno skrčene izolirane žilne obročke aorte podgane

Ugotavljali smo sprostitvev žilnih obročkov, ki smo jih predhodno skrčili z fenilefrinom (obročki imajo ohranjen endotelij) in s KCl (obročkom smo odstranili endotelij). Sprostitvev smo preverjali s kumulativnim dodajanjem različnih snovi, ki se nahajajo v vinu.

5.2.1. Odziv izolirane torakalne aorte na resveratrol



Graf 5.2. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju resveratrola v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije resveratrola v kiveti (mol/l).

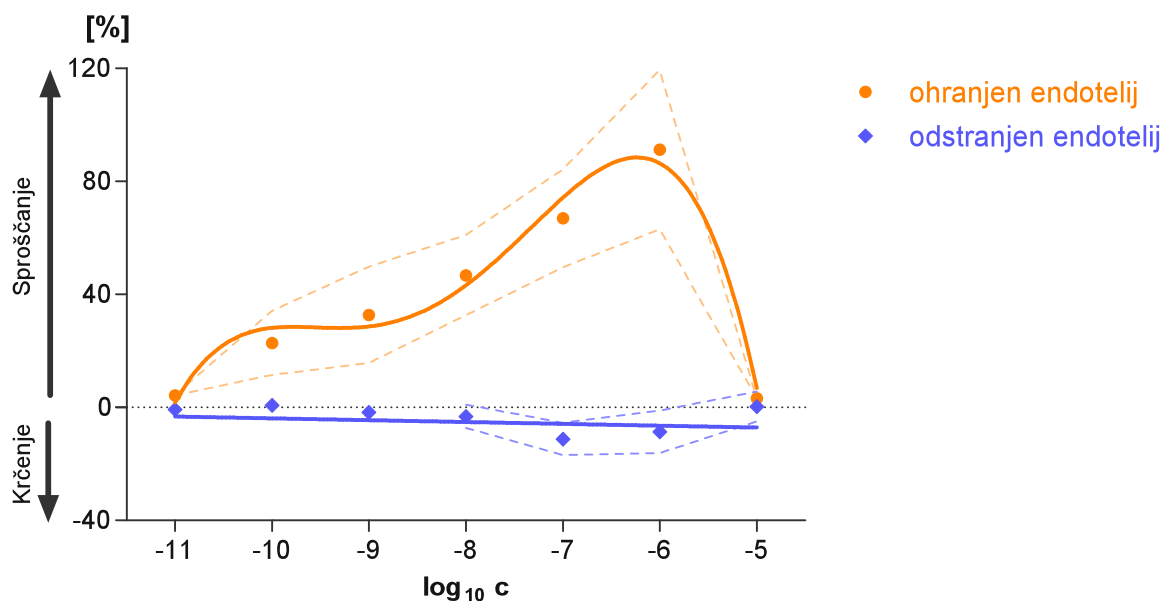
Preglednica 5.1. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z resveratrolom.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	10	7
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	53,44 %	-10,23 %

Preglednica 5.2. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje))

Koncentracija spojine (mol/l)	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
Ohranjen endotelij	0,240	0,246	0,061	0,010	0,011	0,014	0,217
Odstranjen endotelij	x	x	x	0,199	0,463	0,153	0,411

5.2.2. Odziv izolirane torakalne aorte na 4-etilgvajakol



Graf 5.3. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju 4-etilgvajakola v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije 4-etilgvajakola v kivetu (mol/l).

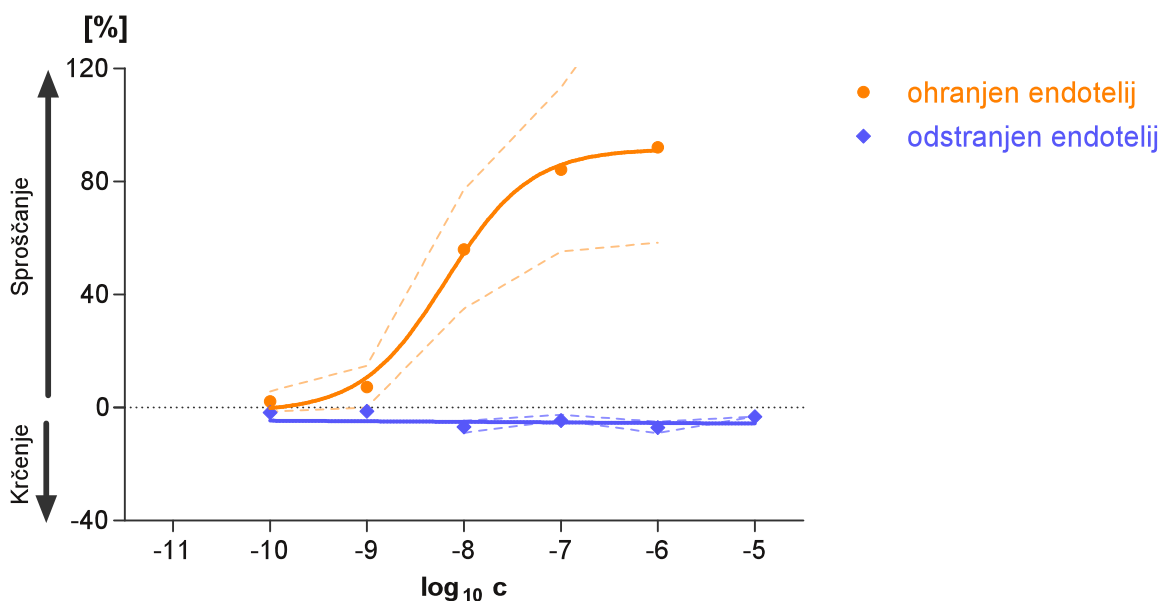
Preglednica 5.3. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih s 4-etilgvajakolom.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	10	7
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	91,13 %	-6,21 %

Preglednica 5.4. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje))

Koncentracija spojine (mol/l)	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
Ohranjen endotelij	0,145	0,114	0,128	0,009	0,004	0,010	0,293
Odstranjen endotelij	0,268	0,761	0,058	0,539	0,099	0,291	0,971

5.2.3. Odziv izolirane torakalne aorte na 2-feniletanol



Graf 5.4. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju 2-feniletanola v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije 2-feniletanola v kivetu (mol/l).

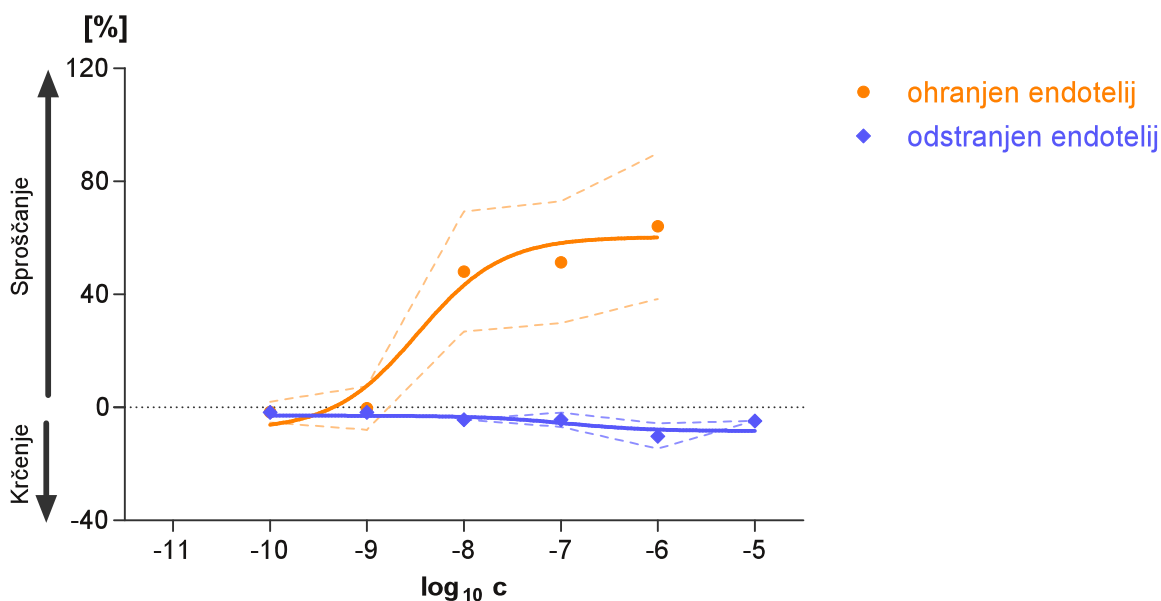
Preglednica 5.5. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z 2-feniletanolom.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	11	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	92,01 %	-5,60 %

Preglednica 5.6. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje), ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (mol/l)	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
Ohranjen endotelij	0,577	0,372	0,024	0,016	0,021	x
Odstranjen endotelij	0,069	0,574	0,031	0,255	0,028	0,186

5.2.4. Odziv izolirane torakalne aorte na 3-(2-hidroksietil)indol



Graf 5.5. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju 3-(2-hidroksietil)indola v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije 3-(2-hidroksietil)indola v kiveti (mol/l).

