

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MIKELJ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MIKELJ

VPLIV IZVLEČKA IZ LUBJA BELE JELKE (*Abies alba* Mill.) NA FUNKCIONALNE
IN MORFOLOŠKE SPREMEMBE ARTERIJ PRI BUDRAH KRMLJENIH Z
ATEROGENO KRMO

EFFECT OF SILVER FIR (*Abies alba* Mill.) EXTRACT ON FUNCTIONAL AND
MORPHOLOGICAL ARTERIAL WALL CHANGES OF GUINEA PIGS FED WITH
ATHEROGENIC DIET

Diplomska naloga

Ljubljana, 2012

Eksperimentalni del diplomske naloge sem opravljala v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo, na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

Zahvale

Hvala mentorju, prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., za spodbude, nasvete in tehtne pripombe pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala somentorju, viš. zn. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, univ. dipl. biol., ki mi je omogočil delo v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo in za tehtne pripombe pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala Mojci Lunder, dr. med., za pomoč pri delu in nasvete pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala Petri Ponebšek za tehnično pomoč pri delu.

Hvala staršem, prijateljem in sošolcem za podporo, spodbude in lepe trenutke v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorja viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

Ana Mikelj

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

Ljubljana, 2012

VSEBINA

VSEBINA.....	II
POVZETEK.....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1 UVOD.....	1
1.1 Zgradba žilne stene	1
1.2 Kontrakcija in relaksacija gladkih mišičnih celic.....	2
1.3 Vloga endotelija pri uravnavanju žilne homeostaze	3
1.3.1 Dušikov oksid (NO)	4
1.3.2 Adrenergični in muskarinski receptorji	5
1.4 Ateroskleroza	6
1.4.1 Ateroskleroza aorte.....	6
1.4.2 Dejavniki tveganja za aterosklerozo.....	7
1.4.3 Endotelijska disfunkcija	8
1.4.4 Koncept ateroskleroze	9
1.4.5 Zapleti.....	10
1.4.6 Zdravljenje ateroskleroze.....	11
1.5 Budre ali morski prašički (<i>Cavia porcellus</i>).....	11
1.5.1 Vpliv različne hrane na metabolizem holesterola in lipoproteinov budre.....	12
1.5.2 Budre, modeli za aterosklerozo in vnetje.....	14
1.6 Polifenolne spojine.....	14
1.6.1 Flavonoidi	15
1.6.2 Čreslovine (tanini)	16
1.7 Zaščitni učinki polifenolnih spojin na srčno-žilni sistem	17
1.8 Bela jelka (<i>Abies alba</i> Mill.)	19
1.9 Izvlečki iz lubja iglavcev	20
1.9.1 Pknogenol®	20
1.9.2 Izvleček iz lubja bele jelke	21
2 NAMEN DELA.....	22
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 Sestavine prehrane za krmljenje buder	23
3.2 Reagenti in raztopine pri poskusih na izolirani aorti.....	23
3.3 Aparature, oprema in pribor	24

3.4	Izvleček iz lubja bele jelke	25
3.4.1	Priprava izvlečka	25
3.4.2	Odmerek izvlečka	25
3.5	Poskusne živali.....	26
3.6	Priprava aterogene krme	27
3.7	Krmljenje	28
3.8	Žrtvovanje živali.....	28
3.9	Naprava za poskuse na izoliranih žilah.....	29
3.10	Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder	30
3.10.1	Meritve sposobnosti relaksacije žilnih obročkov z acetilholinom.....	31
3.10.2	Meritve sposobnosti kontrakcije žilnih obročkov s fenilefrinom	31
3.11	Obdelava podatkov	32
3.12	Morfometrija	33
4	REZULTATI	35
4.1	Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder	35
4.1.1	Meritve sposobnosti relaksacije žilnih obročkov z acetilholinom.....	35
4.1.2	Meritve sposobnosti kontrakcije žilnih obročkov s fenilefrinom	38
4.2	Morfometrija	40
5	RAZPRAVA	42
5.1	Razprava o materialih in metodah	42
5.1.1	Sestavine prehrane za krmljenje buder	42
5.1.1.1	Aterogena krma.....	42
5.1.1.2	Izvleček iz lubja bele jelke	43
5.1.2	Poskusne živali.....	44
5.2	Razprava o rezultatih.....	46
5.2.1	Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder	46
5.2.1.1	Sposobnost relaksacije žilnih obročkov z acetilholinom	46
5.2.1.2	Sposobnost kontrakcije žilnih obročkov s fenilefrinom	48
5.2.2	Morfometrija	48
6	ZAKLJUČEK.....	51
7	LITERATURA.....	52

POVZETEK

Izhodišče: Srčno-žilne bolezni predstavljajo vodilni vzrok obolevnosti in smrtnosti v razvitem svetu. Dolgo je veljalo, da je ateroskleroza zgolj posledica kopičenja lipidov v žilni steni, danes pa se vse večji pomen pripisuje tudi vnetju in oksidativnemu stresu. Raziskave so pokazale, da vnos polifenolnih spojin zmanjša verjetnost nastanka srčno-žilnih bolezni. Polifenolne spojine so tudi glavne sestavine izvlečka iz lubja bele jelke. V dosedanjih *in vitro* raziskavah so pokazali, da ima izvleček iz lubja bele jelke močno antioksidativno aktivnost, zato smo predvidevali, da bi lahko imel ugoden vpliv tudi na funkcionalne in morfološke spremembe žil. Za preučevanje lastnosti izvlečka iz lubja bele jelke smo izbrali budre (*Cavia porcellus*), ki so se v raziskavah izkazale kot ustrezen živalski model za preučevanje procesa ateroskleroze, poleg tega pa imajo podoben lipoproteinski profil kot človek.

Namen: Namen raziskave je preučiti ali lahko z dodatkom izvlečka iz lubja bele jelke pri budrah, kronično krmljenih z aterogeno krmo, izboljšamo oz. preprečimo nastanek funkcionalnih in morfoloških sprememb arterij.

Metode: Budre smo razdelili v tri skupine in jih krmili z različnimi vrstami krme (osnovna, aterogena ter aterogena krma z izvlečkom iz lubja bele jelke). Po 8 tednih krmljenja smo budre usmrtili ter jim izolirali torakalno in abdominalno aorto. Izolirano torakalno aorto smo namestili na napravo za izolirane žile in izmerili sposobnost relaksacije in kontrakcije. Sposobnost relaksacije smo preučevali tako, da smo obročke najprej skrčili z 0,1 mmol/L fenilefrinom, nato pa smo izzvali relaksacijo s kumulativnim dodajanjem acetilholina. Sposobnost kontrakcije smo preučevali s kumulativnim dodajanjem fenilefrina. Na abdominalni aorti buder smo določali prisotnost maščobnih leh tako, da smo aorte najprej vzdolžno prerezali, nato pa jih pobarvali z raztopino Oil Red O, s pomočjo katere so se maščobne lehe prikazale. Izmerjene vrednosti smo primerjali z uporabo dvofaktorske analize variance z Bonferronijevim post-hoc testom.

Rezultati: Dokazali smo, da se relaksacijske sposobnosti vseh treh skupin med seboj značilno razlikujejo. Dodatek izvlečka iz lubja bele jelke aterogeni krmi je značilno izboljšal relaksacijo torakalne aorte v primerjavi s skupino, ki je prejela le aterogeno krmo. Največjo sposobnost relaksacije je imela skupina, ki je prejela osnovno krmo. Sposobnost kontrakcije se med skupinami ni statistično značilno razlikovala. Pri skupini,

ki je prejela izvleček iz lubja bele jelke, je bila površina aterosklerotičnih leh značilno manjša kot pri skupini, ki je prejela aterogeno krmo.

Zaključki: V raziskavi smo potrdili, da so budre primeren živalski model za preučevanje aterosklerotičnih sprememb žil, saj smo jim uspešno inducirali tako funkcionalne kot morfološke spremembe na žilah. Dokazali smo, da kronična terapija z izvlečkom iz lubja bele jelke, dodanim k aterogeni krmi, izboljša funkcionalne in morfološke lastnosti aorte buder.

SEZNAM OKRAJŠAV

AC	adenilatna ciklaza
ACAT	acil-CoA-holesterol-aciltransferaza
ACE	angiotenzin konvertaza
ApoB	apolipoprotein B
ATP	adenozin trifosfat
BH₄	tetrahidrobiopterin
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CD40L	topni vnetni citokini
CETP	holesteril-ester prenosni protein
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
CRP	C-reaktivni protein
CSFs	hematopoetski kolonije stimulirajoči faktorji
DAG	diacilglicerol
EDCF	krčitveni dejavnik endotelijskega izvora
EDHF	hiperpolarizacijski dejavnik endotelijskega izvora
EDRF	sprostitveni dejavnik endotelijskega izvora
EGCG	epigalokatehin-3-galat
FGF	fibroblastni rastni faktor
GC	gvanilatna ciklaza
HDL	lipoproteini visoke gostote

HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koencin A
ICAM-1	medcelična adhezijska molekula-1
IL	interlevkini
IP₃	inozitol-3-fosfat
LCAT	lecitin-holesterol-acil-transferaza
LDL	liproteini nizke gostote
LPL	lipoprotein lipaza
MCP-1	monocitni kemotaktični protein 1
MCSF	makrofagno kolonije stimulirajoči dejavnik
MLCK	kinaza lahke verige miozina
NO	dušikov oksid
NOS	NO sintaza
O₂^{·-}	superoksidni anion
ONOO⁻	peroksinitrit
PGE₂	prostaglandin E ₂
PGI₂	prostaciklin
PKA	proteinska kinaza A
PKC	proteinska kinaza C
PLA₂	fosfolipaza A ₂
PLC	fosfolipaza C
RNS	reaktivne dušikove spojine
ROS	reaktivne kisikove spojine

SR	sarkoplazemski retikulum
TF	tkivni faktor
TGF-β	transformirajoči rastni faktor β
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze α
TPA	tkivni aktivator plazminogena
TXA₂	tromboksan A ₂
VCAM-1	adhezijske molekule žilnih celic
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote
vWF	von Willebrandov faktor

1 UVOD

1.1 Zgradba žilne stene

Srčno-žilni sistem sestavljajo poleg srca, ki kri prečrpava, še arterijski sistem, kapilarni sistem, sistem ven in limfni sistem (1). Žile se med seboj razlikujejo v zgradbi stene in funkciji. Pri arterijah je stena debelejša, svetlina pa manjša, pri venah pa je stena tanjša, svetlina pa širša (1). Vene so zaradi raztegljivosti žilne stene rezervoar krvi, ki je na voljo za različne potrebe v organizmu, arterije pa razporejajo kri po telesu in uravnavajo krvni tlak (2).

Stena arterij je sestavljena iz treh plasti:

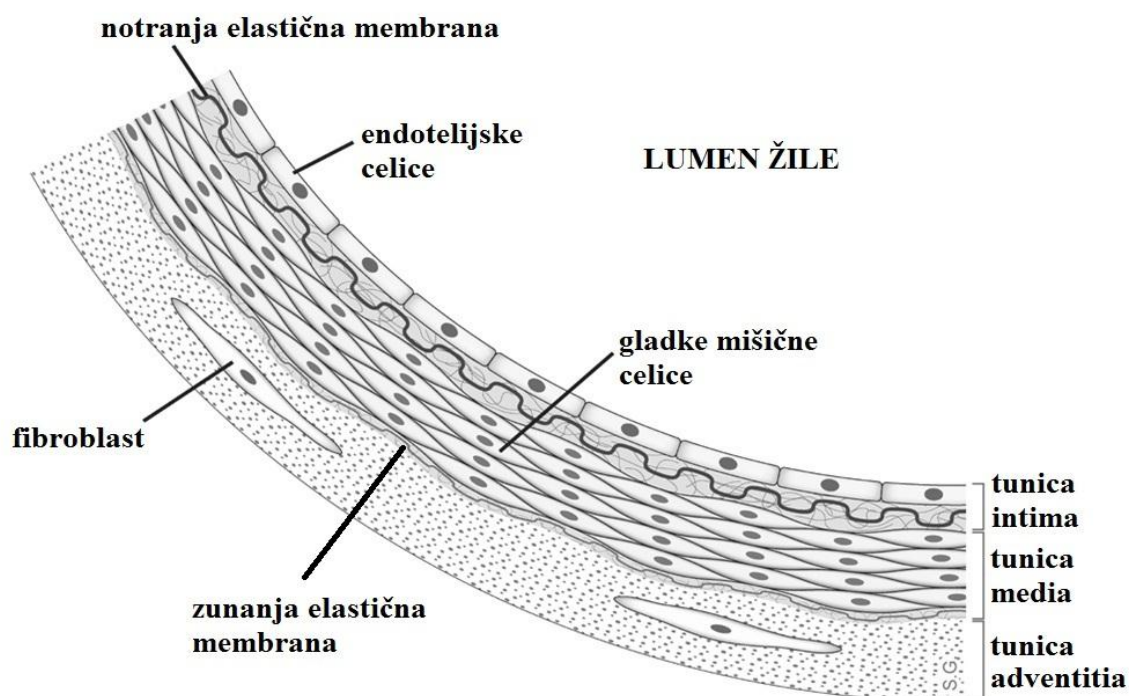
Tunika intima (Tunica intima) je notranja plast žilne stene. Zgrajena je iz ploščatih epitelnih celic (endotelij), ki se zaključujejo na bazalni membrani, ter iz subendotelija. Endotelne celice obdajajo svetlino žile (so v stiku s krvjo) in ležijo tesno skupaj, zato je površina notranjega dela žile gladka. Subendotelij je zgrajen iz gladkih mišičnih celic ter notranje fenestrirane in elastične membrane (*membrana elastica interna*), ki predstavlja mejo med intimo in medijo ter omogoča prehod hranilnih snovi z difuzijo v globlje plasti arterijske stene (1, 3).

Tunika medija (Tunica media) je sestavljena iz krožno razporejenih slojev gladkih mišičnih celic, razteza se od notranje do zunanje elastične membrane. Zunanja elastična membrana je sestavljena iz elastina in ločuje tuniko medijo od adventicije. Med gladkimi mišičnimi celicami se nahajajo elastična vlakna, kolagen in proteoglikani (1, 3).

Tunika adventicija (Tunica adventitia) je zunanja plast žilne stene, sestavlja jo kolagensko vezivo in nekaj elastičnih vlaken. Meji neposredno na vezivo, ki obdaja žilo. V večini arterij je tanka, v venah pa debelejša (1, 3). V tuniki adventiciji večjih arterij in ven (tudi v mediji) se nahajajo drobne žile (arteriole, kapilare, venule), ki jih imenujemo *vasa vasorum*. Njihova naloga je oskrbovanje žilne stene s hranilnimi snovmi in kisikom (1). Gladke mišične celice v tuniki adventiciji oživčujejo nemielinizirani simpatični živčni končiči. Glavni živčni prenašalec je noradrenalin, ki povzroči vazokonstrikcijo. V primerjavi z venami so arterije bolj oživčene z vlakni simpatičnega živčnega sistema. Arterije pa vsebujejo tudi vlakna holinergičnega parasimpatičnega živčnega sistema. Tu je

prenašalec acetilholin, ki povzroča sproščanje gladkih mišičnih celic in posledično vazodilatacijo (1, 4).

Glede na zgradbo stene in premer delimo arterije v tri tipe: arterije mišičnega tipa (brahialna, renalna), arterije elastičnega tipa (aorta in veje, ki izhajajo iz aortnega loka, skupna karotidna arterija, ipd.) in arteriole (1). Arterije elastičnega tipa so prevodne arterije in blažijo nihanja v pretoku krvi. Elastična vlakna so v obliki fenestriranih membran, ki dajejo arteriji elastičnost, tunika intima je debelejša (4, 5). Arterije mišičnega tipa s krčenjem in sproščanjem gladkih mišičnih celic v mediji vodijo kri v organe. Elastičnih vlaken je v teh arterijah malo, glavna značilnost je debela tunika medija, sestavljena večinoma iz gladkih mišičnih celic (5).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe arterijske žilne stene. Prirejeno po (6).

1.2 Kontrakcija in relaksacija gladkih mišičnih celic

Gladke mišične celice prejemajo živčne dražljaje iz avtonomnega živčnega sistema. Njihova kontraktilnost je odvisna od hormonov, avtokrinih, parakrinih snovi, ter ostalih lokalnih tkivnih faktorjev (7), ki delujejo tako, da povečajo koncentracijo Ca^{2+} v citosolu gladke mišične celice. Nekateri dejavniki povečajo koncentracijo Ca^{2+} v citosolu preko

depolarizacije membrane gladke mišične celice, kar povzroči aktivacijo napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalov na sarkolemi. Vdor Ca^{2+} lahko sproži kontrakcijo ali aktivira Ca^{2+} kanale na sarkoplazemskem retikulumu (SR), kar dodatno poveča koncentracijo Ca^{2+} v citosolu. Koncentracija citosolnega Ca^{2+} pa lahko poraste tudi preko drugih mehanizmov. Nekateri hormoni in nevrottransmiterji namreč aktivirajo fosfolipazo C (PLC) (8), katere aktivacija poteče preko receptorjev sklopljenih z G-proteinom. PLC je encim, ki katalizira nastanek inozitoltrifosfata (IP_3) in diacilglicerola (DAG). IP_3 povzroči odprtje z IP_3 sklopljenih Ca^{2+} kanalov na membrani SR, posledično se poveča koncentracija citosolnega Ca^{2+} . DAG pa skupaj s Ca^{2+} aktivira protein kinazo C (PKC), ki ima prav tako kontraktilen učinek, saj fosforilira Ca^{2+} kanale in ostale proteine, ki regulirajo kontrakcijo (7, 8). Ca^{2+} sproščen preko prej opisanih mehanizmov, se veže na kalmodulin, kar aktivira kinazo lahke verige miozina (MLCK). Slednja fosforilira lahko verigo miozina in s tem omogoči interakcijo miozina z aktinom in ciklizacijo prečno povezanih aktinsko-miozinskih mostičkov, posledično se mišica skrči. Kontrakcija gladkih mišic poteka, dokler je na voljo dovolj velika koncentracija Ca^{2+} in energija kontrakcije (adenozin trifosfat (ATP)), kar omogoča fosforilacijo miozina (7, 8). Tonus gladkih mišic je odvisen od ravnotežja med vazokonstriktorji in vazodilatatorji (9).

