

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA KORITNIK

PRIMERJAVA AKUTNIH UČINKOV PARA-KUMARNE IN
PROTOKATEHUJSKE KISLINE TER IZVLEČKA LUBJA NAVADNE
JELKE NA ISHEMIČNO-REPERFUZIJSKE OKVARE IZOLIRANEGA
SRCA PODGANE

COMPARISON OF ACUTE EFFECTS OF PARA-COUMARIC ACID,
PROTocatehuic acid and silver fir bark extract on
ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN ISOLATED RAT HEART

Diplomska naloga

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo 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. znan. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

ZAHVALE

Zahvaljujem se prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in viš. znan. sod. dr. Gorazdu Drevenšku univ. dipl. biol. za mentorstvo ter za strokovne nasvete in pripombe pri nastajanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se Petri Ponebšek in Tamari Milivojević za spodbudne besede in tehnično pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se staršem, da so mi omogočili študij in mi stali ob strani, starim staršem, ki so držali pesti med izpitnimi obdobji ter prijateljem in sošolcem za vse lepe skupne trenutke v času študija.

IZJAVA

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

Predsednik komisije: prof. dr. Odon Planinšek

Članica komisije: asist. dr. Simona Mencej Bedrač

Ljubljana, 2014

Nika Koritnik

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. Zgradba in funkcije srca	1
1.2. Ishemična bolezen srca	2
1.2.1. <i>Simptomi in posledice miokardne ishemije</i>	2
1.2.2. <i>Ishemično/reperfuzijska poškodba</i>	3
1.2.3. <i>Oksidacijski stres ob ishemično/reperfuzijski poškodbi miokarda</i>	4
1.3. Model izoliranega podganjega srca	4
1.4. Ateroskleroza.....	5
1.4.1. <i>Nastanek in razvoj ateroskleroze</i>	5
1.4.2. <i>Dejavniki tveganja in preprečevanje ateroskleroze</i>	6
1.5. Polifenolne spojine	6
1.5.1. <i>Srčno-žilni sistem in polifenolne učinkovine</i>	8
1.5.2. <i>Vloga endotelija in vpliv polifenolnih spojin nanj</i>	9
1.6. Izvleček lubja jelke	9
1.7. Para-kumarna kislina	10
1.8. Protokatehajska kislina.....	13
2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. Poskusne živali	16
3.2. Reagenti in raztopine pri poskusih na izoliranih podganjih srcih	16
3.3. Pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na izoliranih podganjih srcih	17
3.4. Izolacija podganjih src po Langendorffu.....	18
3.4.1. <i>Potek poskusov na izoliranem podganjem srcu</i>	19
3.4.2. <i>Merjene spremenljivke</i>	19
4. REZULTATI.....	22
4.1. Koronarni pretok	22
4.2. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)	24
4.3. Moč kontrakcij levega ventrikla	26

4.4. Frekvenca srčnih utripov	28
4.5. Aritmije.....	30
4.5.1. Asistolija.....	31
4.5.2. Ventrikularna fibrilacija.....	32
4.5.3. Ventrikularna tahikardija.....	33
4.5.4. Ekstrasistola ali ventrikularni prezgodnji utrip	34
4.5.5. Trajanje vseh aritmij	35
5. RAZPRAVA.....	36
5.1. Razprava o materialih in metodah	36
5.1.1. Protokatehajska in p-kumarna kislina ter izvleček lubja jelke.....	36
5.1.2. Poskusne živali	37
5.1.3. Model izoliranega podganjega srca.....	37
5.2. Razprava o rezultatih	38
5.2.1. Koronarni pretok.....	38
5.2.2. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)	39
5.2.3. Moč kontrakcij levega ventrikla	39
5.2.4. Frekvenca srčnih utripov.....	40
5.2.5. Pojavljanje in trajanje aritmij	40
5.3. Primerjava naših rezultatov s podobnimi raziskavami	41
6. ZAKLJUČEK	43
7. LITERATURA	45

POVZETEK

Srčno žilne bolezni predstavljajo enega najpogostejših vzrokov smrtnosti v razvitem svetu. Številne raziskave so pokazale, da lahko z vnosom polifenolnih spojin zmanjšamo verjetnost nastanka bolezni srca in ožilja in v nekaterih primerih zmanjšamo že nastale okvare. Ti učinki se kažejo predvsem zaradi antioksidacijskega in protivnetnega delovanja polifenolnih spojin. Te najdemo v številnih rastlinah, med drugim tudi v izvlečku lubja navadne jelke.

Ker je akutna aplikacija izvlečka lubja navadne jelke pokazala zaščitni učinek pred ishemično-reperfuzijskimi okvarami izoliranega srca podgane, je bil naš namen ugotoviti ali in v kakšni meri tak učinek izkazuje tudi para-kumarna in protokatehujska kislina, ki sodita med glavne sestavine izvlečka lubja jelke.

Poskuse smo izvajali na izoliranih podganjih srcih po Langendoffovi metodi. Srca smo perfundirali z oksigenirano raztopino Krebs- Henseleit, ji dodali protokatehujsko oziroma p-kumarno kislino in jih po 30 minutah izpostavili 40 minutni ishemiji, čemur je sledila 50 minutna reperfuzija z isto raztopino kot na začetku. Tekom poskusa smo merili spremenljivke, s katerimi smo določili stopnjo ishemično-reperfuzijske okvare srčne mišice: koronarni pretok, moč kontrakcij levega ventrikla, frekvenco utripov srca, stopnjo sproščanja laktatne dehidrogenaze in pogostost pojavljana aritmij v reperfuziji.