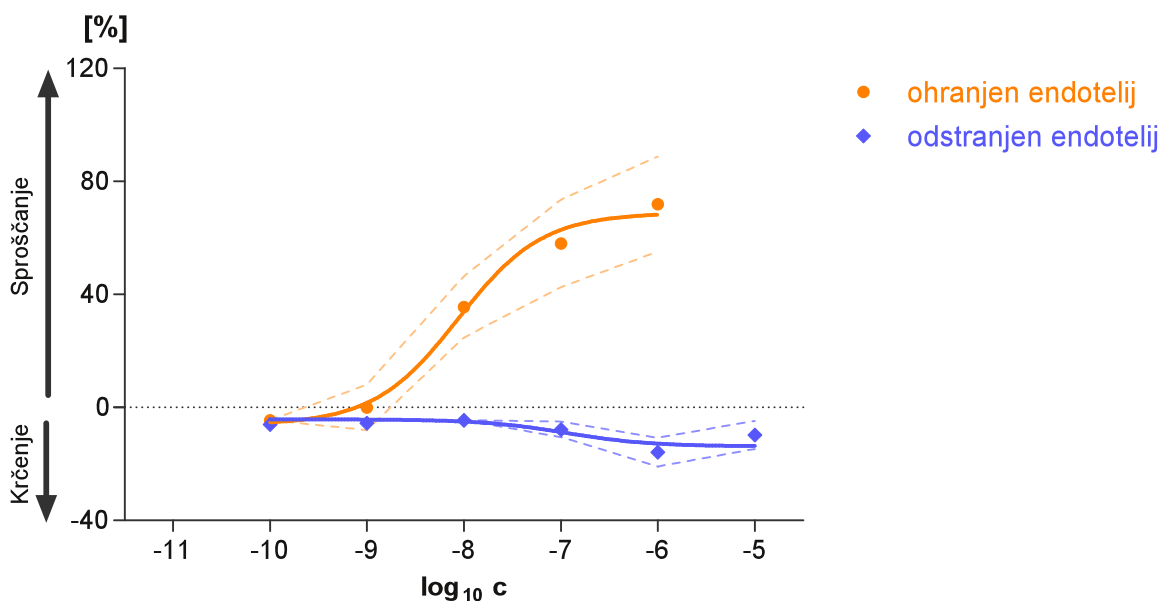
Preglednica 5.7. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih s 3-(2-hidroksietil)indolom.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	11	4
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	64,02 %	-8,23 %

Preglednica 5.8. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje), ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (mol/l)	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Ohranjen endotelij	0,662	0,971	0,047	0,039	0,0323	x
Odstranjen endotelij	0,039	0,511	0,081	0,300	0,102	0,0261

5.2.5. Odziv izolirane torakalne aorte na 4-alil-2,6-dimetoksifenol



Graf 5.6. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju 4-alil-2,6-dimetoksifenola v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije 4-alil-2,6-dimetoksifenola v kivetu (mol/l).

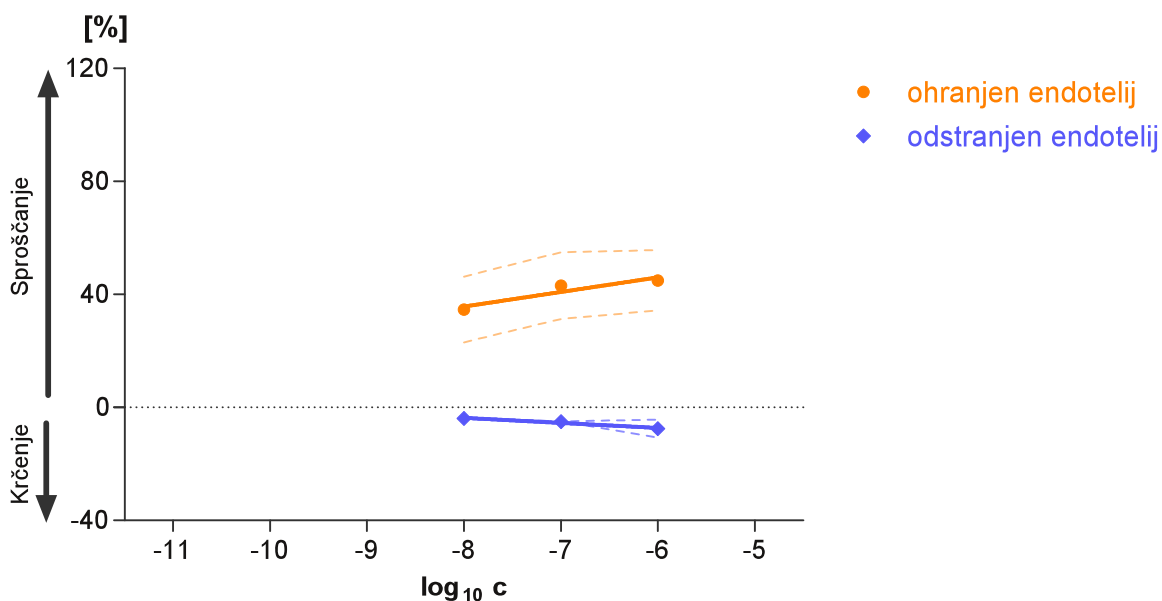
Preglednica 5.9. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih s 4-alil-2,6-dimetoksifenolom.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	9	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	71,86 %	-14,63 %

Preglednica 5.10. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje), ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (mol/l)	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
Ohranjen endotelij	0,065	0,991	0,011	0,006	0,002	x
Odstranjen endotelij	0,111	0,149	0,063	0,101	0,034	0,181

5.2.6. Odziv izolirane torakalne aorte na 2,6-dimetoksifenol



Graf 5.7. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju 2,6-dimetoksifenola v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije 2,6-dimetoksifenola v kiveti (mol/l).

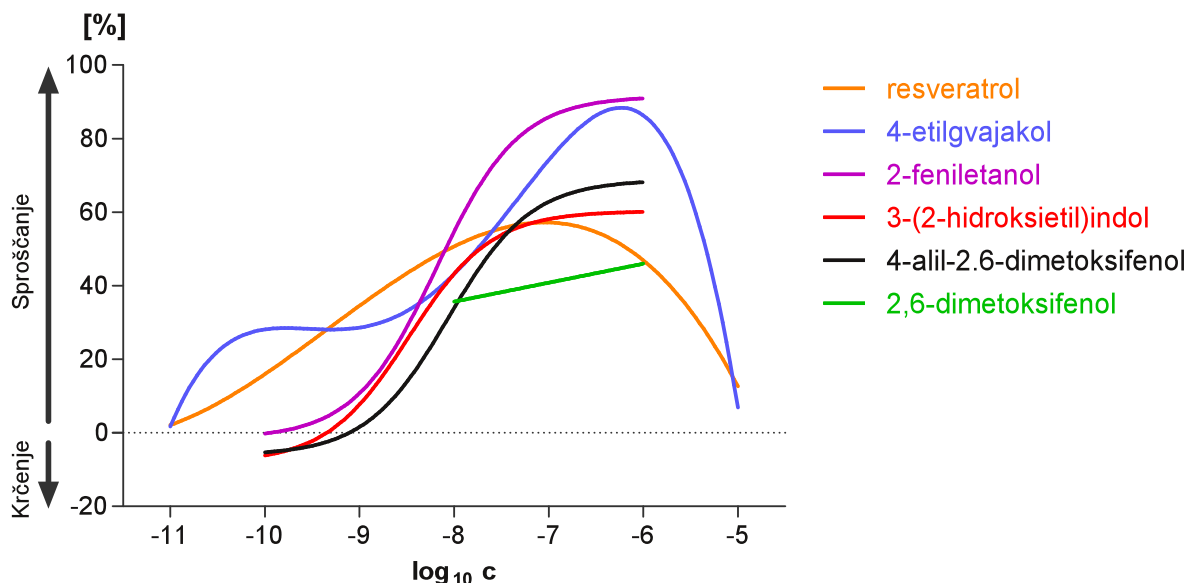
Preglednica 5.11. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih s 2,6-dimetoksifenolom.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	5	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	44,89 %	-7,56 %

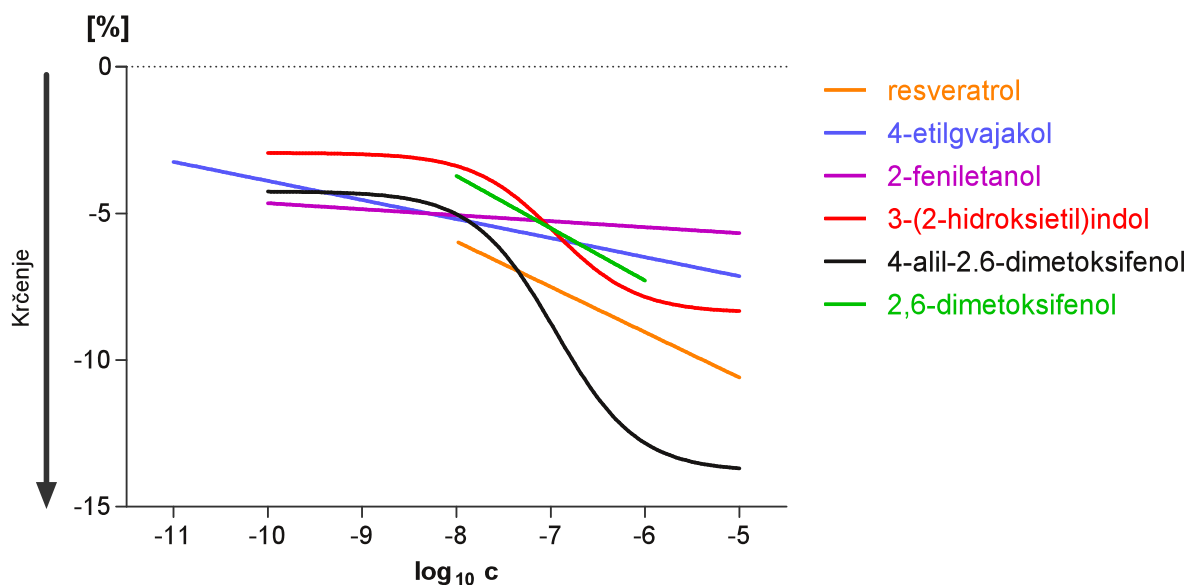
Preglednica 5.12. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje), ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (mol/l)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
Ohranjen endotelij	0,0412	0,022	0,013
Odstranjen endotelij	0,040	0,112	0,077

5.2.7. Primerjava odzivov predhodno skrčenih žilnih obročkov na izbrane snovi ki se nahajajo v vinu



Graf 5.8. Primerjava odzivov predhodno skrčenih žilnih obročkov, ki imajo ohranjen endotelij, po kumulativnem dodajanju snovi, ki se nahajajo v vinu. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev s fenilefrinom v odvisnosti od logaritma koncentracije snovi v kiveti (mol/l).