Relaksacija gladkih mišic je rezultat odstranitve kontraktilnega stimulusa ali direktnega vpliva določene substance, ki povzroča relaksacijo. Ne glede na to, pa se relaksacija zgodi, ko citosolna koncentracija Ca^{2+} pade zaradi črpanja Ca^{2+} nazaj v SR s pomočjo Ca^{2+} črpalke in izstopanja Ca^{2+} iz celice preko $3\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ antiporterja in Ca^{2+} črpalke. Zmanjšana koncentracija Ca^{2+} v celici privede do inhibicije MLCK. Prav tako k inhibiciji MLCK prispeva tudi ciklični adenzin monofosfat (cAMP). Vse to vodi v defosforilacijo miozina, ki jo še pospeši od cGMP (ciklični gvanozin monofosfat) odvisna miozinska fosfataza. Gladka mišica se sprosti (7, 8). MLCK in miozinska fosfataza sta ves čas prisotni v celici in sta uravnoteženi, kar vodi bodisi h kontrakciji ali relaksaciji (10).

1.3 Vloga endotelija pri uravnavanju žilne homeostaze

Endotelijske celice imajo pomembno vlogo pri krvni in žilni homeostazi (3), saj se aktivno odzivajo na avtokrine in parakrine dražljaje in s tem uravnavajo žilni tonus, vplivajo na strjevanje krvi ter uravnavajo protivnetno in mitogeno funkcijo žilne stene (9, 11). Endotelij predstavlja selektivno prepustno bariero, skozi katero prehajajo majhne in velike molekule z različnimi transportnimi mehanizmi iz krvi v tkiva in obratno. Endotelij preko

vpliva na izražanje adhezijskih molekul na njegovi površini, interakcije limfocitov s površino endotelija in izločanjem interlevkinov (IL-1, IL-6, IL-8) uravnava imunski odgovor in vnetje. V endoteliju poteka tudi sinteza nekaterih rastnih dejavnikov (hematopoetski kolonije stimulirajoči faktorji-CSFs, fibroblastni rastni faktor-FGF, ipd.), zaviralcev rasti (heparin, transformirajoči rastni faktorji-TGF β) ter deaktivacija nekaterih hormonov (noradrenalin, trombin, bradikinin, ipd.). Lipoproteini nizke gostote (LDL) in lipoproteini zelo nizke gostote (VLDL), ki vsebujejo veliko holesterola, se v endoteliju zaradi povečanega vnetja in oksidativnega stresa oksidirajo. V fizioloških razmerah endotelijske celice proizvajajo antikoagulate (trombomodulin idr.) in antitrombotične snovi (prostaciklin (PGI_2) in tkivni aktivator plazminogena (TPA)). Poškodovane endotelijske celice pa izločajo protrombogene snovi (von Willebrandov faktor (vWF), inhibitor aktivacije plazminogena, kolagen). Endotelij preko uravnavanja izločanja vazokonstriktorjev in vazodilatatorjev vpliva na tok krvi in širino žilnega lumna (3). Vazodilatatorji povzročajo sprostitvev gladkih mišičnih celic, mednje uvrščamo PGI_2 , PGE_2 (prostaglandin E_2), NO (dušikov oksid), peptide (C-natriuretični peptid) in hiperpolarizacijski dejavnik endotelijskega izvora (EDHF) (10). Slednji vključuje še ne v celoti poznane posrednike, ki z vplivom na sprostitvev gladkih mišičnih celic povzročajo vazodilatacijo. Mednje prištevamo nekatere presnovke arahidonske kisline in endokanabinoide. Preko povečanja izločanja kalija iz celice povzročajo hiperpolarizacijo celične membrane (9). Nasprotno pa vazokonstriktorji povzročijo skrčitev gladkih mišičnih celic, mednje spadajo angiotenzin II (nastaja iz angiotenzina I z encimom angiotenzin konvertaza (ACE), ki se nahaja na celični membrani endotelijskih celic), endotelin, tromboksan A_2 (TXA_2), nekateri vmesni produkti sinteze prostaglandinov, urotenzin II in drugi krčitveni dejavniki endotelijskega izvora (EDCFs) (1, 9, 10, 12).

1.3.1 Dušikov oksid (NO)

Dušikov oksid je bil sprva poimenovan sprostitveni dejavnik endotelijskega izvora (EDRF), saj so bili mnjenja, da vazodilatacijo povzroča le ena spojina, ki jo izloča endotelij (9, 10). Dušikov oksid nastaja iz L-arginina in molekularnega O_2 , reakcijo katalizira konstitutivna endotelna NO-sintaza (eNOS). Poznamo več oblik NO-sintaz (NOS): nevronska NOS (nNOS), inducibilna NOS (iNOS), ki nastaja v celični membrani levkocitov, v celicah endotelija in kardiomiocitih ter gladkih mišičnih celicah v patoloških stanjih (npr. ishemija, vnetje) ter konstitutivna endotelna NOS (eNOS), ki nastaja v celicah

endotelija in trombocitih, njeno delovanje pa je odvisno od Ca^{2+} vezanega na kalmodulin (9, 10). Dušikov oksid je lipofilna, parakrino delujoča molekula s kratko življenjsko dobo, saj se hitro deaktivira z oksidacijo v nitrit in nitrat, ki se izločata z urinom (9, 10, 12). Po sprostitvi iz endotelija NO prehaja v gladke mišične celice in povzroči relaksacijo preko aktivacije od hema odvisne topne gvanilatne ciklaze (GC), ki katalizira nastanek cGMP (9, 12). Povišana koncentracija cGMP privede do defosforilacije miozina in s tem do relaksacije gladkih mišičnih celic (8). NO pa kaže tudi protivnetne učinke: zavira celične adhezijske molekule (VCAM-1, ICAM-1), izražanje tkivnega faktorja (TF) ter sprostitve kemokinov. Poleg tega pa zavira tudi agregacijo trombocitov, rast gladkih mišičnih celic žil in ima fibrinolitičen učinek (9, 12, 13). Kateholamini, vazopresin, bradikinin, histamin in snovi, ki se sprostijo iz agregiranih trombocitov povečajo sproščanje NO (12).

1.3.2 Adrenergični in muskarinski receptorji

Gladke mišične celice žil so oživčene z vlakni simpatičnega in parasimpatičnega živčnega sistema (1). V gladkih mišicah žil in na površini endotelija tako najdemo adrenergične α_1 , α_2 in β_2 receptorje ter muskarinske receptorje M_3 . Ti receptorji so membranski receptorji, sklopljeni z znotrajceličnim efektorskim sistemom preko G-proteina, zato jih imenujemo z G-proteinom sklopljeni receptorji oz. metabotropni receptorji (10). Efektorski sistemi so proteini, ki so sposobni prevesti spremembo konformacije receptorja, ki jo povzroči njegova aktivacija, v biokemijski odgovor znotraj celice. Stimulacija adrenergičnih receptorjev α_1 povzroči preko G-proteina serijo dogodkov, ki preko aktivacije PLC in posledično preko DAG in IP_3 privedejo do povečanja koncentracije Ca^{2+} in vazokonstrikcije (14).

Adrenergični receptorji α_2 so sklopljeni z več efektorskimi sistemi (15). Stimulacija teh receptorjev inhibira adenilatno ciklazo (AC) preko G-proteina (14, 15). To privede do znižanja koncentracije cAMP ter do inhibicije Ca^{2+} -kanalov in posledično vazodilatacije (10). Preko G-proteina pa poteče tudi aktivacija K^+ -kanalov, ki vodi v hiperpolarizacijo membrane. Stimulacija adrenergičnih receptorjev α_2 pa lahko vodi tudi v vazokonstrikcijo. Preko aktivacije PLC in mobilizacije arahidonske kisline se poveča hidroliza fosfoinozitida in naraste intracelularna koncentracija Ca^{2+} , kar vodi v vazokonstrikcijo. Obstajajo pa še drugi mehanizmi, ki so posledica aktivacije adrenergičnih receptorjev α_2 , vendar jih veliko še ni pojasnjenih (15).

Vezava agonista na adrenergični receptor β_2 povzroči aktivacijo AC, ki katalizira nastanek cAMP iz ATP. cAMP je sekundarni prenašalec in fosforilira proteine (14, 15, 16). Poleg tega se aktivira tudi proteinska kinaza A (PKA). Vse to privede do znižanja koncentracije Ca^{2+} (15, 16).

Stimulacija muskarinskih receptorjev M_3 na endotelijskih celicah žilne stene povzroči preko G-proteina aktivacijo PLC, kar vodi v nastanek IP_3 in DAG. IP_3 povzroči sprostitve Ca^{2+} iz endoplazmatskega retikuluma, Ca^{2+} se poveže s kalmodulinom, to pa aktivira od kompleksa Ca^{2+} -kalmodulin odvisno endotelijsko NOS. NO difundira v gladko mišično celico žil in povzroči njihovo relaksacijo. Muskarinski receptorji M_3 pa se nahajajo tudi v gladkih mišicah žil. Tu poteče enak mehanizem po aktivaciji, le da Ca^{2+} , ki se prav tako sprosti po delovanju IP_3 , povzroči kontrakcijo (15, 16). Stimulacija muskarinskega receptorja M_3 aktivira tudi fosfolipazo A_2 , kar vodi v sproščanje arahidonske kisline in sinteze eikozanoidov. To pa povzroči stimulacijo AC in povečanje cAMP ter zvečano koncentracijo Ca^{2+} in posledično kontrakcijo (15).

1.4 Ateroskleroza

Ateroskleroza je kronični napredujoč proces kopičenja lipidov, veziva, netopnih kalcijevih soli, celičnih ostankov in vnetnih metabolitov v intimi žilne stene. Kopičenje spremlja tudi proces vnetja, ki poleg intime zajame tudi medijo in adventicijo arterijske stene. Proces ateroskleroze prizadene predvsem velike in srednje velike arterije elastičnega in mišičnega tipa. Večinoma se prične že v otroštvu oz. mladosti, nato pa s starostjo postopoma napreduje. Proces ateroskleroze je dolga leta klinično neopazen, vse dokler ne privede do pomembne zožitve arterijske svetline in posledičnega zmanjšanja arterijskega pretoka, ko postane klinično zaznaven (napredovala faza ateroskleroze) (11).

1.4.1 Ateroskleroza aorte

Aorta je največja arterija v telesu, ki odvaja kri od srca do organov. Torakalna aorta poteka v prsnem košu (iz ascendentne aorte se nadaljuje v aortni lok in nato v descendentno aorto) in se pod prepono nadaljuje v trebušno (abdominalno) aorto. Iz aorte izhajajo večje žile, ki dovajajo kri notranjim organom (1). Proces ateroskleroze zgodaj prizadene aorto, zato je slednja najpogosteje uporabljen model za preučevanje procesa ateroskleroze in terapevtskih pristopov (17).

1.4.2 Dejavniki tveganja za aterosklerozo

V številnih raziskavah so pokazali, da prisotnost dejavnikov tveganja poveča verjetnost za nastanek ateroskleroze, saj so ti dejavniki pogostejše prisotni pri osebah z aterosklerozo kot pa v zdravi populaciji. Velja, da več kot ima oseba dejavnikov tveganja, večja je verjetnost razvoja ateroskleroze v zgodnjih življenjskih obdobjih (18). Med dejavnike tveganja uvrščamo:

- dejavniki, ki so posledica družbenih vplivov in načina življenja (nanje lahko vplivamo s spremembo življenjskih navad): kajenje, stres, telesna neaktivnost, hrana bogata z nasičenimi maščobnimi kislinami in holesterolom, povišan indeks telesne mase (19).
- dejavniki, ki izhajajo iz bolezenskih stanj:
 - dislipidemija (tveganje povečajo zvečana koncentracija LDL holesterola (lipoprotein nizke gostote) in/ali trigliceridov ter znižana raven HDL holesterola (lipoprotein visoke gostote) oz. povečano razmerje LDL/HDL)
 - sladkorna bolezen (glikacija poveča proces vnetja in nastajanje vnetnih posrednikov)
 - zvišan krvni tlak (arterijska hipertenzija)
 - okužbe z nekaterimi virusi in bakterijami (*Helicobacter pylori*, *Chlamidia pneumoniae*, Citomegalovirus in Herpes simplex virus (19)).
- genetski dejavniki in biološki vplivi (nanje nimamo vpliva):
 - spol (ženske pred menopavzo obolevajo redkeje kot enako stari moški)
 - starost
 - genetska podvrženost (19).

Ugotovili so, da se približno 20 % srčno-žilnih dogodkov zgodi v odsotnosti zgoraj naštetih dejavnikov, zato intenzivno iščejo druge dejavnike, predvsem tiste, ki so vpleteni v proces nastajanja plaka (20, 21). Preučujejo C-reaktivni protein (CRP), medcelične adhezijske molekule-1 (ICAM-1), adhezijske molekule žilnih celic-1 (VCAM-1), topne vnetne citokine CD 40L, interlevkina IL-12, IL-18, fosfolipazo A₂ povezano z lipoproteinom, mieloperoksidazo, osteoprogenin, z nosečnostjo povezan protein A ipd. (21, 22).

1.4.3 Endotelijska disfunkcija

Kako se aterosklerotični proces prične obstajajo številne teorije, vendar je najbolj uveljavljena hipoteza o poškodbi endotelija (11). Sprožilne dejavnike, ki lahko privedejo do poškodbe endotelija delimo na fizikalne (turbulentni tok krvi, hipertenzija), kemične (ogljikov monoksid, nikotin), presnovne (holesterol, homocistein) in biološke (bakterije, virusi, imunski kompleksi, aktivirani trombociti in levkociti) (18). Pod njihovim vplivom endotelij postane podvržen spremembam in ne deluje več kot pregrada med krvjo in arterijsko steno, ampak se poveča njegova prepustnost in izgubi svojo zaščitno vlogo (23). Posledično celice iz krvi (predvsem monociti) in krvni delci (holesterol, ipd.) v večji meri prehajajo skozi endotelijske celice v žilno steno in se tam kopičijo, še posebno, če je njihova koncentracija v krvi povišana (19). Prične se začaran krog, saj se endotelijske celice progresivno okvarjajo, so čedalje bolj prepustne, kar omogoča napredovanje procesa ateroskleroze. Poškodba endotelija privede tudi do neravnovesja med tvorbo zaščitnih in škodljivih snovi v endoteliju in sicer se poveča nastajanje in sproščanje škodljivih snovi (kot so rastni in proliferacijski dejavniki, citokini, metaloproteinaze in vazokonstriktorji) ter zmanjša nastajanje zaščitnih dejavnikov (prostaciklini, NO, TPA) (18).

Za endotelijsko disfunkcijo je najbolj značilna zmanjšana biološka razpoložljivost NO (12, 23), kar se kaže v spremenjenem delovanju eNOS in sintezi NO. V fizioloških razmerah NO nastaja s pomočjo eNOS, v posebnih okoliščinah (npr. vnetje) pa ga proizvaja še iNOS. Na povezavo med NO in nastankom aterosklerotičnih lezij kažejo raziskave, v katerih so pokazali, da se z dodatkom L-arginina (iz njega nastaja NO) ali tetrahidrobiopterina (BH_4 , kofaktor encima eNOS) zmanjša rast aterosklerotičnih lezij, zaviralci encima NOS pa ta zaščitni učinek izničijo (13). Dušikov oksid ima številne zaščitne učinke na žilno steno, lahko pa deluje tudi proaterogeno. Visoke koncentracije NO, ki nastanejo npr. ob aktivaciji iNOS lahko izzovejo poškodbo endotelija. Peroksinitrit (ONOO^-), ki nastane kot produkt interakcije NO s superoksidom, lahko deluje škodljivo, saj z oksidacijo BH_4 zmanjša fiziološko raven BH_4 , ki je nujna za delovanje eNOS. Posledično se zmanjša nastajanje NO in poveča nastajanje superoksidnega aniona (O_2^-). Poleg tega lahko peroksinitrit v sklopu oksidativnega stresa povzroči poškodbe aminokislin, nukleinskih kislin in proteinov (13). Ob povečanem oksidativnem stresu je arterija sposobna manjše relaksacije, antioksidanti pa lahko tako stanje izboljšajo (24).

1.4.4 Koncept ateroskleroze

Za začetek in napredovanje aterosklerotičnega procesa sta ključnega pomena tako vnetje kot poškodba endotelija. Rezultati raziskav iz zadnjih let namreč kažejo, da ima vnetje osrednjo vlogo pri začetku (vzrok endotelijske disfunkcije) in nadaljevanju aterosklerotičnega procesa, kot tudi pri preoblikovanju stabilnega v nestabilen plak (22). Identificirali so namreč številne označevalce vnetja, ki naj bi bili povezani z aterosklerozo (CRP, fibrinogen, citokini itd.) (25). Pojav humoralnega celičnega avtoimunskega odziva proti antigenom izraženim v endoteliju ter večja pojavnost ateroskleroze pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi (npr. revmatoidni artritis) pa nakazujejo tudi vpletenost imunskega sistema v proces ateroskleroze (22).