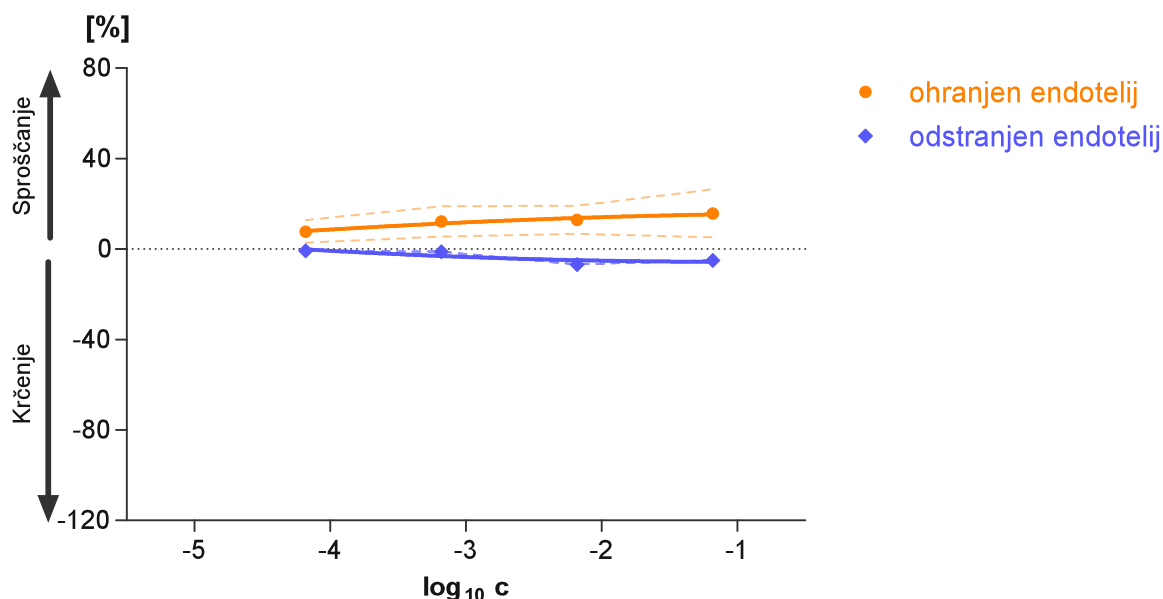


Graf 5.9. Primerjava odzivov predhodno skrčenih žilnih obročkov, ki imajo odstranjen endotelij, po kumulativnem dodajanju snovi, ki se nahajajo v vinu. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije snovi v kiveti (mol/l).

5.3. Vpliv vinskih frakcij na sprostitvev žilnih obročkov

Ugotavljali smo sprostitvev žilnih obročkov, ki smo jih predhodno skrčili s fenilefrinom (obročki imajo ohranjen endotelij) in s KCl (obročki imajo odstranjen endotelij). Obročkom smo kumulativno dodajali različne redčitve vinskih frakcij in opazovali njihov odziv.

5.3.1. Odziv izolirane torakalne aorte na vodno frakcijo iz vina



Graf 5.10. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju vodne frakcije v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije vodne frakcije v kivetu (g/l).

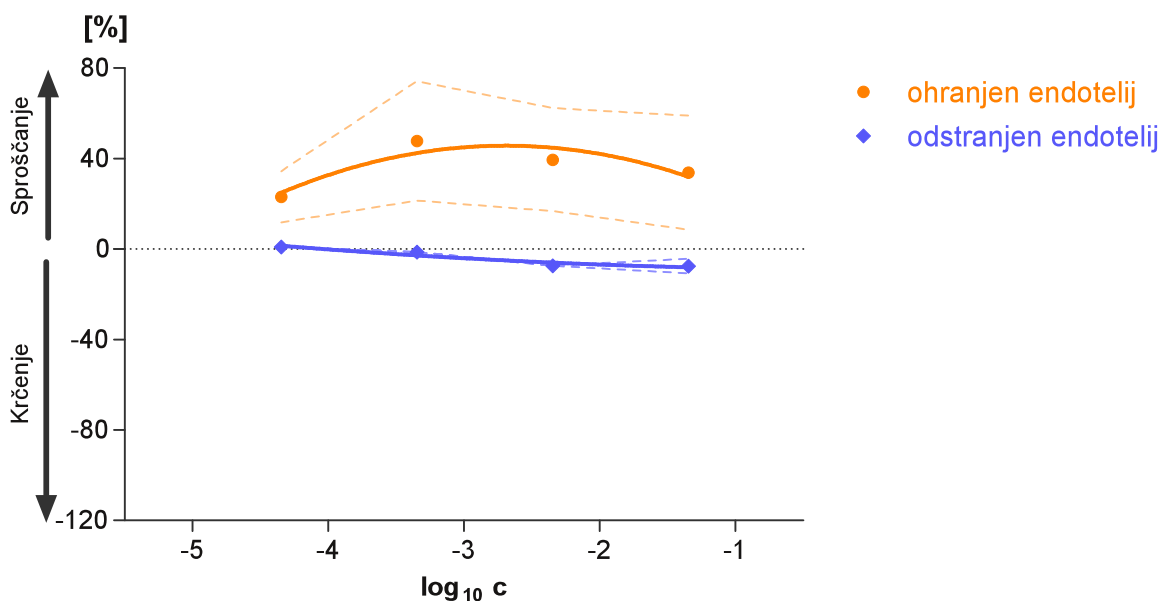
Preglednica 5.13. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z vodno frakcijo.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	8	6
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	15,71 %	-5,84 %

Preglednica 5.14. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (g/l)	$6,6 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-4}$	$6,6 \times 10^{-3}$	$6,6 \times 10^{-2}$
Ohranjen endotelij	0,171	0,131	0,093	0,236
Odstranjen endotelij	0,476	0,635	0,002	0,209

5.3.2. Odziv izolirane torakalne aorte na etilacetatno frakcijo iz vina



Graf 5.11. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju etilacetatne frakcije v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije etilacetatne frakcije v kivetu (g/l).

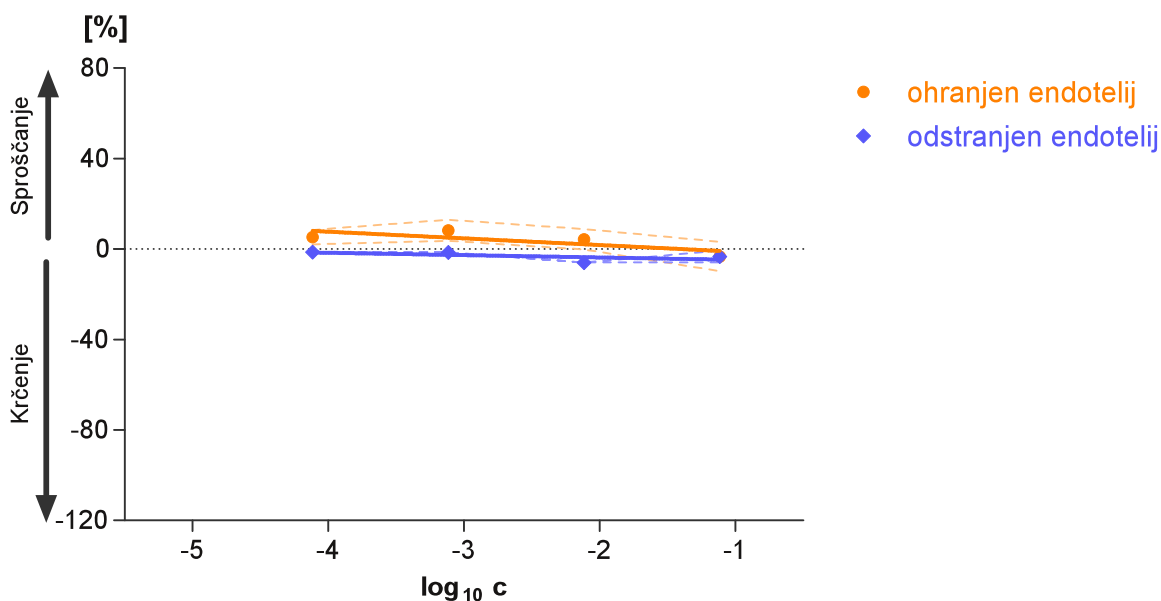
Preglednica 5.15. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z etilacetatno frakcijo.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	6	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	47,77 %	-7,60 %

Preglednica 5.16. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (g/l)	$4,5 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-2}$
Ohranjen endotelij	0,096	0,130	0,144	0,239
Odstranjen endotelij	0,615	0,644	0,032	0,131

5.3.3. Odziv izolirane torakalne aorte na dietiletrno frakcijo iz vina



Graf 5.12. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju dietiletrne frakcije v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije dietileterne frakcije v kivetu (g/l).

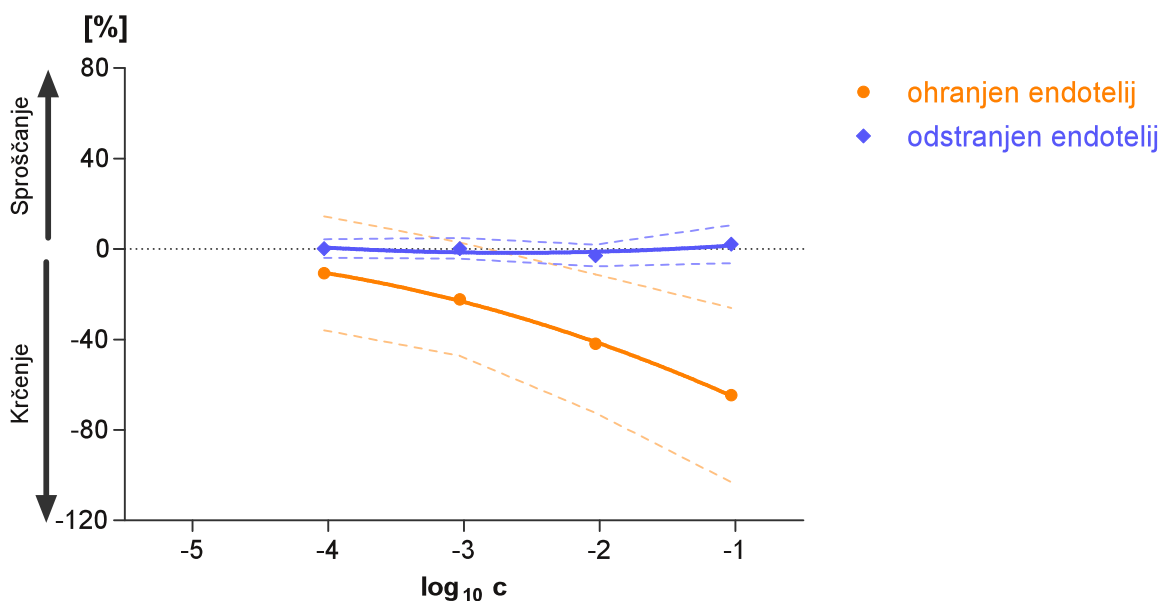
Preglednica 5.17. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z dietiletrno frakcijo.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	6	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	8,20 %	-4,60 %

Preglednica 5.18. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen)

Koncentracija spojine (g/l)	$7,6 \times 10^{-5}$	$7,6 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-3}$	$7,6 \times 10^{-2}$
Ohranjen endotelij	0,166	0,140	0,398	0,639
Odstranjen endotelij	0,211	0,605	0,061	0,414

5.3.4. Odziv izolirane torakalne aorte na butanolno frakcijo iz vina



Graf 5.13. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju butanolne frakcije v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije butanolne frakcije v kiveti (g/l).