Zaradi povečane prepustnosti endotelija se poveča vstop lipoproteinov iz krvi v intimo, kjer poteče njihova oksidacija, pri kateri imajo glavno vlogo reaktivne kisikove (ROS) in dušikove (RNS) spojine (11, 19), ter neencimska glikacija (11). Sočasno se poveča tudi pritrdjanje krvnih celic, predvsem levkocitov (monociti, limfociti T), na endotelij in njihovo prehajanje preko endotelija v intimo žilne stene. Adhezijo levkocitov spodbujajo poškodovane endotelijske celice (zdrav endotelij prilepljanje levkocitov preprečuje), saj se na njihovi površini v večji meri izražajo adhezijske molekule (VCAM-1, ICAM-1, selektin P), dodatno pa jo pospešuje še oksidativni stres. Vstopanje levkocitov v intimo spodbujajo kemotaktične molekule (sproščajo se iz aktiviranih endotelijskih celic zaradi oksidativnega stresa in vnetja), kot so npr. monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1), IL-8 (11), IL-6 (21). Interleukin-6 proizvajajo gladke mišične celice in predstavlja glavni stimulus za nastajanje CRP, tako se vnetna kaskada nadaljuje. Nedavne raziskave kažejo, da CRP pospešuje vnetni proces v aterosklerotičnem plaku preko stimulacije monocitov, ki posledično sproščajo IL-1, IL-6, dejavnik tumorske nekroze- α (TNF- α) idr. (21). Monociti so v intimi pod vplivom makrofagno kolonije stimulirajočega dejavnika (MCSF) podvrženi diferenciaciji v makrofage, ki fagocitirajo lipoproteine. Posebni odstranjevalni receptorji z visoko afiniteto za oksidirane LDL in VLDL, ki jih makrofagi izražajo na svoji površini, še dodatno pospešujejo ta proces (11, 25). Znotraj makrofaga se oksidirani lipoproteini razgradijo, holesterol, ki pri tem nastane, pa se v citosolu makrofagov kopiči v obliki kapljic, tako postopoma iz makrofaga nastane penasta celica (11, 22). Slednje se na določenih predelih kopičijo, kar privede do nastanka maščobne lehe (18). K preoblikovanju maščobne lehe v aterosklerotično leho prispevajo aktivirani makrofagi, ki

sintetizirajo posrednike nespecifične imunosti (citokini: IL-1 in TNF- α , rastni dejavniki, proteaze, citotoksične ROS in RNS). Ti posredniki spodbujajo proliferacijo makrofagov, gladkih mišičnih celic in sintezo izvenceličnega matriksa (11, 22). Pomembna pa je tudi specifična imunost, katero spodbujajo različni antigeni, npr. modificirani lipoproteini, infekcijski agensi, dendritične celice, ki aktivirajo limfocite T, da sintetizirajo citokine (11). Celice pomagalke Th1 sintetizirajo nekatere proinflammatory posrednike (TNF- α , nekateri interleukini), ki aktivirajo celice endotelija in prispevajo k destabilizaciji lehi ter povečajo trombogenost (11, 22). Celice Th2 pa sintetizirajo protivnetne citokine (IL-10), ki zavirajo vnetje. Citotoksične celice T z izločanjem citotoksičnih dejavnikov spodbujajo apoptozo makrofagov, endotelijskih celic in gladkih mišičnih celic (11). Posledica odziva na citokine in rastne dejavnike je potovanje gladkih mišičnih celic iz medije v intimo, kjer se razmnožujejo ter propadajo (19). Gladke mišice pod vplivom rastnih dejavnikov sintetizirajo in izločajo zunajcelični matriks, ki v večini sestavlja napredovale aterosklerotične lehe in ga sestavljajo kolagen in proteoglikani (11). S tem se maščobna leha preoblikuje v aterosklerotično leho (plak, aterom). Z večanjem ateroma in nadaljevanjem brazgotinjenja nastaja plak s fibroznim pokrovom (19), v lehi pa se pogosto kopičijo tudi Ca^{2+} soli s prostimi maščobnimi kislinami, kar privede do trde in neelastične arterijske stene (poapnenje žil) (11).

1.4.5 Zapleti

Ločimo dve vrsti aterosklerotičnih lehi: stabilne in nestabilne (19). Nestabilne aterosklerotične lehe so nevarne za akutne zaplete kot so miokardni infarkt, možganska kap, ishemija uda itd. (18). Te lehe so nehomogene, imajo tanek fibrozni pokrov, vsebujejo veliko lipidov ali kalcinacij, malo gladkih mišičnih celic ter veliko vnetnih celic (predvsem limfocitov T) (19). Aktivirani limfociti izločajo številne proteolitične encime (večinoma metaloproteinaze), ki razgrajujejo fibrozni pokrov lehi. Leha postane neodporna na hemodinamski stres, zato počí, odlušči se površina (18), faktorji koagulacije krvi pridejo v stik s tkivnim faktorjem na penastih celicah lehi in nastane krvni strdek (11). Večji krvni strdek povsem zapre krvno žilo in povzroči akutni zaplet s kliničnimi posledicami. Manjši krvni strdek, ki ne moti toka krvi, ne povzroči kliničnih posledic. Prekrije ga vezivo, aterosklerotična leha pa se večja. Taka stabilna lezija navadno ni nevarna (18), saj se razvijejo kompenzatorni mehanizmi, kot so povečanje premera arterije (leha raste najprej stran od svetline) in kolateralni obtok. Z večanjem take lehe pa se kapaciteta

kompensatornega preoblikovanja preseže, zato nastanejo stabilni sindromi kot so angina pektoris ob naporu in intermitentne klavdikacije (11).

1.4.6 Zdravljenje ateroskleroze

Terapevtski pristopi pri aterosklerozi vključujejo upočasnitev aterosklerotičnega procesa in zmanjšanje tveganja za zaplete (11). Pomembno pa je tudi preprečevanje ateroskleroze oz. upočasnitev njenega napredovanja. Ločimo nefarmakološke in farmakološke ukrepe, ponavadi pričnemo z nefarmakološkimi ukrepi. Slednji zajemajo redno telesno aktivnost, opustitev kajenja, zdravo prehranjevanje, izogibanje stresu ter normalizacijo telesne teže. Pri razviti aterosklerozi je potrebno k nefarmakološkim ukrepom vključiti še farmakološke (26). Hiperholesterolemijo zdravimo s statini, smolami, ki vežejo žolčne kisline, fibrati, nikotinsko kislino ter zdravili, ki zavirajo absorpcijo holesterola. Poleg tega se uporabljajo še zdravila, ki izboljšajo delovanje endotelija (donorji NO, ACE inhibitorji, sartani), Ca^{2+} antagonisti, zaviralci agregacije trombocitov ter zdravila z vplivom na proliferacijo gladkih mišičnih celic in zdravila s protivnetnim delovanjem (26). Ker predstavlja oksidativni stres pomemben mehanizem, ki vodi v poškodbo endotelija ter v oksidacijo lipoproteinov, se vse več pozornosti namenja antioksidantom (23, 26). Nekatere raziskave kažejo, da uživanje antioksidativnih vitaminov (C, E) zmanjša smrtnost zaradi koronarne srčne bolezni (26). V zadnjem času pa proučujejo tudi vpliv drugih antioksidantov, predvsem polifenolnih spojin, ki se nahajajo v rdečem vinu (23) in nekaterih rastlinah (npr. lubju iglavcev). Nove možnosti v zdravljenju ateroskleroze pa predstavljajo tudi zdravila z delovanjem na imunski sistem (22).

1.5 Budre ali morski prašički (*Cavia porcellus*)

Živalski modeli s človeku podobnim metabolizmom lipoproteinov in holesterola imajo pomembno vlogo pri razumevanju vpliva prehrane, zdravil, spola, telesne aktivnosti itd. na razvoj ateroskleroze (27). V raziskavah so ugotovili, da so budre primeren model za preučevanje metabolizma holesterola in lipoproteinov, saj imajo podoben lipoproteinski profil kot človek, poleg tega pa jim je možno z ustrezno prehrano uspešno inducirati aterosklerotične spremembe (28).

Podobnosti v lipoproteinskem profilu budre in človeka so:

- večina holesterola se v krvi prenaša v obliki LDL;
- v jetrih so večje koncentracije prostega kot zaestrenega holesterola;
- v primerjavi z ostalimi glodavci imajo aktiven holesteril-ester prenosni protein (CETP), ki je pomemben za reverzni transport holesterola;
- imajo tudi lecitin-holesterol aciltransferazo (LCAT) in lipoprotein lipazo (LPL), ki sodelujeta v preoblikovanju plazemskih lipoproteinov v različne lipoproteinske podrazrede, ki sodelujejo v fizioloških in morfoloških funkcijah in imajo vlogo pri kopičenju lipidov v aorti in razvoju aterosklerotičnega plaka;
- izkazujejo primerno stopnjo sinteze in razgradnje jetrnega holesterola;
- vezavna domena za LDL receptor se razlikuje med normalno in mutirano obliko apo B;
- apo B mRNA v jetrih je prisotna v zanemarljivih količinah;
- vitamina C ne morejo sintetizirati, ampak ga morajo dobiti s hrano;
- samice imajo višje HDL vrednosti kot samci, v primeru odstranitve jajčnikov pa je njihov plazemski profil podoben profilu žensk po menopavzi;
- po telesni vadbi se raven trigliceridov zniža, naraste pa raven HDL holesterola;
- po vnosu maščob, holesterola in vlaknin se spremeni vrednost HDL;
- v nasprotju s hrčki nimajo prednjega želodca, ki fermentira vlaknine preden dosežejo tanko črevo (27, 28).

1.5.1 Vpliv različne hrane na metabolizem holesterola in lipoproteinov budre

Vpliv vlaknin v hrani

Raziskave so pokazale, da so topne vlaknine (npr. pektin, guar gumi) ena izmed pomembnejših komponent hrane, ki znižuje tveganje za koronarno srčno bolezen. Vlaknine v prebavnem sistemu motijo enterohepatično kroženje žolčnih kislin, kar vodi v zmanjšano absorpcijo lipidov in holesterola v prebavilih. Jetra morajo zato sintetizirati več žolčnih kislin iz jetrnega holesterola. Poveča se dejavnost encima holesterol-7 α -hidroksilaza (CYP7), ki uravnava sintezo žolčnih kislin. Prav tako se zaradi padca koncentracije jetrnega holesterola poveča sinteza encima HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A) reduktaze, ki je odgovoren za biosintezo holesterola. Pospeši se tudi sinteza LDL

receptorjev, ki odstranjujejo holesterol iz krvi. Rezultat tega je nižja koncentracija LDL holesterola (27, 28). Ostali mehanizmi delovanja vlaknin vključujejo zmanjšanje aktivnosti acil-CoA-holesterol-aciltransferaze (ACAT), ki vodi v s holesterolnimi estri osiromašene VLDL, ki se ne pretvarjajo v LDL, ampak se odstranijo preko LDL receptorja (28).

Vpliv holesterola v hrani

Z vnosom holesterola v telo (v količinah, ki ustrezajo 600-2500 mg/dan pri človeku) se poveča koncentracija holesterola v krvi in jetrih. V telesu se zaradi tega pojavijo kompenzatorni mehanizmi. Najprej se zmanjša aktivnost HMG-CoA reduktaze, posledično se zavre sinteza endogenega holesterola. Kasneje se poveča tudi aktivnost ACAT, zmanjša pa se količina LDL receptorjev na membrani hepatocitov (27).

Vpliv nasičenih maščobnih kislin

Hrana bogata z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (koruzno olje) zniža koncentracijo plazemskega LDL v primerjavi z nasičenimi maščobnimi kislinami (palmino olje) (27, 28). Znižanje plazemskega holesterola je posledica večjega izražanja LDL receptorja in zmanjšane pretvorbe VLDL v LDL. Proučevali so tudi vpliv dolžine verige maščobne kisline in ugotovili, da daljša kot je veriga, večji učinek na znižanje holesterola v plazmi ima (npr. stearinska kislina (18 C) ima večji učinek kot lavrinska kislina (12 C)) (28).

Vpliv vnosa ogljikovih hidratov

Raziskave so pokazale, da se je pri budrah, ki so dobivale hrano z nizko količino ogljikovih hidratov (tudi če je bila vsebnost holesterola visoka) pojavilo manjše število srednjih in majhnih LDL delcev, ki predstavljajo večje tveganje za srčno-žilne bolezni. Tudi celokupni LDL se je znižal. Podobno so ugotovili v raziskavah na ljudeh. Proučevali so tudi vpliv enostavnih (saharoza) in kompleksnih (škrob) ogljikovih hidratov. Pri skupini buder, ki je prejemale saharozo, je bila raven trigliceridov in VLDL višja v primerjavi s skupino, ki je prejemale škrob. Pokazali so tudi, da nizka količina ogljikovih hidratov v hrani zmanjša koncentracijo označevalcev vnetja (27).

1.5.2 Budre, modeli za aterosklerozo in vnetje

Pri preučevanju ateroskleroze je pomembno, da lahko živalskim modelom s prehrano induciramo aterosklerozo. Budre so se izkazale za ustrezen model, saj so jim uspešno inducirali aterosklerozo. Pokazali so, da je obseg aterosklerotičnega plaka odvisen od spola in hormonskega stanja. Kopičenje holesterola v aorti povzročijo visoke koncentracije holesterola v hrani, nasprotno pa določene komponente v hrani (vitamin C, E, vlaknine, polifenoli (27)) in zdravila lahko koncentracijo holesterola znižajo (28).

Izsledki raziskav nakazujejo, da so budre primeren model tudi za preučevanje vnetnih procesov, ki so posledica s prehrano povzročene ateroskleroze. Pri skupini, ki je prejela hrano z visoko vsebnostjo holesterola se je povečala količina citokinov v aortni steni v primerjavi s skupino, ki je prejela hrano z nizko vsebnostjo holesterola. Zanimivo je tudi, da zmanjšanje ogljikovih hidratov v hrani zmanjša ekspresijo vnetnih citokinov, kar so pokazali tako pri ljudeh kot tudi na živalskih modelih (28).

1.6 Polifenolne spojine

Polifenoli so velika skupina spojin, ki jih je težko opisati na preprost način. Osnovni element v njihovi strukturi je aromatski obroč, ki vsebuje vsaj eno hidroksilno skupino. Ta je lahko prosta, zaestrena, zaetrena ali vezana na sladkor (glikozid). Ker bi po tej definiciji lahko med polifenolne spojine uvrstili tudi alkaloidne in nekatere terpene, je boljša karakterizacija teh spojin njihova biosinteza.

Obstajata dve glavni sintezni poti polifenolnih spojin:

- preko šikimske kisline: poteka od monosaharidov do aminokislin fenilalanina in tirozina, nato poteče deaminacija do cimetine kisline in derivatov, ki vključujejo benzojsko kislino, acetofenone, lignane, lignine in kumarine;
- preko acetata: poteka od acetata do poli- β -ketoestrov (poliketidov), ki s ciklizacijo tvorijo največkrat policiklične produkte (kromoni, izokumarini, orcinoli, depsidi, ksantoni in kinoni).

K strukturni raznolikosti polifenolov poleg biosinteze prispevajo tudi pogoste kombinacije obeh sinteznih poti. Tako nastanejo npr. flavonoidi, stilbeni, pironi, ksantoni. Lahko pa se v sintezo vključi še mevalonat (redko) in povzroči nastanek mešanih derivatov šikimske kisline in mevalonata (nekateri kinoni, furano- in piranokumarini) ali mešanih derivatov

acetata in mevalonata (kanabinoidi). Pri sintezi lahko sodelujejo tudi vsi trije prekursorji, kar vodi v nastanek rotenoidov (29).

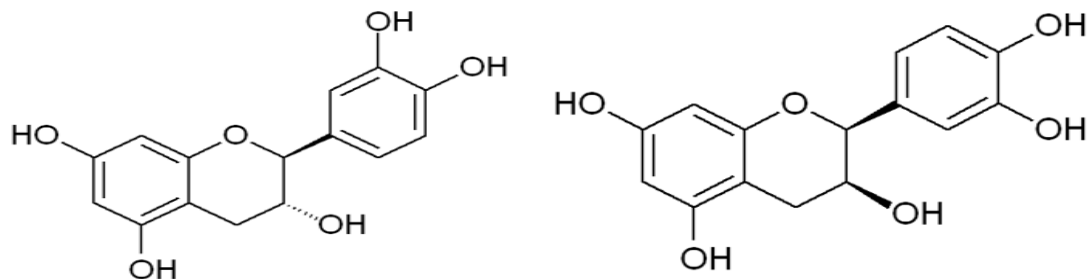
Polifenoli so sekundarni metaboliti rastlin, ki imajo glavno vlogo pri zaščiti rastlin pred ultravijoličnimi žarki in patogeni (30). Sintetizirajo jih lahko le rastline in mikroorganizmi, živali pa jih morajo v glavnem pridobiti s hrano (29).

1.6.1 Flavonoidi

Flavonoidi so rastlinski pigmenti, prisotni v cvetovih, plodovih in listih in predstavljajo najbolj razširjeno in najbolj preučevano skupino polifenolov (30, 31). Pomembni so za razmnoževanje rastlin (privabljajo žuželke), varujejo rastline pred škodljivimi virusi, insekti, glivicami in ultravijoličnimi žarki. Vplivajo tudi na oksidacijske in redukcijske procese v celici in zavirajo delovanje encimov (31, 32). Najdemo jih v sadju, zelenjavi, zelenem čaju, rdečem vinu, soji in zdravilnih rastlinah. Z zdravo prehrano vnesemo v enem dnevu v organizem približno 2 g flavonoidov (32).

Glikozidi flavonoidov so topni v vodi in se nahajajo v vakuolah, če pa so flavonoidi prisotni kot aglikoni, pa so bolj lipofilni (29). Sladkorna komponenta (mono-, di-, trisaharid) je lahko glukoza, galaktoza, aloza, apioza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, glukuronska ali galakturonska kislina. Najpogostejši so O-glikozidi, C-glikozidi so redkejši. Hidroksilna skupina na sladkorju je lahko zaestrena (32). Vsi flavonoidi izhajajo iz istega strukturnega elementa 2-fenilkromana (2-benzopirana), razlikujejo pa se po stopnji oksidacije centralnega piranskega obroča, ki se lahko odpre in pretvori v furanski obroč (29). Flavonoide razdelimo glede na aglikon na (32, 33):

- antocianidini (cianidin, pelargonidin);
- flavanoli (katehin, epikatehin) in proantocianidini (polimeri katehina, epikatehina);
- flavanoni (hesperidin, naringenin);
- flavoni (apigenin, luteolin);
- flavonoli (kemferol, kvercetin, miricetin);
- halkoni (butein);
- izoflavoni (genistein).



Slika 2: Struktura katehina in epikatehina (34).

1.6.2 Čreslovine (tanini)

So heterogena skupina spojin, ki se pojavljajo skoraj v vseh rastlinah. Značilne so za nekatere dele rastlin (listi, plodovi, lubje). Pogosto so prisotne v nezrelem sadju, z zorenjem pa izginejo. Njihova vloga v rastlinah ni natančno poznana, možno je, da ščitijo pred mikroorganizmi. So amorfne substance, ki tvorijo kisle, koloidne vodne raztopine s trpkim okusom. Najpomembnejša lastnost taninov pa je sposobnost tvorbe netopnih kompleksov s proteini (35). Obarjajo pa tudi celulozo, pektine, soli težkih kovin, alkaloida in učinkovine, ki vsebujejo dušik (29, 31). To pojasni njihov trpek okus in adstringentni učinek. Z obarjanjem glikoproteinov v slini namreč povzročijo, da se izgubi lubrikantni učinek slin (29).

Razlikujemo med dvema skupinama čreslovin: hidrolizirajoče in kondenzirajoče. Hidrolizirajoče čreslovine so estri sladkorja (glukoza) ali sorodnega poliola in različnega števila fenolnih kislin. Razdelimo jih lahko na galotanine (estri galne kisline in sladkorja) in elagotanine (estri heksahidroksidifenske kisline in njenih oksidiranih derivatov in sladkorja). Kondenzirani tanini (procianidini) so polimeri flavanov. Sestavljajo jih enote flavan-3-olov (katehin, epikatehin), povezane s C-C vezmi (C_4-C_8 ali C_4-C_6). Na osnovi kisle hidrolize, pri kateri nastane določen antocianidin, jih razdelimo na procianidine, prodelfinidine in propelargonidine. Procianidini, imenovani tudi katehinske čreslovine, so najpogostejše kondenzirane čreslovine (29).

1.7 Zaščitni učinki polifenolnih spojin na srčno-žilni sistem

Številne raziskave so pokazale, da polifenolne spojine delujejo zaščitno na srčno-žilni sistem, preko različnih spodaj opisanih mehanizmov/učinkov.

Antioksidativno delovanje

Polifenolne spojine delujejo kot lovilci radikalov, predvsem ROS in s tem ščitijo celične lipide, proteine in DNA pred oksidativnimi poškodbami (36). Za polifenole iz zelenega čaja (flavanoli in njihovi glikozidi) so v *in vitro* poskusih pokazali, da povečajo celokupno plazemsko antioksidacijsko aktivnost (30, 36, 37, 38). Podobno so v *in vitro* ter *in vivo* poskusih pokazali tudi za polifenole iz kakava (katehin, epikatehin, procianidini) (36, 39). Fenolna skupina namreč lahko sprejme elektron, nastane stabilen fenoksi radikal, ki prepreči oksidacijo celičnih komponent (30). Polifenoli lahko kelirajo kovinske ione, ki so udeleženi pri tvorbi radikalov, poleg tega pa lahko tudi povečajo aktivnost celičnih detoksifikacijskih sistemov (npr. katalaza, superoksidna dismutaza) ter zavrejo encime, ki generirajo ROS (36).

Protivnetno delovanje

Po zaužitju procianidinov iz grozdja so opazili zmanjšano sintezo označevalcev vnetja (CRP, IL-6, TNF- α) in povečano sintezo protivnetnih citokinov (33). Protivnetno delovanje so pokazali tudi za polifenole iz kakava (33) in rdečega vina, saj zavirajo sintezo prostaglandinov (36). Epigalokatehin-3-galat (EGCG) iz zelenega čaja zmanjša stopnjo vnetja v žilni steni, saj poveča sintezo NO (33), zmanjša izražanje P-selektina, vWF, zmanjša adhezijo levkocitov in monocitov ter zavira VCAM-1 (38).

Izboljšanje delovanja endotelija

Polifenoli iz kakava in zelenega čaja zmanjšajo endotelijsko disfunkcijo, saj preko povečane aktivnosti eNOS izboljšajo od NO odvisno vazodilatacijo (33, 38, 39, 40). Poleg tega tudi povečajo sintezo vazodilatatorjev in zmanjšajo koncentracijo vazokonstriktorjev, posledično se izboljša tonus arterij. Za katehin so pokazali, da zmanjša plazemsko koncentracijo endotelina-1, ki je močan vazokonstriktor (39, 41). EGCG pa poveča sintezo PGI₂, ki je vazodilatator (38). Da je vazodilatacija v veliki meri odvisna od endotelija, so pokazali z uporabo zaviralcev NOS. Slednji so namreč preprečili ali zmanjšali s

polifenolnimi spojinami povzročeno vazodilatacijo (38, 41). Podobne učinke imajo tudi druga s polifenoli bogata živila (grozdni sok, rdeče vino) (41).

Antitrombotično delovanje

Flavonoli kakava zmanjšajo agregacijo in adhezijo trombocitov (39), podobne učinke ima tudi grozdni sok. Slednji zmanjša agregacijo trombocitov, zmanjša sintezo O_2^- in poveča sintezo NO v trombocitih (40). Katehini zelenega čaja normalizirajo razmerje $PGI_2:TXA_2$, zmanjšajo nivo PLA_2 (37) ter zmanjšajo plazemsko koncentracijo P-selektina, ki je označevalec agregacije trombocitov (40). Podobne učinke ima tudi rdeče vino (30).

Antihipertenzivno delovanje

Polifenoli rdečega vina, grozdja, kakava in zelenega čaja znižujejo krvni tlak, kar je lahko posledica vazodilatacije (30, 37, 39), ki jo povzročajo, ali pa zaviranja ACE (38, 39).

Antiaterosklerotično delovanje

Polifenoli so sposobni omejiti nastanek in napredovanje aterosklerotičnih sprememb preko zgoraj opisanih učinkov. Poleg tega polifenolne spojine zvišujejo koncentracijo HDL, zavirajo prekomerno razraščanje gladkih mišičnih celic in zmanjšajo oksidacijo LDL (30, 36). Katehini zelenega čaja zmanjšajo absorpcijo trigliceridov in holesterola (37, 42), znižajo koncentracijo LDL, zvišajo raven HDL v plazmi (37) in posledično preprečujejo nastanek maščobnih plakov (37, 38). Podobno delujejo tudi polifenoli iz kakava in rdečega vina (33, 36).

Antidiabetično delovanje

Raziskave kažejo, da katehini iz zelenega čaja preko povečanja aktivnosti insulina, znižujejo raven glukoze v krvi (30, 37, 38).

1.8 Bela jelka (*Abies alba* Mill.)

Bela jelka je do 50 m visoko vednozeleno drevo iz družine borovk, ki so največja družina iglavcev na severni polobli. Mednje uvrščamo še smreko, bor, macesen idr. (43).



Slika 3: Bela jelka (*Abies alba* Mill.).

Krošnja je pri mladih drevesih stožčasta, kasneje pa postane valjasta. Veje so ploske. Skorja je sprva siva, gladka in tanka, v starosti pa razpoka v luske (44). Tri cm dolge iglice so ploščate, najpogosteje dvoredno nameščene na poganjkih. Na spodnji strani imajo dve beli progi, zgornja stran je temno zelene barve (43, 44). Storži so pokončni in razpadejo na drevesu (45).

Uspeva na karbonatni in nekarbonatni matični podlagi, na mestih, kjer je dovolj zračne vlage. Odporna je proti vetru, slabše pa prenaša sušo in nizke temperature. Znana je po sencodržnosti, preživi lahko z zelo majhnimi količinami svetlobe (44). Raste v gorovjih srednje in južne Evrope, najpogosteje v pasu med 800 in 1500 m nadmorske višine. (44, 46) Razširjena je skoraj po vsej Sloveniji, večinoma raste v mešanih gozdovih z bukvijo (44).

1.9 Izvlečki iz lubja iglavcev

1.9.1 Pknogenol®

Pknogenol® je izvleček iz lubja francoskega obmorskega bora (*Pinus pinaster*) in je bogat s flavonoidi. Uvrščajo ga med najmočnejše naravne antioksidante. Kemijska sestava še ni povsem znana. Vsebuje veliko število fenolnih spojin: procianidine, monomera katehin in taksifolin ter fenolne kisline (galna, kavna, ferulna kislina) (47, 48). Ker vsebuje veliko proantocianidinov, je dobro topen v vodi in se hitro absorbira ter porazdeli v tkiva (49).

Pknogenol® izkazuje številne učinke (49):

➤ **BIOLOŠKI UČINKI:**

- Antioksidativna aktivnost (deluje kot lovilec radikalov, deluje sinergistično s sinteznimi antioksidanti, ščiti molekule pred oksidacijo itd.) (48, 49).
- Protivnetna aktivnost (zavira gensko ekspresijo provnetnih citokinov, zmanjša sintezo levkotrienov ter preko zaviranja sproščanja histamina izkazuje antialergične učinke) (49).
- Stimulacija sinteze NO (49).
- Protimikrobna in protivirusna aktivnost (49).

➤ **UČINKI NA ORGANSKE SISTEME:**

- Srčno-žilni sistem: preko povečane sinteze NO pknogenol vpliva na od endotelija odvisno vazodilatacijo (48, 49, 50), znižuje krvni pritisk ter zmanjša agregacijo trombocitov (49). Znižuje tudi plazemske koncentracije LDL in zvišuje raven HDL v plazmi (47). Ugodno deluje tudi pri sladkorni bolezni, saj upočasni privzem glukoze iz obroka (zavira α -glukozidazo) (49).
- Druge bolezni, pri katerih so opazili zaščitne učinke pknogenola: rakava obolenja, glavkom, astma, osteoartritis, kožne bolezni, nevrološke motnje (49).

1.9.2 Izvleček iz lubja bele jelke

Raziskave na Fakulteti za farmacijo so pokazale, da izvleček iz lubja bele jelke vsebuje podobne zmesi polifenolov kot Piknogenol® in zato lahko predstavlja alternativo izvlečku obmorskega bora.

Podrobnejših raziskav o sestavi izvlečka iz lubja bele jelke še ni. V okviru diplomskega dela iz leta 2011 so identificirali katehin, epikatehin, (epi)-galokatehin ter tri dimere proantocianidinov: (epi)galokatehin-(epi)galokatehin, (epi)galokatehin-(epi)katehin in (epi)katehin-(epi)katehin (51).

Izvleček iz lubja bele jelke je pridobljen po patentiranem postopku. Dosedanje raziskave *in vitro* kažejo, da je eden od najmočnejših antioksidantov. Za potrditev teh učinkov so potrebne še nadaljnje raziskave. V primeru, da bodo izsledki kliničnih raziskav ugodni, bi bil izvleček iz lubja bele jelke lahko uvrščen v kategorijo zdravil brez recepta. To bi bil prvi primer registriranega antioksidanta iz skupine naravnih polifenolov (52).

Maja 2012 so začeli tržiti prehransko dopolnilo Abigenol®, ki vsebuje izvleček iz lubja bele jelke iz kočevskega gozda (53). Ker je njegova natančna sestava poslovna skrivnost, ne moremo trditi, da gre za enak izvleček kot smo ga uporabili mi.

2 NAMEN DELA

Raziskave so pokazale, da hrana z zadostno vsebnostjo polifenolnih spojin ugodno vpliva na zdravje, saj zniža tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni. Veliko vsebnost polifenolnih spojin ima izvleček iz lubja francoskega obmorskega bora (Piknogenol®). Glavne sestavine izvlečka iz lubja bele jelke, ki so ga izolirali na Fakulteti za farmacijo, so prav tako polifenolne spojine. Podrobnejših raziskav o sestavi in delovanju še ni. *In vitro* raziskave so pokazale, da ima izvleček močno antioksidativno delovanje in je zato lahko alternativa Piknogenolu®.

Namen naše raziskave je preučiti ali lahko z dodatkom izvlečka iz lubja bele jelke vplivamo na funkcionalne in morfološke spremembe arterij pri budrah, kronično krmljenih z aterogeno krmo. Z acetilholinom, ki se veže na žilne muskarinske receptorje M_3 in preko sproščanja NO povzroča vazodilatacijo, ter s fenilefrinom, ki preko adrenergičnih receptorjev α_1 povzroča vazokonstrikcijo, bomo preučili odzivnost žil. Z uporabo dvofaktorske analize variance in Bonferronijevega post-hoc testa bomo primerjali rezultate. Abdominalne aorte bomo barvali z raztopino Oil Red O in ugotavljali morebitno prisotnost maščobnih leh.

Naše delovne hipoteze so:

- Funkcionalne in morfološke spremembe arterij pri budrah lahko induciramo z ustrezno aterogeno krmo;
- Kronična terapija z izvlečkom iz lubja bele jelke, dodanim k aterogeni krmi, izboljša funkcionalne lastnosti torakalne aorte buder;
- Kronična terapija z izvlečkom iz lubja bele jelke, dodanim k aterogeni krmi, izboljša morfološke lastnosti torakalne aorte buder.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Sestavine prehrane za krmljenje buder

Briketi za osnovno krmljenje buder: (Altromin 3123 Lage, Nemčija), hranila: 89 % suhe snovi, od tega: 14% beljakovin, 4% maščob, 19.5 % vlaknin, 7.5 % pepela in 44 % ekstrakta (brez dušika); minerali: 0.8 % kalcija, 0.6 % fosforja, 0.2 % magnezija, 0.2 % natrija, 0.9 % kalija; elementi v sledovih: 150 ppm železa, 50 ppm mangana, 45 ppm cinka, 13 ppm bakra, 1,2 ppm joda, 0,6 ppm selen, 0,3 ppm kobalta; vitamini (15000 i.e. vitamina A, 1294 mg vitamina C, 75 mg vitamina E idr.); aminokisline.

Briketi za doječe budre: (Altromin 3113, Lage, Nemčija), hranila: 89% suhe snovi, od tega: 15.5 % beljakovin, 4 % maščob, 19.5 % vlaknin, 8 % pepela, 42 % ekstrakta (brez dušika); minerali: 0.8 % kalcija, 0.5 % fosforja, 0,2 % magnezija, 0,2 % natrija, 0,9 % kalija; elementi v sledovih: 150 ppm železa, 50 ppm mangana, 45 ppm cinka, 13 ppm bakra, 1,2 ppm joda, 0,6 ppm selen, 0,3 ppm kobalta; vitamini (15000 i.e. vitamina A, 1294 mg vitamina C, 75 mg vitamina E idr.); aminokisline.

Fruktoza (KEFO, Ljubljana, Slovenija).

Holesterol (Acros organics, Belgija).

Izvleček iz lubja bele jelke (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija).

Jaica (rumenjaki) (Mercator, Slovenija).

Jedilna svinjska mast (Mercator, Slovenija).

3.2 Reagenti in raztopine pri poskusih na izolirani aorti

Acetilholin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA; M=181,7). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 10 mmol/l.

Fenilefrin (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija; M=203,7 g/mol): je selektiven agonist na adrenergičnih receptorjih α_1 . Pripravili smo matično raztopino koncentracije 10 mmol/l.

Heparin (Krka, Novo mesto, Slovenija): je glikozaminoglikan in se veže na trombin III ter ga aktivira, zato se uporablja kot antikoagulant. V eni viali je 5 ml raztopine za injiciranje,

ki vsebuje 25000 i.e. natrijevega heparinata. Pred izolacijo aorte smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin v odmerku 1,7 ml / kg telesne teže živali.

KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija; M=74,56). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 3 mol/L.

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

- 118,8 mmol/L NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 4,7 mmol/L KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 1,2 mmol/L KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 1,2 mmol/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 23,8 mmol/L NaHCO_3 (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 2,5 mmol/L CaCl_2 (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 11 mmol/L glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška).

Karbogen (Messer, Slovenija): plinska mešanica vsebuje 95 % O_2 in 5 % CO_2 . Uporabili smo jo za prepričevanje K-H raztopine v kivetah.

Ogjikov dioksid (CO_2) (Messer, Slovenija): plinska mešanica vsebuje 75% CO_2 in 25% N_2 . Uporabili smo jo za evtanazijo živali.

Raztopina Oil Red O; Oil Red O stock: 0,7 g Oil Red O (Sigma-Aldrich O-0625, St. Louis, ZDA; M=408,5 g/mol); 200 ml izopropanolola (Merck, Darmstadt, Nemčija) in **Oil Red O delovna raztopina:** 6 delov Oil red O stock, 4 deli demineralizirane vode.

3.3 Aparature, oprema in pribor

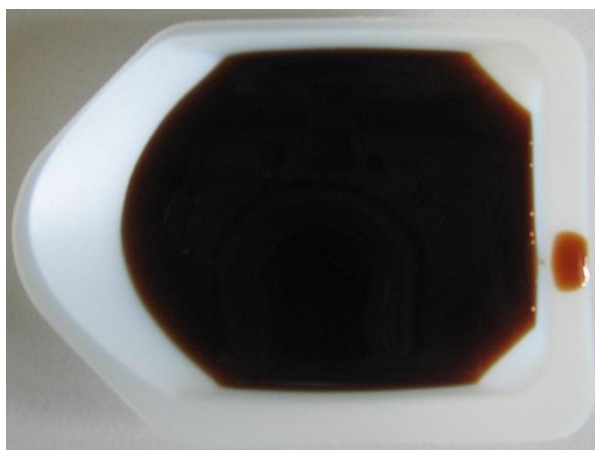
- Rotavapor R-200, Büchi (Flawil, Švica)
- Hladilnik, +4 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik, -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Analizna tehtnica KERN ALS 120-4 (Kern & Son GmbH, Balingen, Nemčija)
- Ultrazvočna kadička SONIS 2 GT (Iskra PIO d.o.o., Šentjernej, Slovenija)
- Polavtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska)
- Naprava za izolirane žile (Laboratorij za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Ljubljana)

- Osebni računalnik
- Bučke
- Čaše
- Škarje
- Mala in velika pinceta
- Kirurška prijemalka

3.4 Izvleček iz lubja bele jelke

3.4.1 Priprava izvlečka

Tekoči izvleček iz lubja bele jelke so pridobili po postopku dvostopenjske ekstrakcije. 5 kg zmletega lubja bele jelke (*Abies alba*) so v prvi stopnji ekstrahirali s 25 L vode pri 70 °C, dve uri. Vodni izvleček so pri znižanem tlaku uparili do volumna 5 L. V drugi stopnji ekstrakcije so koncentriran vodni izvleček ekstrahirali s 3 krat po 3 L etilacetata. Etilacetatnemu izvlečku so dodali 25 ml polietilenglikola 400 in iz zmesi odparili etilacetat. Pridobili so 50 ml rjavorumenega viskoznega izvlečka z vonjem po smoli.



Slika 4: Izvleček iz lubja bele jelke.

3.4.2 Odmerek izvlečka

Ciljni odmerek izvlečka iz lubja bele jelke, ki smo ga dodajali k aterogeni dieti, je znašal 10 mg/kg budre/dan. Pri izboru odmerka smo izhajali iz raziskav, ki so jih opravili na živalih, kronično tretiranih s piknogenolom. Izbrali smo odmerek, ki je bil najpogosteje uporabljen (54, 55, 56). Pri izračunu smo upoštevali povprečno težo buder (1 kg) in

povprečno količino zaužite krme (50 g/dan). Na podlagi tega smo izračunali potrebno koncentracijo izvlečka v krmi. Dejanski dnevni odmerek pri posamezni živali je bil odvisen od količine krme, ki jo je žival ta dan zaužila.

3.5 Poskusne živali

Dovoljenje št. 34401-23/2009/3 za izvajanje poskusa na budrah, je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije.

Za našo raziskavo smo uporabili budre (*Cavia porcellus*) reje DHN (Dunkin Hartley). Ob vključitvi v poskus so bile stare od pet do osem mesecev. Na začetku poskusa smo budre razdelili v tri skupine, v vsaki je bilo osem do devet živali obeh spolov. Vsaka skupina je imela svojo kletko, v kateri je bila neomejena količina določene krme (Tabela 1). Živali smo krmili v stalnih pogojih (temperatura okolja 24 +/- 1 °C) z menjavo osvetlitve na 12 ur. Na razpolago so imele poljubno količino vode (*ad libitum*).

Tabela I: Razdelitev buder po skupinah.