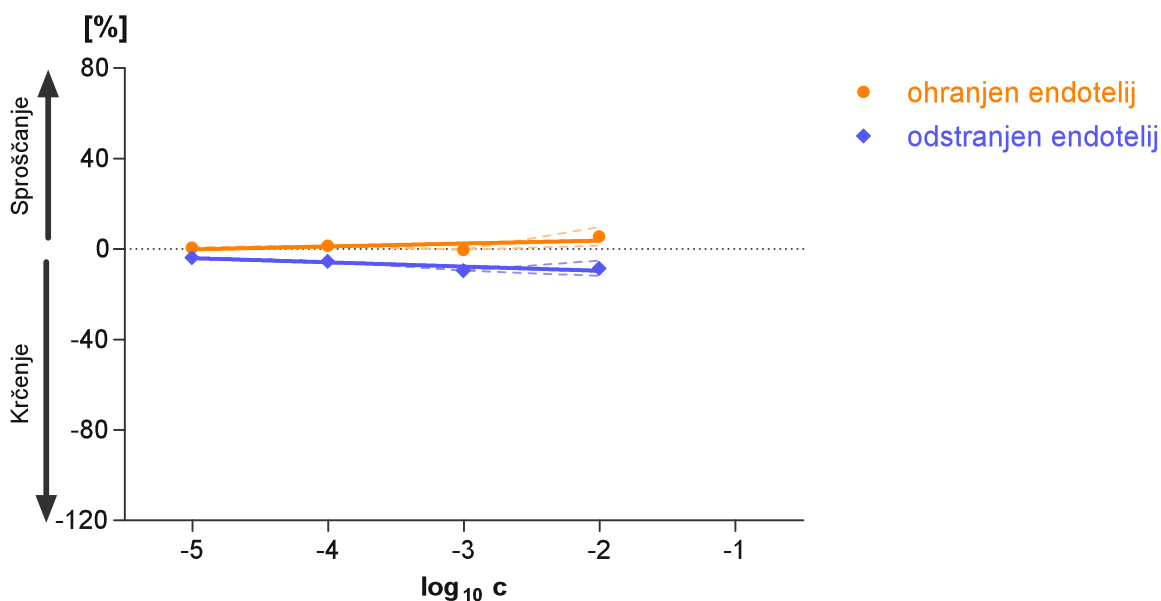
Preglednica 5.19. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z butanolno frakcijo.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	6	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	-64,62 %	-1,82 %

Preglednica 5.20. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen)

Koncentracija spojine (g/l)	$9,3 \times 10^{-5}$	$9,3 \times 10^{-4}$	$9,3 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-2}$
Ohranjen endotelij	0,688	0,416	0,231	0,154
Odstranjen endotelij	0,974	0,966	0,579	0,821

5.3.5. Odziv izolirane torakalne aorte na petroletrno frakcijo iz vina



Graf 5.14. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju petroletrne frakcije v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije petroleterne frakcije v kivetu (g/l).

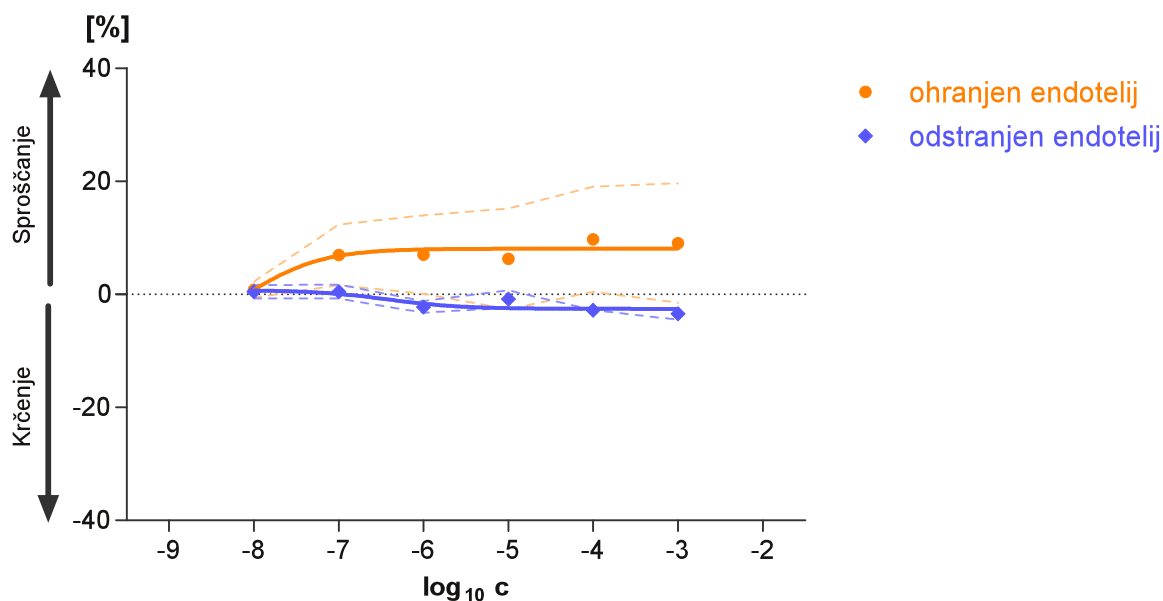
Preglednica 5.21. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih s petroletrno frakcijo.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	5	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	4,51 %	-9,57 %

Preglednica 5.22. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (g/l)	$9,9 \times 10^{-6}$	$9,9 \times 10^{-5}$	$9,9 \times 10^{-4}$	$9,9 \times 10^{-3}$
Ohranjen endotelij	0,393	0,318	0,779	0,269
Odstranjen endotelij	0,025	0,093	0,014	0,102

5.3.6. Vpliv etanolnega ostanka iz vina



Graf 5.15. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju etanolnega ostanka v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije etanolnega ostanka v kivetu (ml/l).

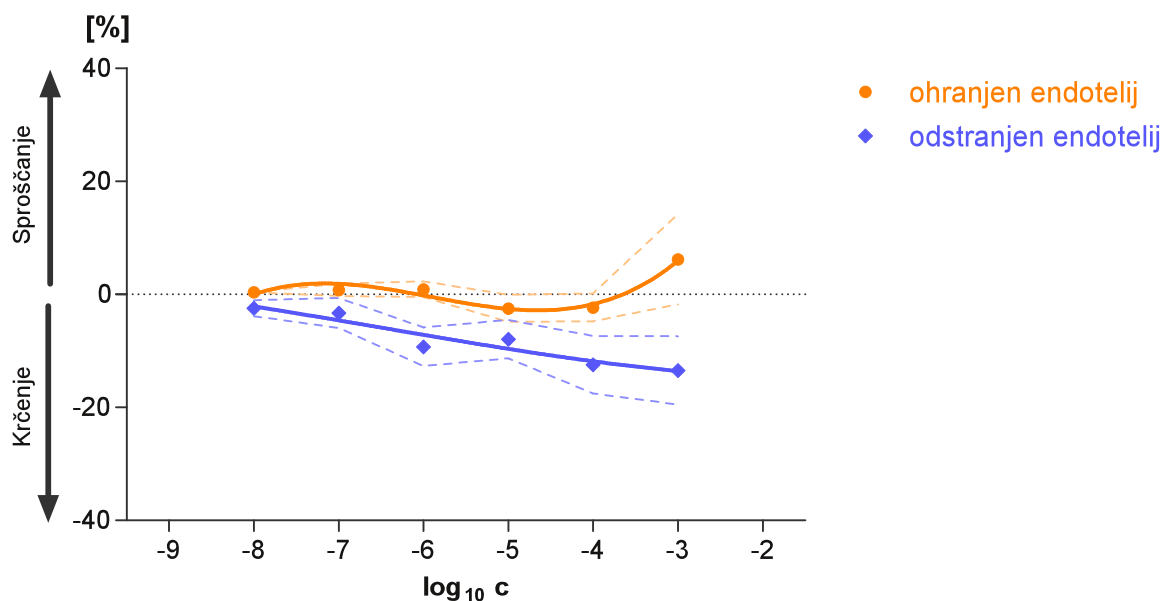
Preglednica 5.23. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z etanolnim ostankom.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	5	4
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	9,90 %	-3,47 %

Preglednica 5.24. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen)

Koncentracija spojine (ml/l)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Ohranjen endotelij	0,609	0,267	0,372	0,527	0,362	0,445
Odstranjen endotelij	0,746	0,857	0,112	0,803	0,161	0,065

5.3.7. Vpliv ostanka po destilaciji iz vina



Graf 5.16. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju ostanka po destilaciji v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije ostanka po destilaciji v kivetu (ml/l).