VRSTA KRME	ŠTEVILO SAMIC (kletka št.)	ŠTEVILO SAMCEV (kletka št.)
Osnovna krma	5 (1)	3 (2)
Aterogena krma (AK)	6 (3)	3 (4)
AK + izvleček iz lubja jelke	3 (5)	6 (6)

3.6 Priprava aterogene krme

Sestavo aterogene krme smo določili na podlagi diplomske naloge iz leta 2011, v kateri so s preizkušanjem pripravili obstojno in proaterogeno krmo, ki je v kratkem času povzročila nastanek aterogenih sprememb na žilah buder (57).

Tabela II: Sestava aterogene krme.

Sestavine	[%]
Osnovni briketi	38,5
Briketi za doječe budre	38,5
Posušeni jajčni rumenjaki	8,6
Svinjska mast	5,0
Holesterol	1,0
Fruktoza	8,4

Aterogena krma je bila sestavljena iz briketov za krmljenje buder in tekoče proaterogene zmesi. Tekočo zmes smo pripravili tako, da smo jajčne rumenjake, holesterol, svinjsko mast in fruktozo homogeno zmešali. Vanjo smo nato dodali brikete. Dieto, ki je bila namenjena tretji skupini živali, ki je prejela še izvleček iz lubja bele jelke, smo pripravili po enakem postopku, le da smo v tekočo homogeno zmes dodali tudi izvleček. Ko smo homogeni zmesi dodali brikete, smo vse skupaj dobro premešali, da so se briketi prepojili. Tako pripravljeno krmo smo razporedili po za to pripravljeni površini in jo en teden sušili na sobni temperaturi in visokem pretoku zraka.

3.7 Krmljenje

Na začetku poskusa smo za vsako skupino pripravili po 5 kg krme po postopku prikazanem v spodnji tabeli. Ko je krme zmanjkalo, smo naredili novo, po enakem postopku. To smo ponavljali do žrtvovanja živali.

Tabela III: Shematski prikaz sestave krme po skupinah.

Vrsta krme	Osnovni briketi (kg)	Briketi za dojenje (kg)	Jajčni rumenjaki (kom)	Svinjska mast (g)	Holesterol (g)	Fruktoza (g)	Izvleček (g)
Osnovna krma	5	/	/	/	/	/	/
Aterogena krma (AK)	1,93	1,93	50	250	50	420	/
AK + izvleček	1,93	1,93	50	250	50	420	1

Krmljenje je trajalo osem tednov po načelu *ad libitum*. Vsak dan so budre dobile novo zalogo hrane, ki so jo lahko pojedle v neomejeni količini. Prav tako so imele na razpolago poljubno količino vode.

3.8 Žrtvovanje živali

Pred pričetkom žrtvovanja smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin (1,7 ml / kg telesne teže živali). S tem smo preprečili strjevanje krvi. Živali smo evtanazirali s CO₂ tako, da smo jih zaprli v komoro s stalnim dotokom CO₂. Najprej je žival izgubila zavest, nato je nastopila smrt. Po nastopu smrti smo žival pustili v komori še nekaj minut, nato smo pričeli z izolacijo žil.

Z odprtjem trebušne stene v višini 2 cm pod ksifoidnim izrastkom spodnjega dela prsnice in z odstranitvijo trebušne prepone, smo si prikazali srce in velike žile v prsnem košu in trebušni votlini buder. Nato smo od torakalne aorte ločili vezivno in maščobno tkivo ter jo izolirali iz živali. Zgoraj smo aorto prekinili pod izhodiščem leve arterije subklavije, spodaj pa nad trebušno prepono. Iz torakalne aorte smo pripravili osem 5 mm širokih žilnih obročkov, ki smo jih vpeli v kaveljček in sidro v napravi za poskuse na izoliranih žilah in jih potopili v K-H raztopino v kiveti (slika 5). Od začetka izolacije do namestitve žilnih obročkov je preteklo 10-15 minut.

Iz budre smo izolirali tudi abdominalno aorto in sicer na mestu pod diafragmo do razdelitve v levo in desno iliakalno arterijo. Tudi to aorto smo očistili okolnega maščobnega in vezivnega tkiva, potem pa smo jo fiksirali v 10 % pufranem formalinu 5-7 dni. Abdominalno aorto smo uporabili za morfometrično analizo obarvanih preparatov.

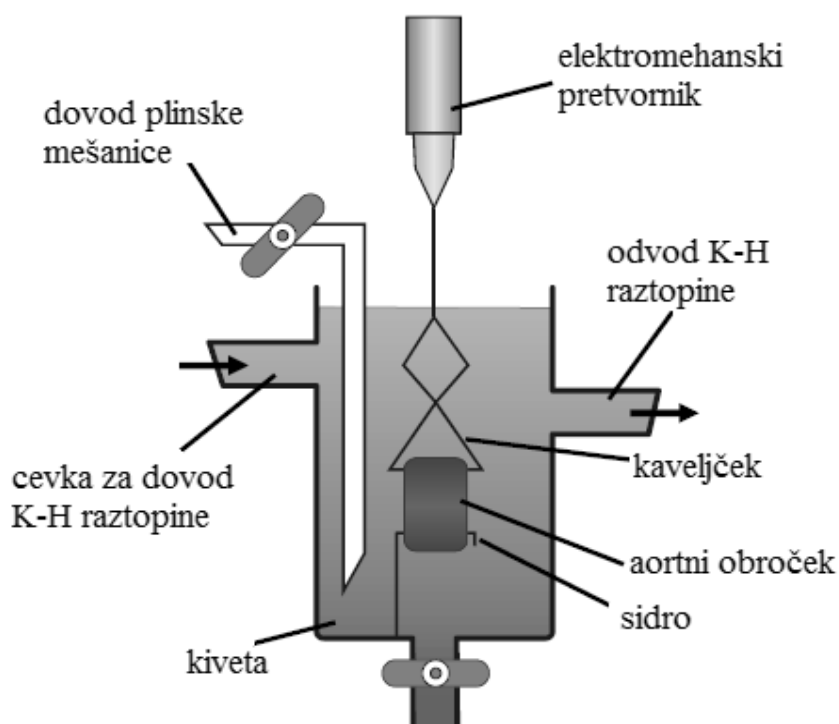
Izolirali smo tudi koronarne in karotidne arterije, jih shranili v RNA later in jih čez noč pustili v hladilniku, nato smo jih dali v zamrzovalnik. Enako smo naredili z 1-1,5 cm torakalne aorte, ki je nismo porabili za pripravo obročkov. Te shranjene žile smo nameravali uporabiti za gensko ekspresijo, ki pa je do sedaj še nismo izvedli.

3.9 Naprava za poskuse na izoliranih žilah

Napravo za poskuse na izoliranih žilah so izdelali v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Napravo sestavljajo vodna kopel in osem kivet s prostornino 10 ml. Kivete imajo ločene priključke (dovod in odvod) za izmenjavo hranilne K-H raztopine. Ločen je tudi dovod plina za oksigenacijo. Za ustvarjanje normoksičnih razmer, smo raztopino prepihovali s plinsko mešanico 95 % O₂ in 5 % CO₂. Temperaturo vodne kopeli $37,0 \pm 0,5$ °C smo vzdrževali s termostatsko nadzorovano vodno črpalko. Reagente smo v kivete dodajali skozi zgornjo odprtino s polavtomatskimi pipetami.

Med dva vzporedna nerjaveča kovinska nosilca smo skozi lumen vpeli žilne obročke. Prvi nosilec (sidro) je bil pritrjen na držalo znotraj kivete, drugi (kaveljček) pa je bil povezan z elektromehanskim pretvornikom (ITIS, Ljubljana, Slovenija). Spremembo sile pri izometričnem krčenju, je elektromehanski pretvornik pretvarjal v spremembo električne napetosti (izražene v mV). To spremembo električne napetosti smo preko ojačevalca in A/D pretvornika (National Instruments NI PCI-6013, ZDA) zapisovali na trdi disk osebnega računalnika. Dobljene podatke smo nato obdelali s programsko opremo DeweSoft 6.1 (Dewetron, Trbovlje, Slovenija).



Slika 5: Shematski prikaz naprave za poskuse na izoliranih žilah. Prirejeno po (58).

3.10 Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder

Število živali, ki smo jih žrtvovali za poskuse na izoliranih torakalnih aortah je prikazano v spodnji tabeli (preostalim živalim smo izolirali le abdominalno aorto za morfometrično analizo žil).

Tabela IV: Število buder uporabljenih za poskuse na izoliranih torakalnih aortah.

VRSTA KRME	ŠTEVILO SAMIC (kletka št.)	ŠTEVILO SAMCEV (kletka št.)
Osnovna krma	3 (1)	3 (2)
Aterogena krma (AK)	2 (3)	3 (4)
AK + izvleček iz lubja jelke	3 (5)	4 (6)

Obročke torakalnih aort smo skozi lumen vpeli med sidro in kaveljček in potopili v K-H raztopino v kiveti ter odprli dotok kisika. Pred dodajanjem reagentov smo obročke

stabilizirali tako, da smo jih 90 minut uravnavali na mirovno napetost 20 mN. V tem času smo na vsakih 15 minut menjali K-H raztopino v kiveti. S tem smo sprali ostanke krvi in zagotovili zadostno prehranjenost žilnih obročkov. Ko smo dosegli stabilno mirovno napetost aortnih obročkov pri 20 mN, smo preizkusili njihovo odzivnost. V kiveto smo dodali raztopino KCl, njena končna koncentracija v kiveti je znašala 60 mmol/L. Počakali smo, da je skrčitev dosegla stabilen plato (približno 30 minut), zatem smo obročke 10 minut spirali z K-H raztopino do mirovne napetosti. Tak postopek z enako koncentracijo KCl smo ponovili še enkrat, da smo dosegli enakomernost odziva.

S tem postopkom smo preverili odzivnost žilnih obročkov pri vseh skupinah živali. Poskusi odzivnosti endotelija pri živalih z osnovno krmo so predstavljali kontrolno vrednost, skupina, ki je prejela aterogeno krmo, in skupina, ki je prejela aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke, pa sta predstavljali primerjani skupini.

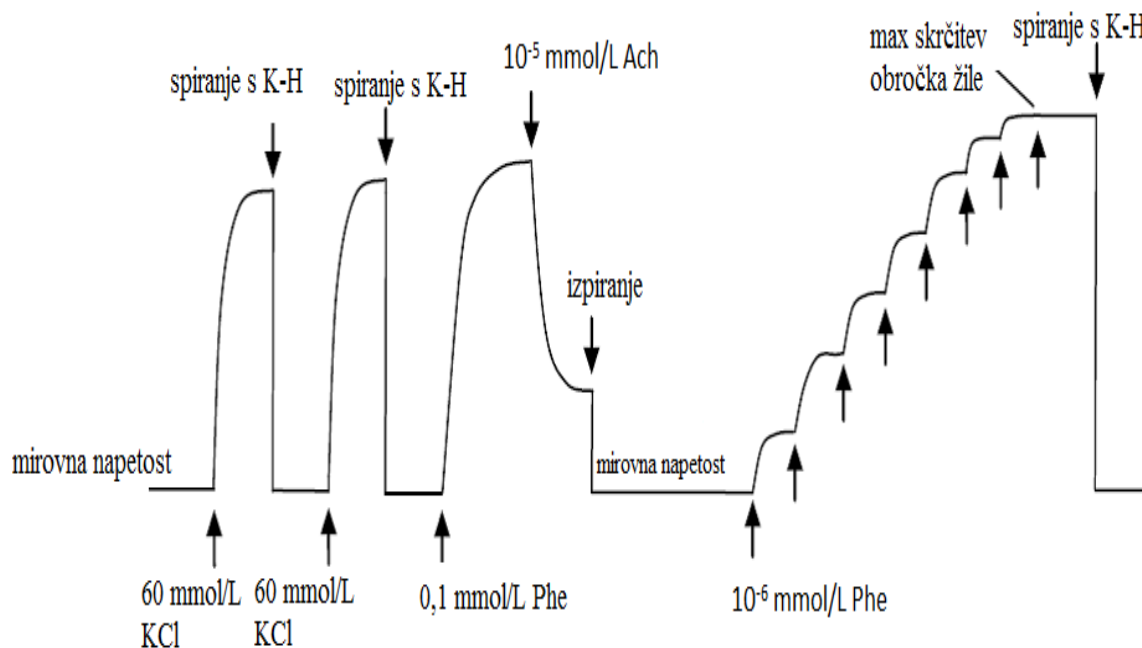
3.10.1 Meritve sposobnosti relaksacije žilnih obročkov z acetilholinom

Ko smo po zadnjem dodatku KCl obročke spirali in dosegli stabilizacijo v K-H raztopini pri mirovni napetosti, smo vsak žilni obroček skrčili s fenilefrinom, katerega koncentracija v kiveti je znašala 0,1 mmol/L. Po približno 5 minutah je skrčitev dosegla stabilen plato. Nato smo dodali acetilholin, s katerim smo izzvali sprostitve obročkov žil. V kiveto smo dodajali raztopine acetilholina (dobili smo jih z redčenjem matične raztopine) po naslednjem vrstnem redu: 0,001; 0,01; 0,1 in 1 mmol/L ter nazadnje še matično raztopino s koncentracijo 10 mmol/L. S kumulativnim dodajanjem ustreznih volumnov raztopin prej naštetih koncentracij smo v kiveti dosegli končne koncentracije 10^{-5} ; 10^{-4} ; 0,001; 0,01; 0,1 mmol/L. 1-2 minuti po vsakem dodatku, ko je sprostitve dosegla plato, smo odčitali vrednost napetosti žilnega obročka ter nato dodali naslednjo (višjo) koncentracijo. Po zadnjem odzivu smo žilne obročke spirali z K-H raztopino in počakali, da so se vrnili na mirovno napetost.

3.10.2 Meritve sposobnosti kontrakcije žilnih obročkov s fenilefrinom

Po vrnitvi obročkov na mirovno napetost, smo v kivete začeli dodajati ustrezne koncentracije fenilefrina: osnovno raztopino s koncentracijo 10 mmol/L in ustrezne redčitve osnovne raztopine s koncentracijami 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 in 1 mmol/L, zopet smo začeli z dodajanjem najnižje koncentracije, 0,0001 mmol/L. S kumulativnim dodajanjem ustreznih volumnov raztopin smo v kiveti dosegli naslednje končne

koncentracije: 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 0,001; 0,01; 0,1 mmol/L. 1-2 minuti po vsaki aplikaciji, ko je skrčitev dosegla stabilen plato, smo odčitali vrednost napetosti in dodali višjo koncentracijo. S tem smo zagotovili postopno skrčitev obročka in potencialno maksimalno skrčitev pri najvišji koncentraciji.



Slika 6: Shematski prikaz poteka poskusa na izoliranih torakalnih aortah buder. Prvi dve krivulji prikazujeta preverjanje odzivnosti s KCl. Temu sledi prikaz odzivnosti žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju acetilholina (Ach) po predhodni skrčitvi obročkov s fenilefrinom (Phe). Na koncu je prikazana krivulja po kumulativnem dodajanju različnih koncentracij fenilefrina.

3.11 Obdelava podatkov

Pri posameznih poskusih smo s pomočjo računalniškega programa za zajem in obdelavo podatkov DeweSoft 6.1. (Dewetron, Trbovlje, Slovenija) določili silo izometrične kontrakcije (višina platojev). Z računalniškim programom GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, ZDA) smo nato podatke grafično in statistično obdelali. Izračunali smo povprečje rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah ter jih izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM).

Pri poskusih, kjer smo merili relaksacijo, smo za vsako koncentracijo acetilholina v kiveti izračunali odstotek relaksacije. 100 % referenčno vrednost je predstavljala razlika med višino platoja, ki ga je dosegel predhodno skrčeni žilni obroček s fenilefrinom in med mirovnim stanjem. Kumulativno koncentracijsko-relaksacijsko krivuljo smo izdelali iz povprečja odzivov pri različnih koncentracijah acetilholina (odvisnost med koncentracijo acetilholina in relaksacijo žile). Prav tako smo določili vrednost sprostitve obročkov pri končni koncentraciji acetilholina za posamezno skupino obročkov. Rezultate med skupinami smo primerjali z dvofaktorsko analizo variance (two-way ANOVA) in Bonferronijevim post-hoc testom. Statistično pomembno razliko je predstavljal $p < 0,05$. Izračunali smo tudi površine pod kumulativno koncentracijsko-relaksacijsko krivuljo (AUC, area under the curve) ter z uporabo enofaktorske analize variance (one-way ANOVA) in Bonferronijevim post-hoc testom primerjali skupine med seboj. Pri primerjavi rezultatov je statistično pomembno razliko predstavljala vrednost $p < 0,05$.

Podobno je bilo tudi pri poskusih, kjer smo merili vrednosti kontrakcije s fenilefrinom. Vrednosti kontrakcije, ki smo jih izmerili, smo izrazili kot odstotek med maksimalno skrčitvijo in mirovnim stanjem. Kumulativno koncentracijsko-skrčitveno krivuljo smo izdelali iz povprečja odzivov pri različnih koncentracijah fenilefrina. Rezultate med skupinami smo primerjali z dvofaktorsko analizo variance in Bonferronijevim post-hoc testom. Vrednost $p < 0,05$ je tudi v tem primeru predstavljala statistično pomembno razliko. Tako kot pri relaksaciji, smo tudi tu izračunali površine pod kumulativno koncentracijsko-skrčitveno krivuljo (AUC) ter z enofaktorsko analizo variance in Bonferronijevim post-hoc testom primerjali skupine med seboj. Statistično pomembno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$.

3.12 Morfometrija

Za morfometrično vrednotenje žil smo uporabili izolirane abdominalne aorte vseh buder, ki so bile vključene v raziskavo. Najprej smo jih očistili okolnega veziva in maščevja, nato pa smo jih 5-7 dni fiksirali v 10 % pufranem formalinu. Pred barvanjem smo abdominalne aorte vzdolžno prerezali. Sledilo je barvanje z raztopino Oil red O, ki smo jo pripravili iz 6 delov raztopine Oil Red O »stock« in 4 delov demineralizirane vode. Barvanje je trajalo 15 minut, vmes smo konstantno mešali. Obarvane žile smo nato spirali z demineralizirano vodo in vsako posebej fiksirali med dve majhni ploščici pleksi stekla ter skenirali.

Obdelavo poskeniranih slik smo naredili s programom Image J (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, ZDA) in s pomočjo programa Slikar (Windows 7). Najprej smo slike v programu Slikar povečali in opazovali morebitno prisotnost maščobnih leh v lumnu žile. Lehe so se kazale kot rdeče obarvana področja na notranji površini abdominalne aorte. Označili smo jih s črno obrobo, da smo jih lažje prepoznali. Nato smo s programom Image J izračunali površino leh glede na površino lumna aorte in podatke izrazili v %. Rezultate smo nato za vsako skupino povprečili in z enofaktorsko analizo variance in Bonferronijevim post-hoc testom primerjali posamezne skupine med seboj.