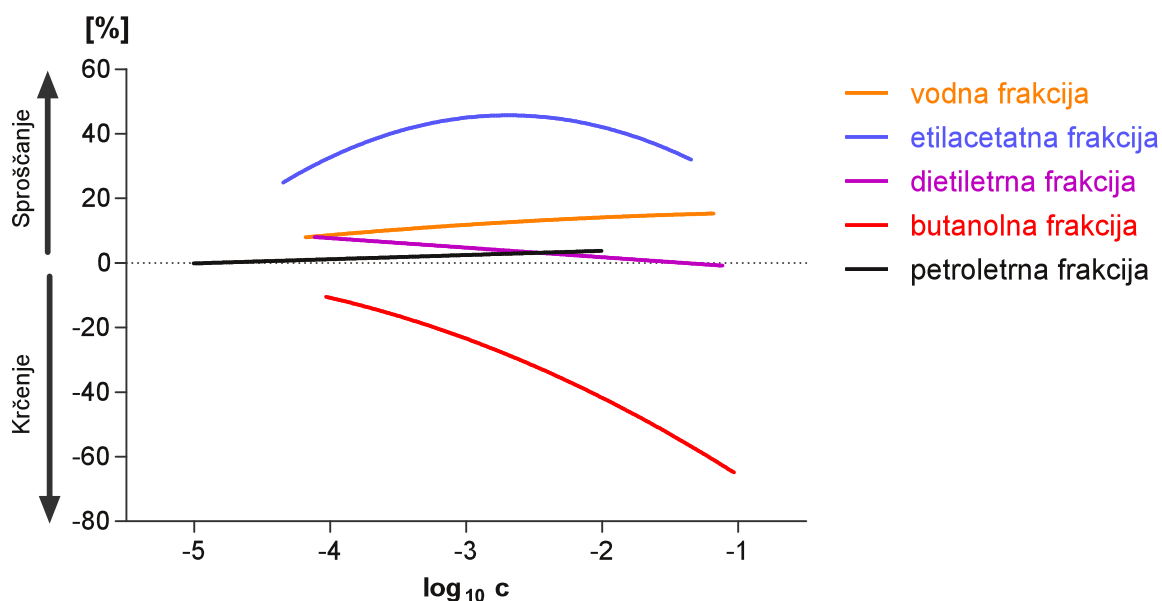
Preglednica 5.25. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z ostankom po destilaciji.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	4	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	6,15 %	-13,50 %

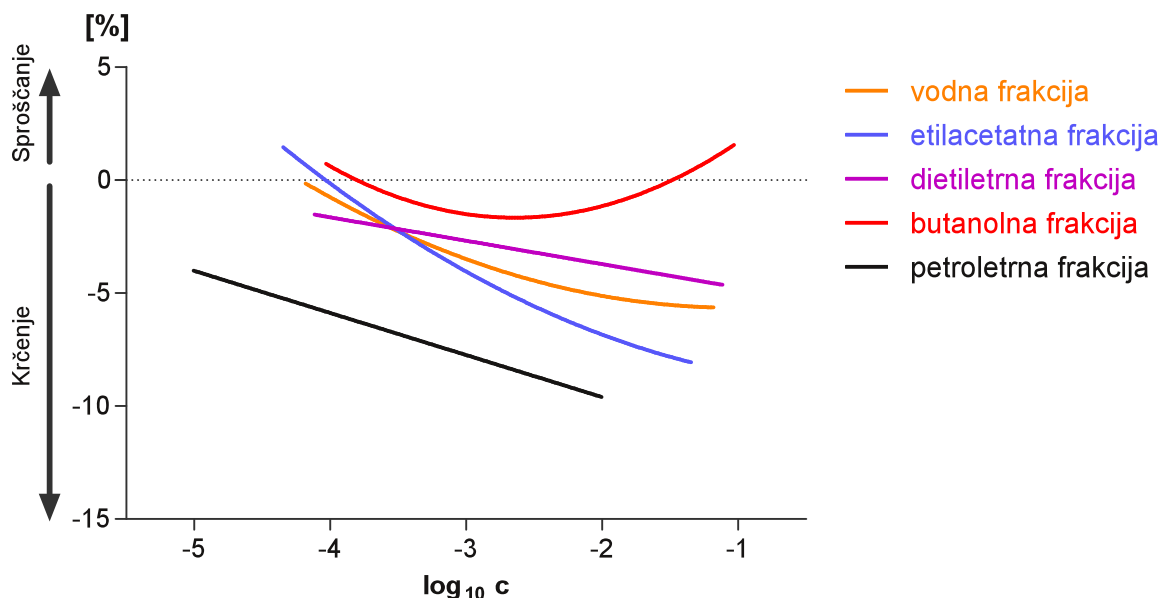
Preglednica 5.26. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen)

Koncentracija spojine (ml/l)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
Ohranjen endotelij	0,751	0,599	0,615	0,446	0,501	0,504
Odstranjen endotelij	0,161	0,352	0,052	0,121	0,068	0,089

5.3.8. Primerjava učinkov nekaterih vinskih frakcij

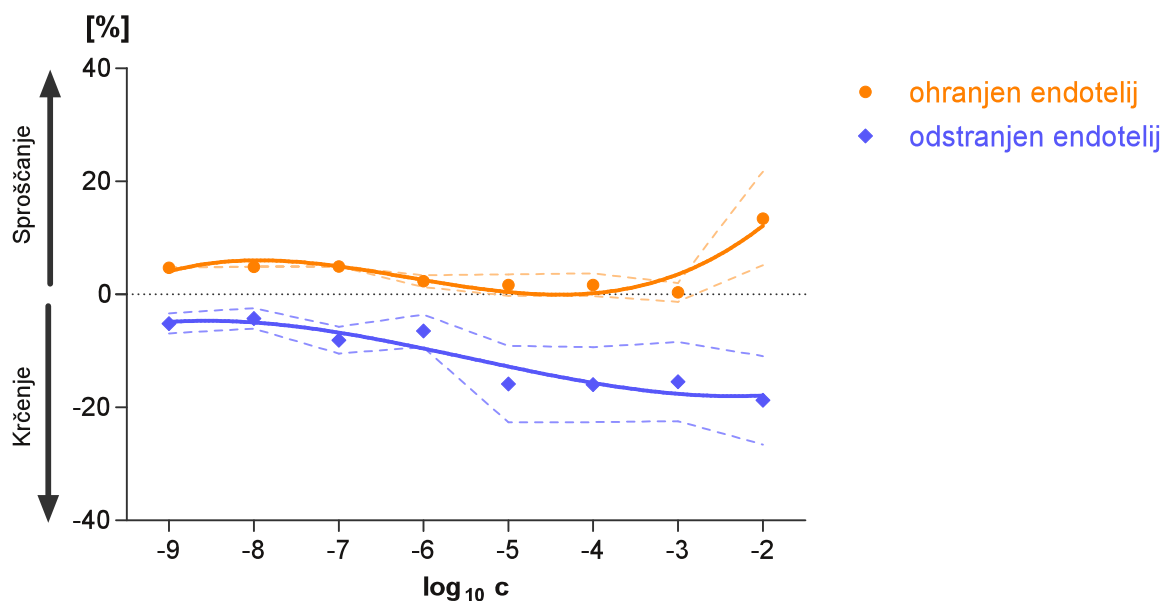


Graf 5.17. Primerjava odzivov predhodno skrčenih žilnih obročkov nekaterih vinskih frakcij, ki imajo ohranjen endotelij. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy) v odvisnosti od logaritma koncentracije vinske frakcije v kiveti (g/l).



Graf 5.18. Primerjava odzivov predhodno skrčenih žilnih obročkov nekaterih vinskih frakcij, ki imajo odstranjen endotelij. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije vinske frakcije v kiveti (g/l).

5.4. Vpliv dealkoholiziranega vina



Graf 5.19. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju vina v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy ali KCl) v odvisnosti od logaritma koncentracije vina v kiveti (ml/l).

Preglednica 5.27. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z dealkoholiziranim vinom.

	ohranjen endotelij	odstranjen endotelij
Število testiranih obročkov	4	5
Skrčitev obročkov	fenilefrin	KCl
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	14,91 %	-18,76 %

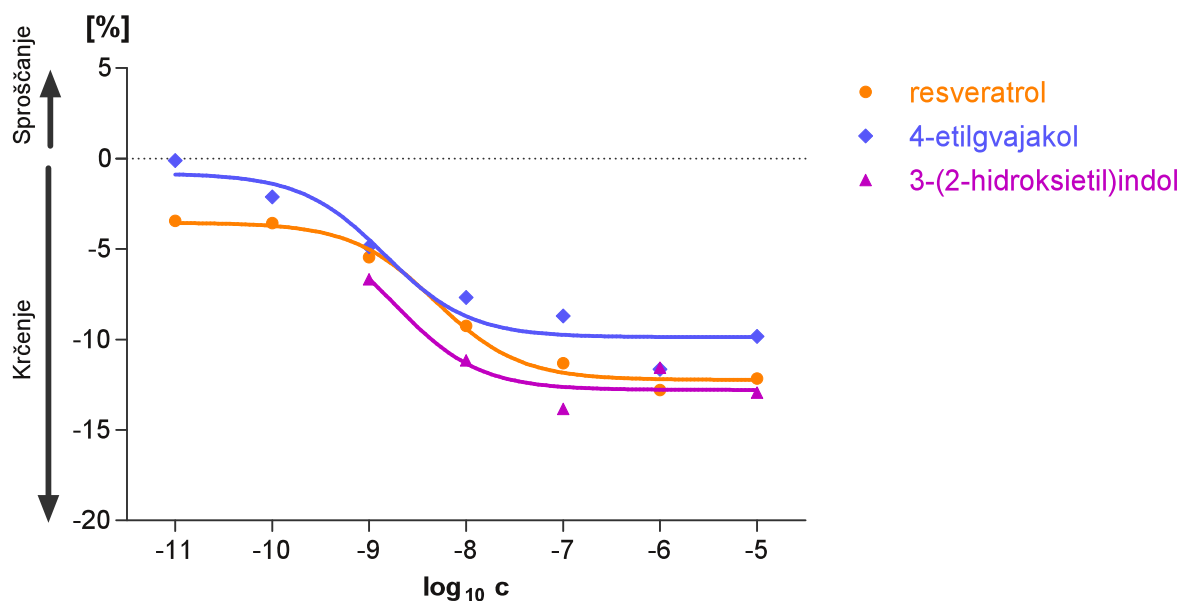
Preglednica 5.28. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje), ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (ml/l)	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Ohranjen endotelij	0,005	0,009	0,018	0,356	0,602	0,599	0,916	0,244
Odstranjen endotelij	0,057	0,175	0,039	0,168	0,098	0,093	0,112	0,096

5.5. Inkubacija z L-NNA

Ugotavljali smo sprostitvev žilnih obrokov z ohranjenim endotelijem, ki smo jih predhodno inkubirali v L-NNA ter skrčili s fenilefrinom. Preverili smo delovanje 3 snovi: resveratrola, 4-etilgvajakola in 3-(2-hidroksietil)indola.