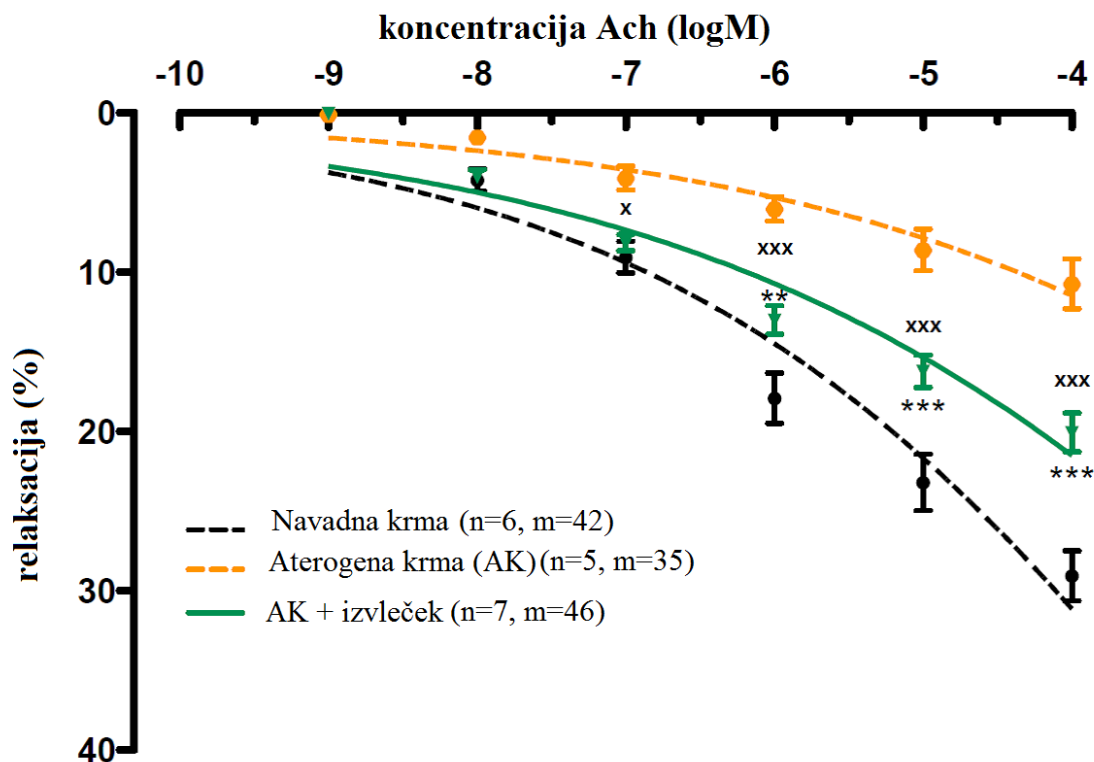
4 REZULTATI

4.1 Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder

4.1.1 Meritve sposobnosti relaksacije žilnih obročkov z acetilholinom

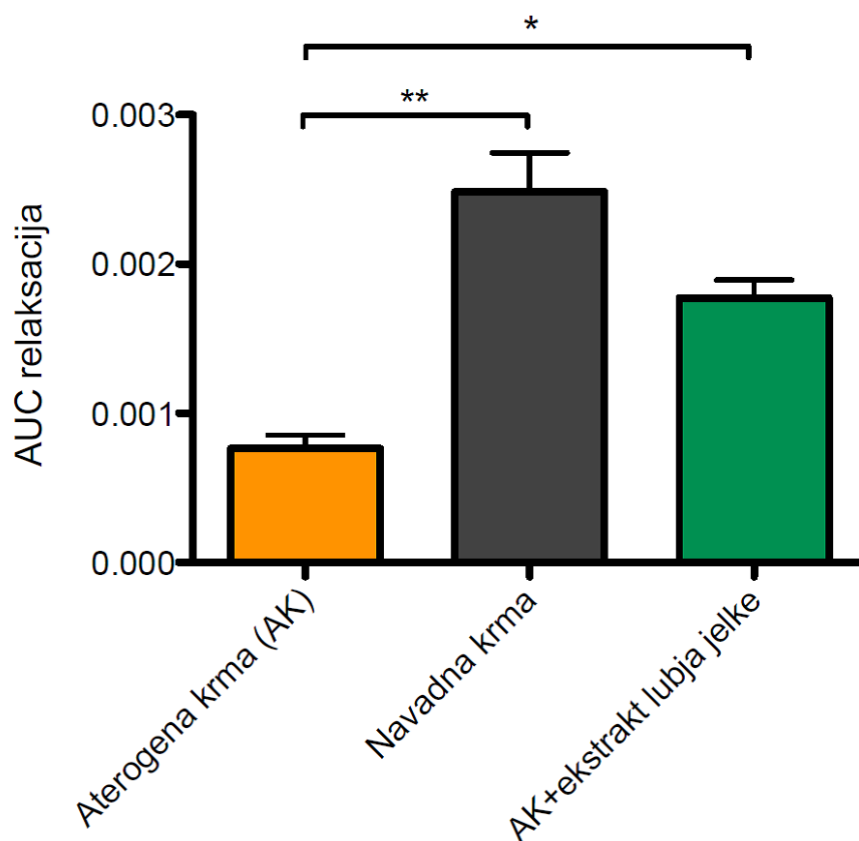
Relaksacijo žilnih obročkov, predhodno skrčenih z 0,1 mmol/L fenilefrinom, smo ugotavljali pri različnih koncentracijah acetilholina (koncentracijsko-relaksacijska krivulja). Vključili smo vse tri skupine živali: osnovna krma, aterogena krma ter aterogena krma z izvlečkom iz lubja bele jelke. Izračunali smo tudi površine pod koncentracijsko-relaksacijsko krivuljo.

Ugotovili smo, da se koncentracijsko-relaksacijske krivulje vseh treh skupin statistično značilno razlikujejo. V skupini, ki je prejemale aterogeno krmo, je bila sposobnost relaksacija najmanjša. Skupina, ki je prejemale aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke je imela signifikantno boljšo relaksacijo v primerjavi s skupino, ki je prejemale le aterogeno krmo. Pri skupini, ki je prejemale osnovno krmo, pa je bila relaksacija v primerjavi s skupino, ki je prejemale aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke, signifikantno boljša (Slika 7).



Slika 7: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Prikazana je sprostitve žilnih obročkov (predhodno skrčenih z fenilefrinom) po kumulativnem dodajanju acetilholina. Rezultati so prikazani kot odstotek sprostitve v odvisnosti od logaritma koncentracije acetilholina. Točke na grafu predstavljajo povprečje rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah, ki so izraženi kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin. Dvofaktorska analiza variance in Bonferronijev post-hoc test: primerjava skupine, ki je prejela aterogeno krmo, s skupino, ki je prejela aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke (xxx pomeni $p < 0,001$; xx pomeni $p < 0,01$; x pomeni $p < 0,05$) in primerjava skupine, ki je prejela aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke, s skupino, ki je prejela navadno krmo (*** pomeni $p < 0,001$; ** pomeni $p < 0,01$; * pomeni $p < 0,05$). Statistično pomembno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$. Legenda: n-število živali, ki smo jih uporabili za poskuse na izoliranih torakalnih aortah, m-število uporabljenih žilnih obročkov, ki smo jih izolirali iz živali.

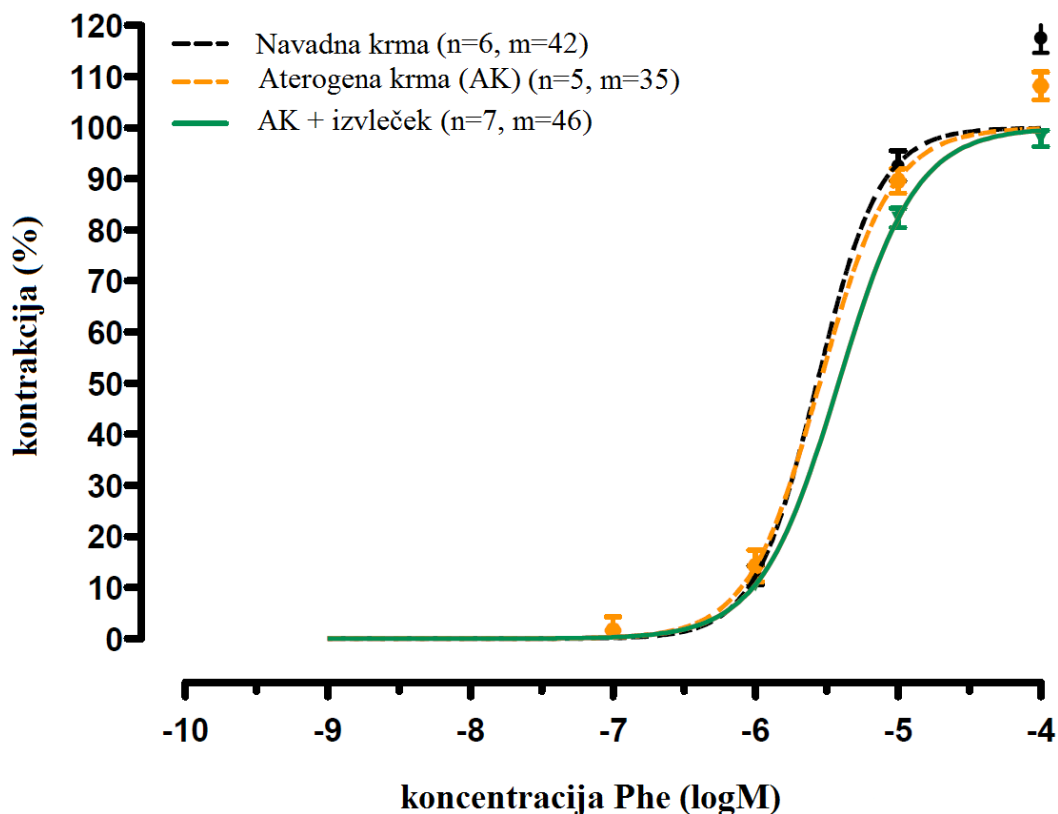
Podobno smo ugotovili tudi pri primerjavi površin pod krivuljami. Dodatek izvlečka iz lubja bele jelke k aterogeni krmi 2,3-krat izboljša sprostitvev žil v primerjavi z aterogeno krmo ($p < 0,05$). Žile buder, ki so prejemale navadno krmo, pa se v primerjavi z žilami buder, ki so prejemale le aterogeno krmo 3,3-krat bolje sproščajo ($p < 0,01$). Sprostitev je bila v skupini z osnovno krmo boljša v primerjavi z aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke, vendar razlika ni bila značilna (Slika 8).



Slika 8: Prikaz površin pod koncentracijsko-relaksacijsko krivuljo, od koncentracije acetilholina 10^{-9} do 10^{-4} M. Enofaktorska analiza variance in Bonferronijev post-hoc test: primerjava skupine, ki je prejemala aterogeno krmo, s skupino, ki je prejemala aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke (* pomeni $p < 0,05$) in primerjava skupine, ki je prejemala aterogeno krmo, s skupino, ki je prejemala navadno krmo (** pomeni $p < 0,01$). Statistično pomembno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$.

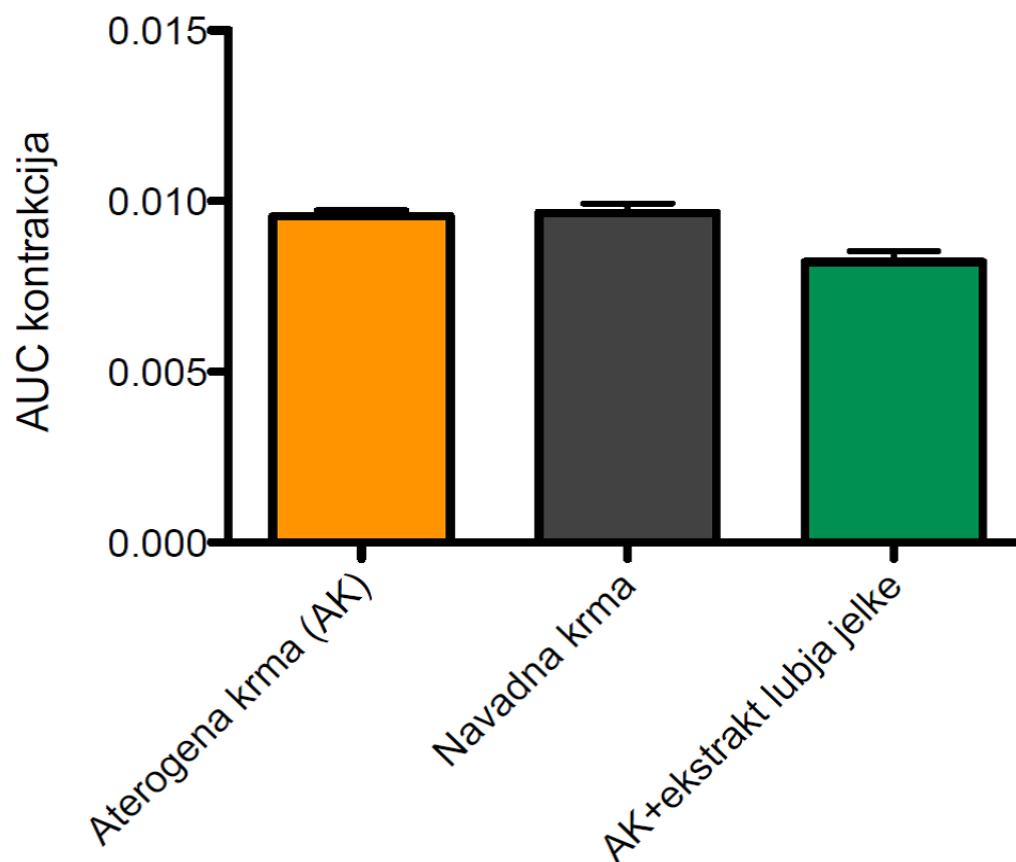
4.1.2 Meritve sposobnosti kontrakcije žilnih obročkov s fenilefrinom

Primerjava sposobnosti kontrakcije žilnih obročkov (po relaksaciji z acetilholinom) pri različnih koncentracijah fenilefrina, je pokazala, da med skupinami ni značilnih razlik (Slika 9, $p > 0,05$).



Slika 9: Koncentracijsko-skrčitvena krivulja. Prikazana je skrčitev žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju fenilefrina. Rezultati so prikazani kot odstotek skrčitve v odvisnosti od logaritma koncentracije fenilefrina. Uporabljena statistična testa: dvofaktorska analiza variance in Bonferronijev post-hoc test. Legenda: n-število živali, ki smo jih uporabili za poskuse na izoliranih torakalnih aortah, m-število uporabljenih žilnih obročkov.

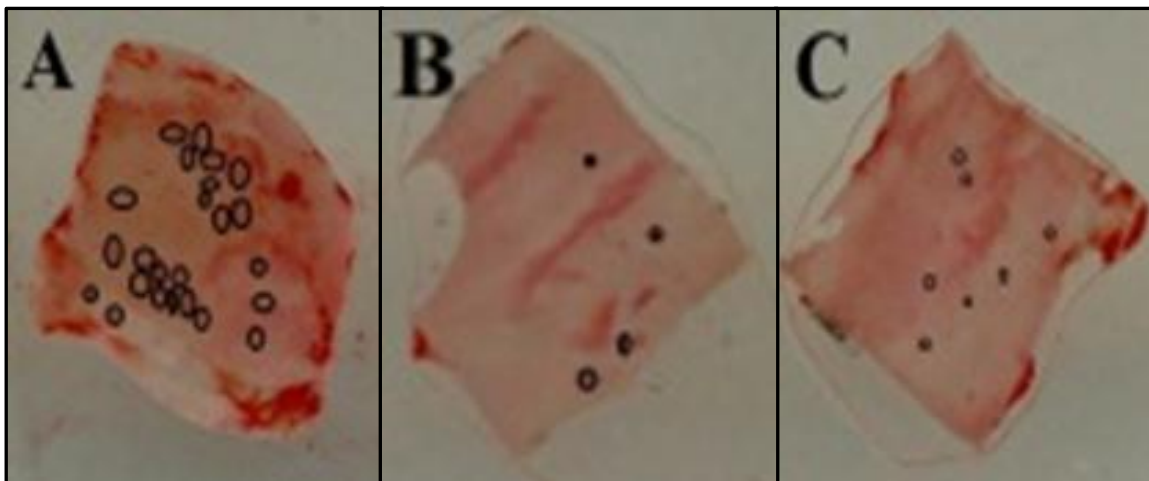
Podobno je razvidno tudi iz grafa površin pod koncentracijsko-skrčitveno krivuljo.



Slika 10: Prikaz površin pod koncentracijsko-skrčitveno krivuljo. Uporabljena statistična testa: enofaktorska analiza variance in Bonferronijev post-hoc test.