5.5.1. Odziv izolirane aorte na dodajanje resveratrola, 4-etilgvajakola in 3-(2-hidroksietil)indola po predhodni inkubaciji z L-NNA



Graf 5.20. Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju resveratrola, 4-etilgvajakola in 3-(2-hidroksietil)indola v odvisnosti od logaritma koncentracije. Rezultati so navedeni kot relativna sprememba krčitve (%) glede na največjo skrčitev (s Phy) v odvisnosti od logaritmov koncentracij dodanih snovi v kiveto (mol/l). Krivulje predstavljajo srednje vrednosti vseh obročkov.

Preglednica 5.29. Pregled osnovnih podatkov pri poskusih z L-NNA.

	resveratrol	4-etilgvajakol	3-(2-hidroksietil)indol
Število testiranih obročkov	2	2	2
Skrčitev obročkov	fenilefrin	fenilefrin	fenilefrin
Sprostitev obročkov	acetilholin	acetilholin	acetilholin
Maksimalna vrednost spremembe	-12,80 %	-8,89 %	-13,83 %

Preglednica 5.30. Rezultati t-testa po koncentracijah (navedene so p vrednosti). (x – ni meritve,

■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija spojine (mol/l)	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Resveratrol	0,113	0,024	0,013	0,038	0,027	0,022	0,026
4-etilgvajakol	0,942	0,136	0,024	0,039	0,061	0,025	0,154
3-(2-hidroksietil)indol	x	x	0,015	0,006	0,001	0,107	0,080

6. Razprava

V raziskavi smo preučili vpliv nekaterih frakcij vina in izoliranih snovi, ki se nahajajo v vinu, na sprostitvev izoliranih žilnih obročkov podganje aorte. Sprostitveni odziv smo ugotavljali v odvisnosti od koncentracije snovi, stopnje redčitve vinske frakcije, prisotnosti in odsotnosti funkcionalnega endotelija.

6.1. Izolirani žilni obročki podganje aorte

Poskuse smo izvedli na podganah Wistar. Prednost uporabe manjših živalskih modelov pred večjimi živalmi je lažja in cenejša vzreja v kontroliranih laboratorijskih pogojih. Vpliv okolja na živali je bil nadzorovan s konstantno temperaturo, vlažnostjo zraka in z 12 urnim ritmom menjave dneva in noči. Opazili smo različne rezultate pri samcih in samicah. Pri samcih je bila sprostitvev žilnih obročkov večja kot pri samicah. Rezultatov nismo analizirali glede na spol živali in tako ne moremo trditi ali so razlike značilne. Temu bi se lahko izognili z uporabo izključno enega spola.

Opazovali smo direkten vpliv spojin na sproščanje predhodno skrčene izolirane žile. Prednost in vitro poskusa je, da imamo točno znano količino preiskovane snovi na mestu delovanja. Izognemo se vplivu ostalih organskih sistemov, metabolizmu prvega prehoda, ki lahko vplivajo na količino snovi, ki pride do receptorjev. Tako lahko ocenimo kakšne koncentracije dajejo odzive. Hkrati pa je to tudi slabost, saj nimamo nobene informacije, kaj se s snovmi dogaja v organizmu, če bi jih zaužili per os.

Za anestezijo smo uporabili uretan, ki v uporabljenih odmerkih nima vpliva na srčno-žilni sistem podgane v kasneje potekajočem poskusu. Postopek priprave žilnih obročkov je bil vedno enak. Pred začetkom poskusa smo preverili delovanje žilnih obročkov in ohranjenost endotelija. Prav tako smo na koncu poskusa preverili odzivnost žilnih obročkov.

Iz vsake podganje aorte smo izolirali 8 žilnih obročkov. Te smo nato vpeli v kivete in začeli z izvajanjem poskusa. Na žilnih obročkih, pridobljenih iz ene podgane, smo preverili 2 ali 3 preiskovane snovi oz. vinske frakcije. Tako smo vsako preiskovano snov in vinsko frakcijo

testirali na žilnih obročkih pridobljenih iz največ 4 podgan. Slabost takšnega načina izvajanja poskusa je, da nismo dobili informacije o delovanju vseh snovi na tkivo enega organizma (žilni obročki ene podgane). Smo pa lahko ocenili trend (ali predhodno skrčene žilne obročke sprošča, nanje nima vpliva ali pa jih še dodatno krči) določene preiskovane snovi. Med posamezniki znotraj vrste se lahko pojavijo precejšnje individualne razlike v delovanju organizma in njegovem odzivu na določeno snov.

6.2. Vpliv polifenolnih spojin in nekaterih snovi iz vina na sprostitvev žilnih obročkov

Opazovali smo kako nekatere polifenolne spojine in snovi, ki se nahajajo v vinu, sproščajo predhodno skrčene izolirane žilne obročke. V raziskavo smo vključili resveratrol, 4-etilgvajakol, 2-feniletanol, 4-alil-2,6-dimetoksifenol in 2,6-dimetoksifenol.

6.2.1. Poskusi z ohranjenim endotelijem

V prvem nizu poskusov smo poskuse izvedli z žilnimi obročki, ki so imeli ohranjen endotelij. Žilne obročke smo skrčili s fenilefrinom, nato pa smo v kiveto kumulativno dodajali posamezno spojino. Fenilefrin je adrenergični agonist in se veže na α_1 adrenergični receptor povezan z G-proteinom. Sledi cepitev PIP_2 v DAG in IP_3 . DAG ostane vezan na membrani, IP_3 pa se sprosti v citosol celice ter se veže na receptorje na sarkoplazmatskem retikulumu. Kalcijevi kanali se odprejo, koncentracija Ca^{2+} v celici se poveča in posledično se gladkomišična celica skrči (1).

Učinek smo opazili pri koncentracijah spojin 10^{-8} , 10^{-7} in 10^{-6} M. Vse spojine, ki smo jih vključili v našo raziskavo, so se pri teh koncentracijah značilno razlikovale od kontrolnih vrednosti. Ostale preverjene koncentracije niso imele takšnega vpliva na sproščanje. Največjo sprostitvev smo dosegli z 2-feniletanolom (maksimalna sprememba je 92,13 %) in 4-etilgvajakolom (maksimalna sprememba je 91,13 %) v mikromolarnem okolju. Podoben odzivni profil imata spojini 4-alil-2,6-dimetoksifenol (maksimalna sprememba pri koncentraciji 10^{-6} M je 71,86 %) ter 3-(2-hidroksietil)indol (maksimalna sprememba pri

koncentraciji 10^{-6} M je 64,02 %). Resveratrol doseže več kot 50 % sprostitve (maksimalna sprememba je 53,44 %), a ima učinek v širšem koncentracijskem območju. Visoko aktivnost opazimo v koncentracijah 1 nM pa do 1 μ M. V koncentraciji 10^{-5} M pa učinek tako resveratrola kot tudi 4-etilgvajakola pade pod 20 %. Kakšen je vpliv teh spojin (resveratrol in 4-etilgvajakol) pri višjih koncentracijah nismo preverjali. Izmed preizkušenih snovi ima 2,6-dimetoksifenol najslabši učinek (maksimalna vrednost spremembe je 44,89 % pri koncentraciji 10^{-6} M) na sproščanje predhodno skrčenih žilnih obročkov. Rezultati t-testa so povzeti v preglednici 6.1.

Preglednica 6.1. Vpliv spojin iz vina na predhodno skrčeno izolirano aorto podgane z ohranjenim endotelijem. (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje))

Koncentracija (mol/l)	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
resveratrol	0,240	0,246	0,061	0,010	0,011	0,014	0,217
4-etilgvajakol	0,145	0,114	0,128	0,009	0,004	0,010	0,293
2-feniletanol	x	0,577	0,372	0,024	0,016	0,021	x
3-(2-hidroksietil)indol	x	0,662	0,971	0,047	0,039	0,032	x
4-alil-2,6-dimetoksifenol	x	0,065	0,991	0,011	0,006	0,003	x
2,6-dimetoksifenol	x	x	x	0,041	0,022	0,013	x

6.2.2. Poskusi z odstranjenim endotelijem

V drugem nizu poskusov smo opazovali vpliv snovi na predhodno skrčene žilne obročke z odstranjenim endotelijem. Žilne obročke smo skrčili s KCl. KCl povzroči depolarizacijo membrane gladkomišične celice v steni krvne žile in odprtje napetostno odvisnih Ca^{2+} -kanalov tipa L. Ca^{2+} vdre v celico in gladkomišična celica se skrči. Mehanizem delovanja krčenja žilnega obročka s KCl je neodvisen od žilnega endotelija in receptorjev (1).

Spojine, ki smo jih kumulativno dodajali v kiveto, niso imele nikakršnega vpliva na sproščanje žilnih obročkov. Po dodajanju preiskovanih snovi se je žilni obroček še dodatno krčil. Največjo skrčitev je izzval 4-alil-2,6-dimetoksifenol in sicer -14,63 % pri koncentraciji 10^{-5} M. Temu sledita resveratrol (-10,23 %) in 3-(2-hidroksietil)indol (-8,23 %) pri

koncentraciji 10^{-5} M. Krčenje je značilno različno pri nekaterih koncentracijah preiskovanih snovi. Rezultati t-testa so povzeti v preglednici 6.2.