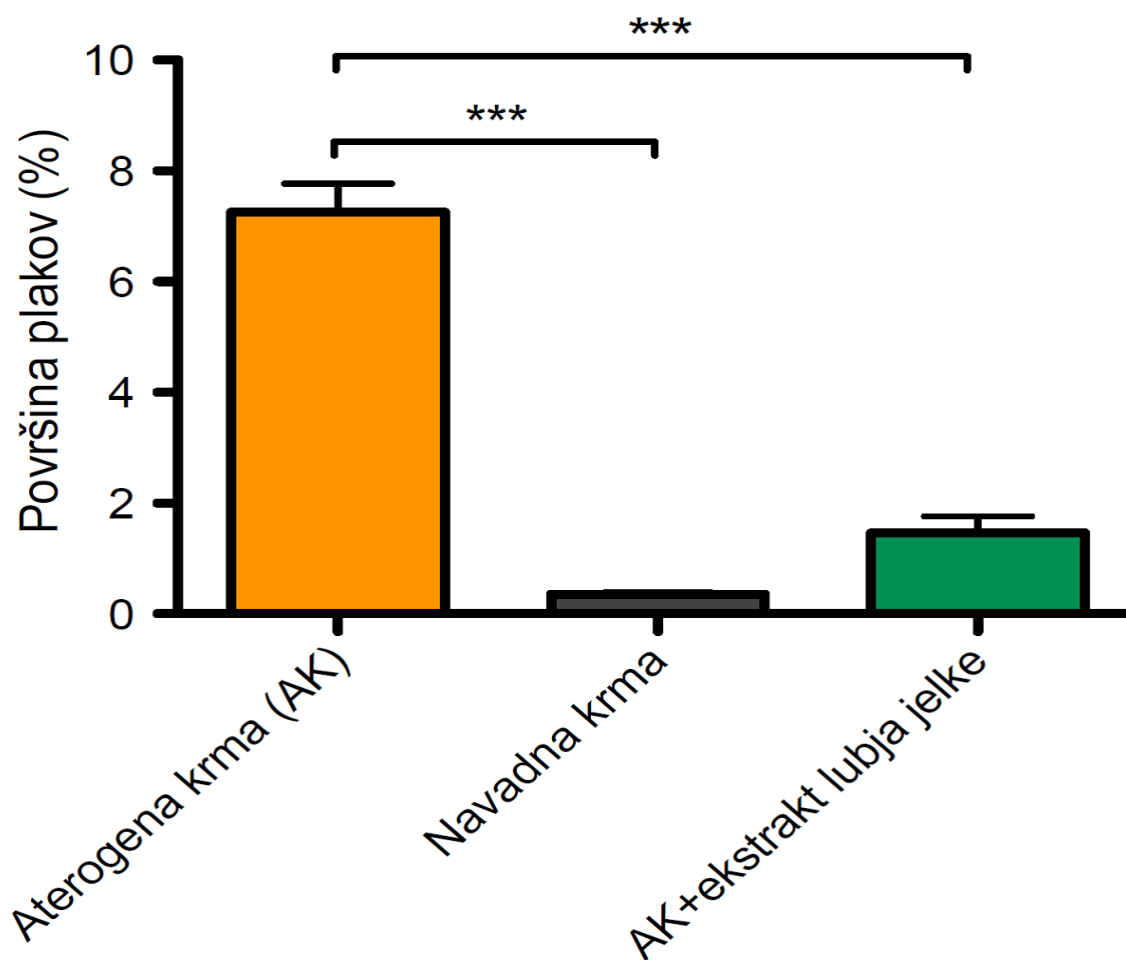
4.2 Morfometrija

Z raztopino Oil Red O smo barvali lumen vzdolžno prerezanih abdominalnih aort pri vseh treh skupinah živali (osnovna krma, aterogena krma ter aterogena krma z izvlečkom iz lubja bele jelke). Prisotne maščobne lehe so se obarvale rdeče (Slika 11).



Slika 11: Z raztopino Oil Red O barvane vzdolžno prerezane abdominalne aorte buder. **A:** slika abdominalne aorte budre krmljene z aterogeno krmo. **B:** slika abdominalne aorte budre krmljene z osnovno krmo. **C:** slika abdominalne aorte budre krmljene z aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke. Prisotne maščobne lehe v lumnu aorte so obkrožene s črno barvo.

Ko smo primerjali povprečje deležev površin leh glede na celotno površino aorte med skupinami z enofaktorsko analizo variance, smo ugotovili, da je prišlo med skupinami do statistično značilnih razlik. Največjo površino so zavzemale lehe pri skupini krmljeni z aterogeno krmo, najmanjšo pa pri skupini krmljeni z osnovno krmo. Pri skupini, ki je prejela aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke je bila površina leh glede na lumen aorte v povprečju malo večja kot pri skupini, krmljeni z osnovno krmo (slika 12).



Slika 12: Statistična primerjava površin maščobnih leh med posameznimi skupinami buder. Uporabljena statistična testa: enofaktorska analiza variance in Bonferronjev post-hoc test. Statistično značilno razliko predstavlja $p < 0,05$ (***) pomeni $p < 0,001$).

5 RAZPRAVA

V naši raziskavi smo preučevali funkcionalne in morfološke spremembe aorte, ki nastanejo kot posledica kroničnega krmljenja z aterogeno krmo. Ugotavljali smo, ali lahko z dodatkom izvlečka iz lubja bele jelke k aterogeni krmi, izboljšamo funkcionalne in morfološke spremembe aorte.

5.1 Razprava o materialih in metodah

5.1.1 Sestavine prehrane za krmljenje buder

5.1.1.1 Aterogena krma

V raziskavi smo uporabili enako sestavo aterogene krme kot v raziskavi za diplomsko nalogo leta 2011 (57). V omenjeni nalogi so s preizkušanjem pripravili obstojno proaterogeno dieto s katero so v kratkem času uspeli inducirati funkcionalne in morfološke spremembe žil. Na podlagi porabljene krme v vseh kletkah smo ocenili povprečno količino hrane, ki jo budra poje v enem dnevu. Znašala je 50 g na budro na dan. Maščobe, holesterol, ogljikovi hidrati in beljakovine, ki smo jih vključili v aterogeno krmo, povzročajo zvišanje koncentracije holesterola in trigliceridov v krvi in predstavljajo pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze. Primernost take krme je tudi nam uspelo potrditi, saj smo spremembe na žilah inducirali še prej kot v omenjeni diplomii.

Za induciranje aterosklerotičnih sprememb obstajajo poleg aterogene krme tudi druge metode: kemične (aplikacija agensov, ki poškodujejo žilo), mehanske (vstavitev balonskega katetra v žilo ali obročka okrog žile) in laserske. Vse te metode poškodujejo žilni endotelij. Njihova slabost je, da so omejene le na poškodbo ene žile, medtem ko ima aterogena krma sistemske učinke, saj induciramo spremembe na vseh žilah in se tako bolj približamo realnemu procesu aterogeneze. V raziskavah se zato najpogosteje uporablja induciranje ateroskleroze z aterogeno krmo, ostale metode pa se večinoma uporabljajo le kot dodatek k aterogeni krmi, za induciranje bolj izrazitih sprememb. Tudi mi bi lahko uporabili kombinacijo aterogene krme s katero od teh metod in tako povzročili še bolj izrazite spremembe na žilah.

V času 8-tedenskega krmljenja med oktobrom in decembrom, so se na žilah pojavile funkcionalne in morfološke spremembe. Kljub temu, da smo uspeli inducirati aterosklerozo, bi bilo zanimivo eksperiment ponoviti tako, da bi krmljenje trajalo dalj časa.

Ker smo bili časovno omejeni, smo se odločili za tak časovni razpon, ki je vseeno omogočal uspešno izvedbo poskusa.

5.1.1.2 Izvleček iz lubja bele jelke

Dosedanje raziskave narejene na izvlečku iz lubja bele jelke so pokazale, da ima močno antioksidativno delovanje *in vitro*. Predvidevamo, da so farmakološko aktivne spojine v izvlečku polifenolne spojine. Nekatere polifenolne spojine, ki so prisotne v izvlečku, najdemo tudi v drugih rastlinskih produktih (zeleni čaj, kakav, izvleček iz francoskega obmorskega bora itd.) in so predmet mnogih raziskav. Ugotovili so, da vnos zadostnih količin polifenolnih spojin ugodno vpliva na zdravje ter zniža tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni (30, 36, 37, 40).

Učinkovine s protivnetnim in antioksidativnim delovanjem imajo čedalje večjo vlogo v preprečevanju in zdravljenju ateroskleroze. Radikali in z njimi povezan oksidativni stres, povzročajo okvaro žilnega endotelija ter povečano oksidacijo LDL delcev. Poškodbo endotelija in napredovanje ateroskleroze pa dodatno spodbuja še vnetje v žilni steni. Polifenolnim spojinam pripisujejo tudi učinek na endotelijsko funkcijo. Okvara endotelija, za katero je značilna predvsem zmanjšana sinteza NO, je pomemben dejavnik pri nastanku ateroskleroze. Po vnosu polifenolnih spojin so zaznali izboljšano funkcijo endotelija, ugotovili pa so tudi antitrombotično, antihipertenzivno in antidiabetično delovanje (30, 36, 40).

Na podlagi pregleda raziskav o vplivu polifenolnih spojin na srčno-žilni sistem, smo sklepali, da tudi izvleček iz lubja bele jelke deluje podobno. Pomagali smo si predvsem z raziskavami opravljenimi na izvlečku iz lubja francoskega obmorskega bora, Piknogenolu®. Izvleček iz lubja bele jelke je po sestavi podoben Piknogenolu®, slednjemu so v raziskavah dokazali antioksidativne, protivnetne in druge učinke ter izboljšanje endotelijske funkcije preko povečane sinteze NO (49).

V naši raziskavi smo se osredotočili na funkcionalne in morfološke lastnosti žil in vpliv izvlečka iz lubja bele jelke nanje. Predvsem smo se omejili na z izvlečkom povzročeno izboljšano funkcijo endotelija, ostalih učinkov (antioksidativnega, protivnetnega in drugih potencialnih učinkov) pa neposredno nismo merili. Lahko samo sklepamo, da so pripomogli k našim rezultatom. Ugotovili smo, da ima skupina, ki je poleg aterogene krme

prejemala še izvleček iz lubja bele jelke, boljšo sposobnost relaksacije izolirane torakalne aorte in da je prisotnih manj maščobnih leh na abdominalni aorti.

Ker je bila to prva raziskava, opravljena z izvlečkom iz lubja bele jelke na živalih, smo odmerke določili na podlagi raziskav opravljenih na Piknogenolu®.

5.1.2 Poskusne živali

Za proučevanje ateroskleroze se uporabljajo številni živalski modeli. Kljub temu, da idealen živalski model, ki bi popolnoma posnemal nastanek ateroskleroze pri človeku ne obstaja, pa nam ti modeli lahko posredujejo ključne informacije. Miši in podgane so najbolj uporabljen model za preučevanje ateroskleroze, čeprav imajo drugačen lipoproteinski profil kot človek in jim težko induciramo aterosklerozo (lažje pri genetsko spremenjenih miših). Njihova prednost je lažja in ekonomična vzreja, saj potrebujejo manj prostora in hrane. Enostavnejše je tudi rokovanje z njimi. Človeškemu organizmu najbolj podoben živalski model pa so prašiči (59).

Odločili smo se, da v našo raziskavo vključimo budre reje DHN (Dunkin Hartley), obeh spolov. Lipoproteinski profil buder je namreč zelo podoben človeškemu. Imajo pa tudi nekatere slabosti povezane z vzrejo, saj zaradi velikosti potrebujejo več prostora in hrane v primerjavi z manjšimi živalmi. Kljub pomanjkljivostim, ki smo jih opazili, predstavljajo budre dober model za proučevanje s prehrano inducirane ateroskleroze, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi.

Živali so bile do začetka raziskave redno veterinarsko nadzorovane in torej zdrave. V nekaterih podobnih raziskavah so živalim kljub temu pred začetkom raziskave opravili še ultrazvok žil, s katerim so preverili zdravje žil. Lahko bi opravili tudi nekatere laboratorijske preiskave, npr. odvzem krvi pred začetkom in na koncu hranjenja ter določili vrednost celokupnega holesterola, raven HDL in LDL ter trigliceridov.

Živali smo na začetku razdelili v tri skupine. Prva skupina je prejemala osnovno krmo, druga aterogeno krmo, tretja pa aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke. Vse skupine živali so bivale v enakem okolju, s konstantno temperaturo, vlažnostjo in menjavo svetlobe. Samo okolje na razvoj bolezni torej ni imelo vpliva. Vse živali so imele na razpolago neomejeno količino hrane. Slabost takega krmljenja je, da nekatere živali lahko zaužijejo več hrane, v primeru dodane učinkovine pa tudi večje količine učinkovine, spet

druge pa temu primerno manj. Poskus bi lahko izvedli tako, da bi krmili vsako budro posebej. Tako bi zagotovili, da bi vsaka budra zaužila enako količino hrane in učinkovin. To pa bi zahtevalo precej več našega časa. Glede na dejstvo, da so budre rastlinojede živali, je možno, da jim okus hrane ni ustrežal oz. da je nekaterim budram ustrežal bolj kot drugim. V tem primeru bi pričakovali, da bi živali, ki so prejemale aterogeno krmo pojedle manj hrane, kar bi zmanjšalo aterogeni učinek te krme. Pri skupini, ki je dobivala izvleček iz lubja bele jelke, je možno, da se zaradi specifične konsistence, ki jo izvleček ima, le-ta ni enakomerno porazdelil med aterogeno krmo. To pomeni, da je količina zaužitega izvlečka med budrami lahko variirala ne samo glede na količino zaužite hrane, ampak tudi na vsebnost izvlečka v hrani. Možno je tudi, da je izvleček iz lubja bele jelke zaradi grenkega okusa zmanjšal hranjenje v tej skupini. Tudi zato bi bilo morda bolje, da bi izvleček aplicirali per os vsaki budri posebej kot smo že omenili, vendar pa bi s tem živali izpostavili dodatnemu stresu.

Vpliv spola na nastanek sprememb v žilah buder nismo posebej preučevali, saj sta bila v vsaki skupini prisotna oba spola. Glede na to, da so v raziskavah potrdili vpliv spola na nastanek aterosklerotičnih sprememb (27, 60), bi bilo smiselno izvesti tudi to primerjavo. Število samic in samcev v vsaki kletki ni bilo enako, zato je možno, da bi bili rezultati pri skupini, ki je prejemala izvleček iz lubja bele jelke boljši, saj je imela edino ta skupina relativno več samcev kot samic. Iz raziskav pa vemo, da imajo estrogini zaščitno delovanje na srčno-žilni sistem (27, 60).

Ker smo bili z izvedbo poskusa časovno omejeni, nam kljub vzetim vzorcem za gensko ekspresijo te ni uspelo izvesti. Lahko bi ugotavljali tudi genetsko podvrženost buder za razvoj ateroskleroze, kar je pomemben dejavnik tveganja. Poleg tega so Auclair in sodelavci dokazali, da katehini modulirajo ekspresijo nekaterih genov, ki so udeleženi v transportu in metabolizmu lipidov. To je lahko eden od vzrokov zaščitnega delovanja katehinov v aterosklerozi (61).

Pred usmrtnitvijo smo živalim intraperitonealno injicirali heparin, ki je preprečil strjevanje krvi. Ker se kri ni strdila, je takoj, ko smo pričeli z izolacijo, odtekla. S tem smo se izognili odvečni krvi, ki bi motila izvajanje poskusov, še posebej pri morfometriji, saj bi prekrila maščobne plake. Za usmrtitev živali smo uporabili CO₂. Metoda je enostavna, hitra in

neboleča. CO₂ tudi ne vpliva na nadaljne raziskave na žilah buder. Priprava živali in izolacija žil je bila vedno enaka, hitra in standardizirana.

5.2 Razprava o rezultatih

5.2.1 Poskusi na izoliranih torakalnih aortah buder

Žilne obročke torakalnih aort smo najprej skrčili s KCl. S tem smo preverili odzivnost uravnoteženih žilnih obročkov. Krčenje obročkov žil s KCl je od endotelija neodvisen mehanizem. KCl povzroča depolarizacijo membrane gladkih-mišičnih celic žil, kar aktivira napetostno odvisne Ca²⁺-kanale na sarkolemi. Koncentracija Ca²⁺ v citosolu naraste, gladka mišica se skrči (62).

S poskusi na žilnih obročkih smo preverili funkcionalne in morfološke lastnosti izoliranih torakalnih aort. Ugotavljali smo, ali se le-te med skupinami razlikujejo. Zanimalo nas je, če so pri skupini, ki je prejela aterogeno krmo, funkcionalne in morfološke lastnosti slabše, pa tudi, če je pri skupini, ki je poleg aterogene krme prejela izvleček iz lubja bele jelke, odziv žil boljši v primerjavi z aterogeno dieto. Odziv žilnih obročkov je odvisen od gladkih mišičnih celic, endotelija ter premera žilnih obročkov. V primeru patoloških sprememb, ki prizadenejo sloj gladkih mišic ali endotelij, lahko pa spremenijo tudi premer žile, je odziv žil zmanjšan. Poleg tega na odziv žil vpliva tudi koncentracija vazorelaksatorja in vazokonstriktorja.

5.2.1.1 Sposobnost relaksacije žilnih obročkov z acetilholinom

Iz koncentracijsko-relaksacijske krivulje je razvidno, da so se obročki torakalnih aort predhodno skrčeni z 0,1 mmol/L fenilefrinom, relaksirali pri vseh treh skupinah. Relaksacija je bila odvisna od koncentracije acetilholina. Z uporabo dvofaktorske analize variance smo ugotovili, da se skupine med seboj statistično značilno razlikujejo. Pri primerjavi površin pod krivuljo smo ugotovili podobno. Obročki so se najbolje relaksirali pri skupini, ki je prejela osnovno krmo, skupina krmljena z aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke je imela malo slabšo relaksacijo, najslabša relaksacija pa je bila pri skupini, ki je bila krmljena z aterogeno krmo. Pričakovali smo, da bo imela skupina, krmljena z aterogeno krmo slabše funkcionalne lastnosti žil, kar se kaže v zmanjšani relaksaciji. To smo tudi potrdili. Boljše relaksacije pri skupini, krmljeni z aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke, kot pri skupini, krmljeni z osnovno krmo, nismo uspeli

dokazati. Domnevamo, da bi bili rezultati pri skupini krmljeni z aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke boljši, če bi v krmo zamešali večji odmerek izvlečka. To bi bilo v prihodnjih raziskavah smiselno preizkusiti. Verjetno pa bi rezultate izboljšali tudi v primeru aplikacije izvlečka per os, vsaki budri posebej. Prav tako ne vemo, kakšna sta absorpcija in metabolizem izvlečka, saj nismo določevali koncentracije spojin iz izvlečka in njihovih metabolitov v krvi. Tega do sedaj ni določeval še nihče. Predvidevamo, da sta absorpcija in metabolizem spojin, ki se nahajajo v našem izvlečku podobna kot pri sorodnih polifenolnih spojinah, ki jih vsebujejo drugi rastlinski produkti in za katere so bile opravljene raziskave. Največ so proučevali flavanole iz zelenega čaja in kakava. Ugotovili so, da je epigalokatehin galat edini znani polifenol, prisoten v večjih količinah v prosti obliki v plazmi (drugi so metilirani ali vezani na glukuronid). Prav tako so potrdili, da so flavanoli podvrženi bakterijskemu metabolizmu v črevesju, epikatehin galat in epigalokatehin sta izjemi (33). Kljub tem ugotovitvam, pa imajo tudi nekateri metaboliti biološko aktivnost (41). Menimo, da bi bilo v nadaljnjih raziskavah koristno določiti koncentracije spojin iz izvlečka iz lubja bele jelke in njihovih metabolitov v krvi.

Ker je za aterosklerozo značilna okvara žilnega endotelija, ki se med drugim kaže tudi v zmanjšani sintezi NO, je razumljivo, da so se obročki skupine, ki je prejela aterogeno krmo, najslabše relaksirali. Uspeli smo dokazati, da dodatek izvlečka k aterogeni krmi relaksacijo izboljša. Predvidevamo, da je relaksacija, povzročena z izvlečkom iz lubja bele jelke, odvisna od endotelija. Podatki drugih raziskav namreč kažejo, da izvlečku iz lubja bele jelke sorodne polifenolne spojine drugih rastlinskih produktov (predvsem katehin, epikatehin, epigalokatehin) inducirajo vazodilatacijo preko povečane sinteze NO (aktivirajo eNOS) (33). Pri proučevanju vpliva flavanolov in procianidinov iz kakava, na izoliranih obročkih podganje aorte, so opazili od endotelija odvisno vazorelaksacijo, ki je bila posledica povečane sinteze NO. Koncentracija flavanolov v kivetu je bila primerljiva s koncentracijo flavanolov, prisotno v plazmi (39, 41). Da je vpliv flavanolov na relaksacijo res odvisen od endotelija, so pokazali tudi z analizo urina, v katerem so po kroničnem uživanju s flavonoidi bogate hrane zaznali povečane količine metabolitov NO (39, 41). Po uporabi inhibitorjev NOS pa se je vazodilatacija zmanjšala (41). Tudi katehini iz zelenega čaja delujejo podobno. Pri podganah, ki so pile vodo z dodatkom katehinov iz zelenega čaja, so opazili boljšo, z acetilholinom povzročeno relaksacijo (predhodno so žile skrčili s

fenilefrinom) (38). Izvlečku iz lubja obmorskega bora je bila prav tako dokazana od endotelija odvisna relaksacija (49).

5.2.1.2 Sposobnost kontrakcije žilnih obročkov s fenilefrinom

Iz koncentracijsko-skrčitvene krivulje in grafa, kjer so prikazane površine pod krivuljo, je razvidno, da so se obročki torakalnih aort pri vseh skupinah po kumulativnem dodajanju fenilefina skrčili. Opazimo lahko, da so se vsi obročki pričeli krčiti pri koncentraciji fenilefrina 10^{-6} mol/L, pri nižjih koncentracijah pa fenilefrin ni povzročil kontrakcije. Takšen odziv je verjetno posledica prenizke koncentracije fenilefrina in ne drugih dejavnikov, npr. izbire vazokonstriktorja. Statistično značilnih razlik med skupinami nismo dokazali.

Fenilefrin je selektivni agonist in povzroča vazokonstrikcijo preko adrenergičnih receptorjev α_1 na gladkih mišičnih celicah žil in endoteliju. Ti receptorji so sklopljeni z G-proteinom, njihova aktivacija pa preko PLC sproži nastanek IP_3 in DAG. To vodi v odprtje Ca^{2+} kanalov, koncentracija Ca^{2+} v celici naraste in gladka mišična celica se skrči.

Ker je krčenje žil predvsem posledica delovanja gladkih mišic, so rezultati v skladu s pričakovanji, saj sklepamo, da izvleček iz lubja bele jelke vpliva na funkcijo endotelija, na gladke mišice pa nima vpliva. Sklepamo pa tudi, da aterogena krma v tem času ni povzročila napredovale ateroskleroze, ki bi vplivala tudi na krčenje žil. Zato statistično značilnih razlik med skupinami ni bilo.

5.2.2 Morfometrija

Maščobne lehe v lumnu abdominalne aorte smo dokazali v vseh treh preiskovanih skupinah. Statistična primerjava z uporabo enofaktorske analize variance je pokazala, da med skupinami obstaja statistično značilna razlika.

Fernandez in sodelavci so dokazali, da so budre primeren model za induciranje ateroskleroze, saj so jim v 12 tednih s krmo z visoko vsebnostjo holesterola uspeli inducirati aterosklerotične lehe (63). Tudi mi smo potrdili, da so budre ustrezen živalski model, saj so se maščobne lehe pojavile že po 8 tednih. Pri skupini, krmljeni z aterogeno krmo, je bilo po pričakovanjih prisotnih največ maščobnih leh, saj je dislipidemija pomemben dejavnik tveganja pri razvoju ateroskleroze. Lehe so bile velike in razporejene po celotni notranji površini žilne stene.

Skupina, ki je bila krmljena z aterogeno krmo z dodatkom izvlečka iz lubja bele jelke, je imela 5-krat manj aterosklerotičnih leh v primerjavi s skupino, krmljeno le z aterogeno krmo. Za izvleček iz lubja bele jelke so dokazali močno antioksidativno delovanje *in vitro*. *In vivo* ta učinek ni bil izmerjen, lahko pa sklepamo da tudi v pogojih *in vivo* deluje podobno. Posledica antioksidativnega delovanja je manjša oksidacija LDL delcev in upočasnitev napredovanja ateroskleroze. Mehanizem upočasnitve aterosklerotičnega procesa lahko vključuje še druge poti, ki pa za izvleček iz lubja bele jelke niso bile dokazane. Glede na izsledke raziskav o podobnih polifenolnih spojinah lahko sklepamo, da so možni načini delovanja izvlečka iz lubja bele jelke še: povišanje koncentracije HDL ter znižanje ravni trigliceridov in LDL v krvi, protivnetno, antitrombotično in drugi mehanizmi, ki imajo poleg oksidiranih LDL delcev pomembno vlogo pri tvorbi aterosklerotičnega plaka (30, 36, 40).

Ker smo prvi, ki smo ugotavljali pojav maščobnih leh pri živalih, krmljenih z izvlečkom iz lubja bele jelke v kombinaciji z aterogeno dieto, lahko naše rezultate primerjamo le z rezultati raziskovalcev, ki so podobne poskuse opravili na sorodnih spojinah. Auclair in sodelavci so ugotovili, da dodajanje katehina v hrano zmanjša aterosklerotične lezije pri miših z odstranjenim genom za apoE (61). Kurosawa in sodelavci pa so opazili, da je površina aterosklerotičnih leh pri zajcih manjša, če jim v hrano dodajajo kakavov prah, ki vsebuje predvsem katehine in njihove oligomere (64).

Najmanj maščobnih leh smo opazili pri skupini krmljeni z osnovno krmo in sicer kar 20-krat manj v primerjavi s skupino krmljeno z aterogeno krmo. Kljub temu, da smo dokazali zaščitni učinek izvlečka iz lubja bele jelke na žilah, pa nam ni uspelo doseči zdravega stanja žil, saj je imela skupina, ki je skupaj z aterogeno krmo prejemala še izvleček iz lubja bele jelke, nekoliko večji delež maščobnih leh kot skupina krmljena z osnovno krmo. Delno je za tak rezultat lahko odgovorna neenakomerna porazdelitev spola, saj je bilo v skupini, ki je prejemala aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke več samcev kot v ostalih dveh skupinah. Izsledki raziskav pa so pokazali, da samice počasneje razvijejo maščobne lehe (zaščitni učinek estrogena) kot samci (27). Morda bi boljše rezultate dobili, če bi odmerek izvlečka iz lubja bele jelke povečali, vendar pa zaenkrat še ne vemo ali je učinek v tem območju odvisen od odmerka.

Postopek priprave žil za morfometrijo (odstranjevanje okoljnega veziva in maščevja) je zaradi majhnih obročkov žil težaven. Težave pa so bile tudi pri določanju maščobnih leh. Okoljne vezivo in maščoba, ki ju nismo uspeli odstraniti, sta motila analizo, saj smo včasih težko razlikovali med maščobno leho, vezivom (proseva skozi žilo in lahko izgleda kot maščobna leha) ter maščobo, ki se nahaja izven žile in se z raztopino Oil Red O barva kot maščobna leha (razlika je le v intenzivnosti obarvanja).

6 ZAKLJUČEK

V naši raziskavi smo z aterogeno krmo inducirali funkcionalne in morfološke spremembe na srčno-žilnem sistemu buder. Po 8 tednih krmljenja so se pri budrah krmljenih z aterogeno krmo pojavile maščobne lehe po celotnem lumnu abdominalne aorte, slabša pa je bila tudi žilna funkcija, saj je bil sprostivni odziv žil pri tej skupini najslabši. S tem smo potrdili, da so budre primeren model za induciranje ateroskleroze, kar so dokazali že drugi avtorji.

Dokazali smo tudi, da izvleček iz lubja bele jelke dodan k aterogeni krmi izboljša funkcionalne in morfološke lastnosti aorte. Ta skupina je imela v primerjavi s skupino, ki je prejela le aterogeno krmo, boljše funkcionalne lastnosti, saj je bil sprostivni odziv na acetilholin statistično-značilno boljši. Poleg tega je imela skupina krmljena z aterogeno krmo z izvlečkom iz lubja bele jelke statistično-značilno manj prisotnih maščobnih leh v steni abdominalne aorte v primerjavi s skupino, ki je prejela le aterogeno krmo.

V raziskavi nismo uspeli dokazati, da izvleček iz lubja bele jelke žilno funkcijo popolnoma ohrani, saj je bil sprostivni odziv na acetilholin slabši v primerjavi s skupino, ki je prejela osnovno krmo. Tudi maščobnih leh v steni abdominalne aorte je bilo nekoliko več kot pri skupini, krmljeni z osnovno krmo.

Z raziskavo nam je uspelo potrditi, da ima izvleček iz lubja bele jelke ugodne učinke na srčno-žilni sistem buder. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno določiti koncentracijsko odvisnost učinka. Poleg tega bi bilo treba raziskati absorpcijo in metabolizem izvlečka. To bi lahko naredili z določanjem spojin iz izvlečka in njihovih metabolitov v krvi. Smiselno bi bilo tudi preučiti mehanizem delovanja izvlečka, ki je odgovoren za njegove ugodne učinke. Mi smo možne mehanizme delovanja le predpostavljali na podlagi sorodnih polifenolnih spojin iz drugih raziskav. Do sedaj namreč še ni bilo takih raziskav na izvlečku iz lubja bele jelke, dokazana je bila le močna antioksidativna aktivnost *in vitro*. Smiselno bi bilo meriti koncentracije trigliceridov, celokupnega holesterola, HDL, LDL v krvi, antitrombotično in antihipertenzivno aktivnost ter antioksidativno aktivnost *in vivo* po kroničnem uživanju izvlečka.

7 LITERATURA

1. Cör A, Legan M, Milutinović-Živin A, Petrovič D, Štiblar-Martinčič D, Vraspir-Porenta O, Zorc M, Zorc-Pleskovič R: Histologija, učbenik, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo, Littera Picta, Ljubljana, 2005: 91-96.
2. Guyton CA, Hall EJ: Textbook of Medical Physiology, 11th Ed., Elsevier, Philadelphia, USA, 2006: 171.
3. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W: Histology: A Text and Atlas, 4th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003: 326-335.
4. Štiblar-Martinčič D: Histologija, univerzitetni učbenik, 1. izdaja, Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Littera Picta, Maribor, 2010: 46-48.
5. Zorc-Pleskovič R, Milutinović-Živin A, Petrovič D: Histologija, učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Littera Picta, Ljubljana 2006: 49-53.
6. <http://en.wikipedia.org/wiki/Artery> (datum dostopa: 10. 2. 2012).
7. Clinton Webb R: Smooth muscle contraction and relaxation. Advan in Physiol Edu 2003; 27: 201-206.
8. Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Berne & Levy principles of physiology, 4th Ed., Mosby, St. Louis, 2006; 186-191.
9. Kogoj P, Hawlina S, Bunc M: Od endotelija odvisno uravnavanje žilnega napona. Med razgl 2008; 47: 31-42.
10. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: Rang and Dale's pharmacology, 6th Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007; 29, 144-188, 265-273, 298-320.
11. Bajrović F, Bresjanac M, Črne-Finderle N, Grubič Z, Kordaš M, Kovačič U, Marš T, Ribarič S, Sket D, Sketelj J, Šuput D, Zorec R, Živin M: Temelji patološke fiziologije, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Littera picta, Ljubljana, 2009: 175-184.
12. Vanhoutte PM: Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. Circ J 2003; 67: 572-575.
13. Chatterjee A, Catravas JD: Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. Vascul Pharmacol 2008; 49: 134-140.
14. Lemke TL, Williams DA: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2002; 295-298.

15. Brunton L, Chabner B, Knollmann B: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th Ed., McGraw-Hill, New York, 2011: 171-238.
16. Silbernagl S, Despopoulos A: Color Atlas of Physiology, 6th Ed., Thieme, Stuttgart, New York, 2009: 78-87.
17. Poredoš P: Pomen in vloga vaskularne medicine. Zdrav vestn 2008; 77: 151-157.
18. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: Interna medicina, 4. izdaja, Littera picta: Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 241-246.
19. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G: Ateroskleroza-dejavniki tveganja in zapleti. Medicinski mesečnik 2007; 3 (7/8): 235-240.
20. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, Robbins SL: Robbins basic pathology, 8th Ed., Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2007: 339-352.
21. Spagnoli LG, Bonanno E, Sangiorgi G, Mauriello A: Role of inflammation in atherosclerosis. J Nucl Med 2007; 48: 1800-1815.
22. Pereira IA, Borba EF: The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. Swiss Med Wkly 2008; 138 (37-38): 534-539.
23. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S: Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. Diabetes Care 2009; 32: 314-321.
24. Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction-the first step toward coronary arteriosclerosis. Circ J 2009; 73: 595-601.
25. Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP: Inflammation and the development of atherosclerosis-effects of lipid lowering therapy. J Atheroscler Thromb 2011; 18: 351-358.
26. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G: Preprečevanje in zdravljenje ateroskleroze. Medicinski mesečnik 2007; 3 (9): 293-299.
27. Fernandez ML, Wood RJ: Guinea pigs as models for human cholesterol and lipoprotein metabolism. Sourcebook of models for biomedical research, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2008; 3: 201-212.
28. Fernandez ML, Volek JS: Guinea pigs: A suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. Nutrition and Metabolism 2006; 3:17.
29. Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants, 2th Ed., Lavoisier Publishing, Paris, 1999: 223-261, 309-403.

30. Bhooshan-Pandey K, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009; 2;5: 270-278.
31. Prijatelj N: Farmakognozija; kemijska struktura naravnih spojin, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2005: 82-86.
32. Kočevan N, Glavač I, Kreft S: Flavonoidi. *Farm vestn* 2007; 58: 145-148.
33. Pascual-Teresa S, Moreno DA, Garcia-Viguera C: Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 1679-1703.
34. <http://en.wikipedia.org/wiki/Catechin> (datum dostopa: 3. 4. 2012).
35. Samuelsson G: Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy, 4th Ed., Apotekarsocieteten, Stockholm, 1999: 135-136.
36. Curin Y, Andriantsitohaina R: Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological reports* 2005; 57: 97-107.
37. Crespy V, Williamson G: A review of the health effects of green tea catechins in vivo animal models. *J Nutr* 2004; 134: 3431S-3440S.
38. Moore RJ, Jackson KG, Minihane AM: Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *British Journal of Nutrition* 2009; 102: 1790-1802.
39. Corti R, Flammar AJ, Hollenberg NK, Lüscher TF: Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* 2009; 119: 1433-1441.
40. Vita JA: Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 292-297.
41. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M: (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS* 2006; 103: 1024-1029.
42. Koo SI, Noh SK: Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007; 18: 179-183.
43. Praprotnik N (prevod): Rastline (Tematski leksikoni), Učila International, Tržič, 2008: 31, 118.
44. Brus R: Drevesne vrste na Slovenskem, 1. izdaja, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2004: 12-13.
45. http://sl.wikipedia.org/wiki/Abies_alba (datum dostopa: 10. 4. 2012).

46. Petauer T: Leksikon rastlinskih bogastev, 1. izdaja, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1993: 11.
47. Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schönlaue F, Rohdewald P, Jialal I: Supplementation with a Pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* 2002; 37: 931-934.
48. Enseleit F, Sudano I, Periat D, Winnik S, Wolfrum M, Flammer AJ, Fröhlich GM, Kaiser P, Hirt A, Haile SR, Krasniqi N, Matter CM, Uhlenhuth K, Högger P, Neidhart M, Lüscher TF, Ruschitzka F, Noll G: Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled cross over study. *European Heart Journal* 2012; 10: 1-9.
49. Maimoona A, Naeem I, Saddique Z, Jameel K: A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 133: 261-277.
50. Nishioka K, Hidaka T, Nakamura S, Umemura T, Jitsuiki D, Soga J, Goto C, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y: Pycnogenol[®], French maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilatation in humans. *Hypertens Res* 2007; 30: 775-780.
51. Čajić A: Karakterizacija in poskus identifikacije komponent antioksidativnega ekstrakta lubja navadne jelke (*Abies alba*). Diplomsko delo, Ljubljana, 2011.
52. Bošnjak D: Prodali patentno prijavo. *Delo* 2009; 209: 16.
53. <http://www.arspharmae.com/tema/abigenol%C2%AE-vec-kot-antioksidativna-naravna-zascita/> (datum dostopa 25. 5. 2012).
54. Rezzani R, Porteri E, De Ciuceis C, Bonomini F, Rodella LF, Paiardi S, Boari G, Platto C, Pilu A, Avanzi D, Rizzoni D, Rosei EA: Effects of melatonin and pycnogenol on small artery structure and function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2010; 55: 1373-1380.
55. Berryman AM, Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB: Influence of treatment of diabetic rats with combinations of pycnogenol, β -carotene and α -lipoic acid on parameters of oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 345-352.
56. Maritim A et al.: Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 193-199.

57. Štampar P: Primerjava učinkov aterogene diete na nastanek sprememb v srčno-žilnih tkivih budre pod vplivom delovanja atorvastatina in valsartana. Diplomsko delo, Ljubljana 2011.
58. Solar B: Izolacija biološko aktivnih snovi iz vina z delovanjem na izolirane žile podgane. Diplomsko delo, Ljubljana, 2009.
59. Li X, Liu Y, Zhang H, Ren L, Li Q, Li N: Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein Cell* 2011; 2 (3): 189-201.
60. Perez-Lopez FR, Larrad-Mur L, Kallen A, Chedraui P, Taylor HS: Gender differences in cardiovascular disease: Hormonal and biochemical influences. *Reprod Sci* 2010; 17 (6): 511-531.
61. Auclair S, Milenkovic D, Besson C, Chauvet S, Gueux E, Morand C, Mazur A, Scalbert A: Catechin reduces atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice: A transcriptomic study. *Atherosclerosis* 2009; 204: 21-27.
62. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS: Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: 769-783.
63. Fernandez ML: Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J Nutr* 2001; 131: 10-20.
64. Kurosawa T, Itoh F, Nozaki A, Nakano Y, Katsuda S, Osakabe N, Tsubone H, Kondo K, Itakura H: Suppressive effect of cocoa powder on atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12: 20-28.