Preglednica 6.2. Vpliv spojin iz vina na predhodno skrčeno izolirano aorto podgane z odstranjenim endotelijem. (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija (mol/l)	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
resveratrol	x	x	x	0,199	0,463	0,153	0,411
4-etilgvajakol	0,268	0,761	0,058	0,539	0,099	0,291	0,971
2-feniletanol	x	0,069	0,574	0,031	0,255	0,028	0,186
3-(2-hidroksietil)indol	x	0,039	0,511	0,081	0,300	0,102	0,026
4-alil-2,6-dimetoksifenol	x	0,111	0,149	0,063	0,101	0,034	0,181
2,6-dimetoksifenol	x	x	x	0,040	0,112	0,077	x

Iz dobljenih rezultatov tako sklepamo, da spojine, ki se nahajajo v vinu in smo jih uporabili v naši raziskavi, delujejo na sproščanje žilnih obročkov preko endotelija in receptorjev, ki se tam nahajajo. Ker smo za skrčitev žilnih obročkov uporabili fenilefrin, ki sproži krčenje preko G-proteina, sklepamo, da tudi preiskovane spojine delujejo preko tega mehanizma.

6.3. Vpliv vinskih frakcij na sprostitvev žilnih obročkov

Tako kot pri prejšnjih poskusih smo tudi tukaj razdelili poskuse na dve skupini: tiste z ohranjenim endotelijem in tiste z odstranjenim endotelijem. Opazovali smo vpliv vinskih frakcij (vodna, etilacetatna, butanolna, petroletrna, dietiletrna, etanolni ostanek in ostanek po destilaciji) na predhodno skrčene žilne obročke podganje aorte. V vinskih frakcijah je prisotnih več različnih spojin in snovi, ki imajo vpliv na delovanje žile in posledično tudi izoliranega žilnega obročka.

Vinske frakcije so bile pripravljene na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo po standardni metodi. Način priprave frakcij je opisan v poglavju 3.4.2. Topilo so v postopku priprave izolacije frakcij odstranili. Pri pripravi matičnih raztopin smo suhe frakcije vina redčili z bidestilirano vodo. S kontrolnimi poskusi smo ovrednotili odziv žilnih obročkov na prisotnost topila.

6.3.1. Poskusi z ohranjenim endotelijem

Največjo sprostitev smo dosegli pri etilacetatni frakciji (maksimalna vrednost spremembe je 47,77 %). Tudi vodna frakcija (maksimalna vrednost je 15,71 %) in etanolni ostanek (maksimalna vrednost spremembe je 9,90 %) sproščata predhodno skrčene izolirane žilne obročke. Rezultati se statistično značilno ne razlikujejo od kontrolnih vrednosti. Petroletrna frakcija, dietiletrna frakcija in ostanek po destilaciji na sproščanje nimajo vpliva. Pri butanolni frakciji pa opazimo dodatno krčenje, ki doseže 64,62 % spremembe. Rezultati t-testa so povzeti v preglednicah 6.3 in 6.4.

Preglednica 6.3. Vpliv frakcij iz vina na predhodno skrčeno izolirano aorto podgane z ohranjenim endotelijem. (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen)

Koncentracija (g/l)	$5 \times 10^{-6}, 5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}, 5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3}, 5 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-2}, 5 \times 10^{-1}$
vodna frakcija	x	0,171	0,132	0,093	0,236
etilacetatna frakcija	x	0,096	0,130	0,144	0,239
dietiletrna frakcija	x	0,166	0,140	0,398	0,639
butanolna frakcija	x	0,688	0,416	0,231	0,154
petroletrna frakcija	0,393	0,318	0,780	0,269	x

Preglednica 6.4. Vpliv ostankov po destilaciji na predhodno skrčeno izolirano aorto podgane z ohranjenim endotelijem. (■ – rezultat ni statistično značilen)

Koncentracija (ml/l)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
etanolni ostanek	0,609	0,267	0,372	0,527	0,362	0,445
ostanek po destilaciji	0,751	0,600	0,615	0,446	0,501	0,504

6.3.2. Poskusi z odstranjenim endotelijem

Vinske frakcije pri poskusih z odstranjenim endotelijem na sproščanje predhodno skrčenih izoliranih žilnih obročkov niso vplivale. Pri vseh preizkušanih frakcijah opazimo dodatno krčenje žilnih obročkov, ki pa ne preseže 15 % spremembe. Največji odziv opazimo pri ostanku po destilaciji (maksimalna vrednost spremembe je -13,50 %) ter pri petroletrni frakciji (maksimalna vrednost spremembe je -9,57 %). Ostanek po destilaciji in preostale 4 vinske frakcije (vodna, etilacetatna, dietiletrna in butanolna) minimalno vplivajo na žilni

tonus in povzročijo le rahlo krčenje izoliranih žilnih obročkov. Rezultati t-testa so povzeti v preglednicah 6.5 in 6.6.

Preglednica 6.5. Vpliv frakcij iz vina na predhodno skrčeno izolirano aorto podgane z odstranjenim endotelijem. (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija (g/l)	$[5 \times 10^{-6}, 5 \times 10^{-5}]$	$[5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-4}]$	$[5 \times 10^{-4}, 5 \times 10^{-3}]$	$[5 \times 10^{-3}, 5 \times 10^{-2}]$	$[5 \times 10^{-2}, 5 \times 10^{-1}]$
vodna frakcija	x	0,476	0,635	0,002	0,209
etilacetatna frakcija	x	0,615	0,644	0,032	0,131
dietiletrna frakcija	x	0,211	0,605	0,061	0,414
butanolna frakcija	x	0,974	0,966	0,579	0,821
petroletrna frakcija	0,025	0,093	0,014	0,102	x

Preglednica 6.6. Vpliv ostankov po destilaciji na predhodno skrčeno izolirano aorto podgane z odstranjenim endotelijem. (■ – rezultat ni statistično značilen)

Koncentracija (ml/l)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
etanolni ostanek	0,746	0,857	0,113	0,803	0,161	0,065
ostanek po destilaciji	0,161	0,352	0,052	0,122	0,068	0,090

6.4. Vpliv dealkoholiziranega vina na sproščanje žilnih obročkov

Preverili smo kakšen vpliv ima dealkoholizirano vino na sproščanje izoliranih žilnih obročkov. Uporabili smo vino znamke Dingač. Z uporabo dealkoholiziranega vina smo izločili vpliv etanola na sproščanje žilnih obročkov. Pri dodatku neredčenega vina v kiveto pri žilnih obročkih, ki so imeli ohranjen endotelij je bila maksimalna vrednost sprostitve 14,91 %. Pri vseh koncentracijah vina, ki smo jih preverili, smo opazili rahlo sproščanje predhodno skrčenih žilnih obročkov z ohranjenim endotelijem. Pri poskusih z odstranjenim endotelijem pa je kumulativno dodajanje različnih koncentracij vina v kiveto žilne obročke še dodatno krčilo. Največja sprememba je bila -18,76 %. Razlike pri obeh vrstah poskusov so značilno različne od kontrolnih vrednosti samo pri nekaterih koncentracijah. Pri vinu je bila najvišja preizkušena koncentracija 2 %vol/vol vina v končni raztopini v kiveti.

Preglednica 6.7. Vpliv dealkoholiziranega vina na predhodno skrčeno izolirano aorto podgane. (■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (sproščanje), ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija (ml/l)	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
vino (ohranjen endotelij)	0,005	0,009	0,018	0,356	0,602	0,599	0,916	0,244
vino (odstranjen endotelij)	0,057	0,175	0,039	0,168	0,098	0,093	0,112	0,096

6.5. Vpliv nekaterih snovi izoliranih iz vina na sproščanje žilnih obročkov po predhodni inkubaciji z L-NNA

L-NNA je zaviralec NO-sintaze in tako preprečuje sproščanje žil preko endotelijsko povezanih mehanizmov (1). Žilne obročke, ki so imeli ohranjen endotelij, smo 30 min inkubirali v raztopini z L-NNA, nato pa smo jih skrčili s fenilefrinom. Preverjali smo sprostitveno sposobnost resveratrola, 4-etilgvajakola in 3-(2-hidroksietil)indola. Izolirani žilni obročki so se po kumulativnem dodajanju teh snovi še dodatno krčili. Za bolj optimalne podatke pa bi morali preveriti večje število žilnih obročkov.

Preglednica 6.8. Vpliv spojin iz vina na predhodno skrčeno izolirano aorto podgane, ki je bila inkubirana v L-NNA. (x – ni meritve, ■ – rezultat ni statistično značilen, ■ – rezultat je statistično značilen (krčenje))

Koncentracija (mol/l)	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
Resveratrol	0,113	0,024	0,013	0,038	0,027	0,022	0,026
4-etilgvajakol	0,942	0,136	0,024	0,039	0,061	0,025	0,154
3-(2-hidroksietil)indol	x	x	0,015	0,006	0,001	0,107	0,080

6.6. Kontrolni poskusi

S kontrolnimi poskusi smo preverili vpliv vazokonstriktorja, s katerim smo skrčili izolirane žilne obročke, ter vpliv topila, v katerem smo redčili preiskovane snovi in vinske frakcije. Sprostitev smo ugotavljali v 1-minutnih intervalih, ki sovpadajo z intervali dodajanja ostalih snovi. Količina DMSO v kivetu je bila manjša kot 0,001 % in kot taka nima vpliva na

sproščanje žilnih obročkov (68). Pri poskusih z ohranjenim endotelijem smo žilne obročke skrčili s fenilefrinom. Fenilefrin spontano disociira z receptorja in tako se gladka mišična celica sprošča. Spontana sprostitvev je bila manjša od 15 %. Pri poskusih z odstranjenim endotelijem smo žilne obročke krčili s KCl. Mehanizem krčenja je neodvisen od žilnega endotelija ter receptorjev in pri kontrolnih poskusih do sproščanja ni prišlo. Podatke, ki smo jih pridobili s kontrolnimi poskusi, smo uporabili za analizo rezultatov pridobljenih v raziskavi. S t-testom smo ugotavljali značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi snovmi.

7. Sklep in načrti za nadaljnje delo

V raziskavi smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Vino sprošča predhodno skrčene izolirane žilne obročke le, ko je prisoten funkcionalen žilni endotelij.
- Nekatere snovi, ki se nahajajo v vinu, sproščajo predhodno skrčene izolirane žilne obročke preko žilnega endotelija. Ko smo le tega odstranili, so spojine krčile žilne obročke.
- Izmed nekaterih preiskovanih snovi, ki se nahajajo v vinu pri poskusih z ohranjenim endotelijem, sta najboljše rezultate dosegla 2-feniletanol in 4-etilgvajakol. Vse preiskovane snovi značilno različno sproščajo predhodno skrčene žilne obročke v koncentracijah 10^{-8} M, 10^{-7} M in 10^{-6} M. V nižjih koncentracijah zaznamo učinek samo pri resveratrolu in 4-etilgvajakolu.
- Pokazali smo, da nekatere vinske frakcije (vodna frakcija, etilacetatna frakcija in etanolni ostanek), povzročajo od endotelija odvisno sprostitvev žilnih obročkov. Ko je bil endotelij odstranjen, te vinske frakcije na predhodno skrčene izolirane žilne obročke niso imele vpliva. Tako smo pokazali, da je za sprostitveno delovanje teh snovi nujen ohranjen endotelij, kar nakazuje mesta prijemališč preiskovanih snovi.
- Po predhodni inkubaciji žilnih obročkov z ohranjenim endotelijem v L-NNA, dodajanje resveratrola, 4-etilgvajakola in 3-(2-hidroksietil)indola v kiveto na sproščanje obročkov ni vplivalo. Tako smo potrdili naše hipoteze, da preiskovane snovi iz vina žilne obročke sproščajo preko endotelijskih mehanizmov in ne z neposrednim delovanjem na gladkomišično celico.

Rezultate našega dela, ki smo ga izvedli na izolirani torakalni aorti podgane, je smiselno preveriti še na drugih živalskih modelih. V naslednjih raziskavah bi lahko uporabili prašičje koronarne arterije ali izolirane žile drugih večjih sesalcev, ki so primernejši živalski model za primerjavo s človekom.

V naši raziskavi smo spremljali kakšen je takojšen vpliv snovi iz vina na sproščanje žilnih obročkov. V naslednjih raziskavah bi bilo smiselno preveriti tudi vpliv teh snovi po dolgotrajnem uživanju. Antioksidativne lastnosti polifenolov v vinu predstavljajo osnovo za preprečevanje endotelijske disfunkcije, ki je prva stopnja v razvoju srčno-žilnih bolezni. Z natančnim preučevanjem mehanizmov delovanja teh snovi se lahko nadajamo novih spojin vodnic in učinkovin za preprečevanje in zdravljenje srčno-žilnih obolenj.

8. Literatura

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. The Vascular System. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK, Editors. Pharmacology. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003. p. 285-305.
2. Statistični urad Republike Slovenije [homepage on the Internet]. Slovenia: Statistični urad Republike Slovenije; [cited 2011 April 10]. Available from: <http://www.stat.si/>
3. Wine Institute [homepage on the Internet]. San Francisco, CA: Wine Institute; [cited 2011 March 10]. Available from: <http://www.wineinstitute.org/resources/statistics>
4. Junqueira LCU, Carneiro J, editors. Basic Histology: Text And Atlas. 10th ed. New York: Lange Medical Books McGraw-Hill; 2003: 215-231.
5. Berne R, L.M., Smooth Muscle Physiology, Human Physiology. Mosby: St. Louis. 2004: 252-262.
6. Modesto Junior College [homepage on the Internet]. Modesto, CA: Modesto Junior College; [cited 2011 March 3]. Available from: <http://virtual.yosemite.cc.ca.us/rdroual/Lecture%20Notes/Unit%204/cardiovascular-blood%20vessels%20with%20figures.htm>
7. Thyberg, J. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. Int Rev Cytol 1996; 169: 183-265.
8. Trybus, K.M. Regulation of smooth muscle myosin. Cell Motil Cytoskeleton 1991; 18: 81-85.
9. Trybus, K.M., Warshaw, D.M. Regulation of the interaction between smooth muscle myosin and actin. J Cell Sci Suppl 1991; 14: 87-89.
10. Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 1993; 361: 315-325.
11. Berne R, L.M., Smooth Muscle Physiology, Human Physiology. Mosby: St. Louis. 2004: 252-262.
12. Vita JA. Tea consumption and cardiovascular disease: effects on endothelial function. J Nutr. 2003;133(10):3293S-3297S.
13. 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.

14. Poredos, P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol* 2002; 21: 109-116.
15. 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.
16. 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.
17. CV Physiology: Nitric Oxide [webpage on the internet]. Richard E. Klabunde; [cited 2011 October 25]. Available from:
<http://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011.htm>
18. L-NNA [webpage on the internet]. San Francisco, CA: Wikimedia Foundation, Inc.; [cited 2011 October 25]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/L-NNA>
19. St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979;1(8124):1017-1020.
20. German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:561-593.
21. Phillips, Rod (12 November 2002). *A Short History of Wine*. Harper Perennial. pp. 62–63.
22. Robinson, Jancis (28 April 2006). *Jancis Robinson's Wine Course: A Guide to the World of Wine*. Abbeville Press. p. 97
23. Johnson, H. (1989). *Vintage: The Story of Wine*. Simon & Schuster. pp. 11–6.
24. Vinakoper [homepage on the Internet]. Slovenia: Vinakoper d.o.o.; [cited 2011 May 12]. Available from: http://www.vinakoper.si/za_radovedne-vino.html
25. Vino Slovenija [homepage on the Internet]. Slovenia: Pomurski sejem d.d.; [cited 2011 April 10]. Available from:
http://www.vinoslovenija.si/index.php?option=com_content&view=article&id=19&Itemid=4
26. Koprski Refošk – Zdravje in užitek [homepage on the Internet]. Slovenia: Iztok Klenar, Vinakoper d.o.o.; [cited 2011 april 10]. Available from: <http://www.rex-mk.si/kozarec/refosk-klenar/6-predstavitev-rezultatov.html>

27. Grape [webpage on the Internet]. San Francisco, CA: Wikimedia Foundation, Inc.; [cited 2011 May 12]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Grape>
28. Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573-589
29. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):727-747.
30. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*. 2004;24(5A):2783-2840.
31. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. 1995;235(2):207-219.
32. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84(4):1381-1478.
33. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(4 Suppl S):37S-42S.
34. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84(4):1381-1478.
35. Vanzo A. 2008. Spoznavanje s kemijsko strukturo in nomenklaturu polifenolov v grozdju in vinu. Interno gradivo za predavanja pri predmetu Sekundarni metaboliti v grozju in vinu, Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo. Univerza v Novi Gorici. (11.3.2008).
36. Vrhovšek U. 2000. Bioaktivne polifenolne spojine grozdja in vina = Bioactive polyphenolic substances of grape and wine. V: RAJHER, Zdenko (ur.). *Strokovni posvet Vino - hrana, zdravje 2000*, Ljubljana, 5.4.2000. Zbornik referatov. Celje: Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 42-56.
37. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*. 1997;30(2):91-113.
38. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem*. 2002;50(11):3337-3340.

39. Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *J Agric Food Chem*. 2004;52(15):4713-4719.
40. Sanders TH, McMichael RW, Jr., Hendrix KW. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J Agric Food Chem*. 2000;48(4):1243-1246.
41. Siemann EH, Creasey LL. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic*. 1992;43(1):49-52.
42. Criqui MH, Ringel BL. Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet*. 1994;344(8939-8940):1719-1723.
43. Stilben [webpage on the Internet]. San Francisco, CA: Wikimedia Foundation, Inc.; [cited 2011 May 12]. Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Stilben>
44. Resveratrol [webpage on the Internet]. San Francisco, CA: Wikimedia Foundation, Inc.; [cited 2011 May 12]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>
45. Gescher AJ, Steward WP. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12(10):953-957.
46. Creasey LL, Coffee M. Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hortic Sci*. 1988;113(2):230-234.
47. Moreno-Labanda JF, Mallavia R, Perez-Fons L, Lizama V, Saura D, Micol V. Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. *J Agric Food Chem*. 2004;52(17):5396-5403.
48. Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM. Resveratrol decreases early signaling events in washed platelets but has little effect on platelet in whole blood. *Blood Cells Mol Dis*. 2000;26(2):144-150.
49. Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, et al. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004.
50. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106(13):1652-1658.
51. Fulda S, Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev*. 2006;30(3):217-223.

52. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 2000;141(10):3657-3667.
53. Tangkeangsirisin W, Serrero G. Resveratrol in the chemoprevention and chemotherapy of breast cancer. In: Bagchi D, Preuss HG, eds. *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*. Boca Raton: CRC Press; 2005:449-463.
54. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):14138-14143.
55. Bhat KP, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res*. 2001;61(20):7456-7463.
56. Walle T, Hsieh F, Delegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*. 2004;32(12):1377-1382.
57. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49(5):472-481.
58. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49(5):495-504.
59. Piver B, Berthou F, Dreano Y, Lucas D. Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. *Toxicol Lett*. 2001;125(1-3):83-91.
60. Regev-Shoshani G, Shoseyov O, Kerem Z. Influence of lipophilicity on the interactions of hydroxy stilbenes with cytochrome P450 3A4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323(2):668-673.
61. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, et al. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr*. 2004;80(1):15-21.
62. Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro*. 2001;15(1):3-6.
63. Chun OK, Kim DO, Lee CY. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J Agric Food Chem*. 2003;51(27):8067-8072.

64. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. J Nutr. 2003;133(10):3248S-3254S.
65. Flavonoid [webpage on the Internet]. San Francisco, CA: Wikimedia Foundation, Inc.; [cited 2011 May 12]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid>
66. Mazza G. and Miniati E. 1993. Antocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton. CRC Press: 326.
67. Wu, Xianli; Gu, Liwei; Prior, Ronald L.; McKay, Steve (2004). »Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity«. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (26): 7846–56.
68. Shiga, K.-i., Hirano, K., Nishimura, J., Niino, N., Naito, S. and Kanaide, H. (2007), Dimethyl sulphoxide relaxes rabbit detrusor muscle by decreasing the Ca^{2+} sensitivity of the contractile apparatus. British Journal of Pharmacology, 151: 1014–1024.