Rezultati so pokazali, da protokatehujska in p-kumarna kislina srčnih mišičnih celic ne ščitita pred ishemično-reperfuzijskimi okvarami enakovredno izvlečku lubja jelke, saj nista značilno znižali hitrosti sproščanja laktatne dehidrogenaze. Protokatehujska in p-kumarna kislina sta skrajšali čas trajanja določenih vrst aritmij, nista pa značilno skrajšali celokupnega časa trajanja aritmij, kot ga je izvleček in zato le delno prispevata k antiaritmogenemu učinku izvlečka lubja jelke. Tako protokatehujska in p-kumarna kislina, kot tudi izvleček lubja jelke povišajo koronarni pretok, kar kaže na njihov vazodilatorni učinek.

V raziskavi smo potrdili, da imata ob akutni aplikaciji tudi protokatehujska in p-kumarna kislina sposobnost vazodilatacije, ne ščitita pa izoliranega podganjega srca pred ishemično-reperfuzijskimi poškodbami, kot je to dokazano za izvleček lubja jelke. Zato lahko zaključimo, da ima izvleček boljše zaščitno delovanje na izolirano podganje srce kot

protokatehujska ali p-kumarna kislina. Obe pa deloma prispevata k njegovim zaščitnim učinkom, ki so verjetno posledica sinergističnega delovanja več spojin, ki ga sestavljajo.

ABSTRACT

Cardiovascular disease presents one of the leading causes of mortality in Western World. Researches have shown that the intake of polyphenol compounds can reduce the incidence of cardiovascular disease because of the anti-oxidative and anti-inflammatory activity of those substances. Polyphenolic compounds can be found in many plants, one among them is also silver fir (*Abies alba*) where we can find them in the bark extract.

The acute application of silver fir bark extract showed protective effects towards ischemic/reperfusion injury in isolated rat heart. Para-coumaric and protocatechuic acid are two of the many compounds of silver fir bark extract and for that reason our aim was to find out whether they also possess similar effect to whole bark extract and what extent of protective effects they can perform.

Experiments were carried out on the isolated rat hearts according to Langendorff's method. Hearts were perfused with oxygenized Krebs-Henseleit solution which contained para-coumaric or protocatechuic acid. After 30 minutes hearts were subjected to 40 min zero-flow ischemia, followed by 50 min reperfusion with the same solution as at the beginning. In order to evaluate the severity of myocardial damage caused by ischemia/reperfusion we measured the following parameters during the experiment: coronary flow, left ventricular pressure, heart rate, lactate dehydrogenase release rate and duration of arrhythmias during reperfusion.

Our results have shown that neither protocatechuic acid nor p-coumaric acid protect cardiac cells against ischemia/reperfusion injury, as effective as it was in the case of the silver fir bark extract, because they did not significantly reduce lactate dehydrogenase release rate. Protocatechuic and p-coumaric acid reduced the duration of some types of arrhythmia, but did not significantly reduce overall duration of arrhythmia, like the extract did and therefore we can assume that they only partially contribute to the antiarrhythmic activity of the extract. Protocatechuic and p-coumaric acid, as well as silver fir bark extract increased coronary flow, which shows their vasodilatory effect.

In our study we confirmed, that protocatechuic and p-coumaric acid when applied acutely, are capable of vasodilatation, but do not protect the isolated rat heart against ischemia-reperfusion injury, as efficient as it was shown for the silver fir bark extract. We came to

the conclusion, that silver fir bark extract protects isolated rat heart more efficiently, than protocatechuic or p-coumaric acid alone and they only partially contribute to the protective effects of the bark extract. Protective effects of the silver fir bark extract are most probably due to synergistic activity of more extracts compounds.

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP – adenzin trifosfat

Ca²⁺ ATP-aza – kalcijeva adenzintrifosfataza oz. kalcijeva črpalka

COX 1 – ciklooksigenaza 1

COX 2 – ciklooksigenaza 2

DNK – deoksiribonukleinska kislina

EKG – elektrokardiogram

GSH – glutation peroksidaza

H₂O₂ – vodikov peroksid

HDL – lipoprotein visoke gostote

IL-1 – interlevkin 1

I/R okvara – ishemično reperfuzijska okvara

K- H raztopina – raztopina Krebs Henseleit

LDH – laktatna dehidrogenaza

LDL – lipoprotein nizke gostote

Na⁺/ K⁺ ATP-aza – natrijeva kalijeva adenzintrifosfataza oz. natrijeva-kalijeva črpalka

NADH reagent – nikotinamid adenin dinukleotid

NAD(P)H oksidaza – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza

NO – dušikov oksid

•O₂⁻ – superoksidni radikal

•OH – hidroksilni radikal

RNS – reaktivne dušikove spojine

ROS – reaktivne kisikove spojine

SOD – superoksidna dismutaza

TNF- α – alfa faktor tumorske nekroze

TRIS puffer – trihidroksimetil aminometan

TXB₂ – tromboksan B₂

VF – ventrikularna fibrilacija

VT – ventrikularna tahikardija

1. UVOD

1.1. Zgradba in funkcije srca

Srčno-žilni sistem omogoča prenos plinov in hranilnih snovi po telesu, odstranitev metabolitov ter sodeluje v homeostatskih mehanizmih, kot je regulacija telesne temperature ter prilagajanje dotoka kisika in hranil glede na fiziološke potrebe organizma. Sistem je zgrajen iz srca, ki deluje kot črpalka, žil dovodnic in odvodnic in obsežnega sistema majhnih žil (kapilarni sistem) (1).

Srce je sestavljeno iz dveh črpalk-leve in desne. Atrija služita kot rezervoar krvi in imata zato tanjšo steno od ventriklov, ki imata v sestavi več mišičnih vlaken, da lahko iztisneta kri v pljučni oziroma sistemski obtok. (2)

Preko zgornje in spodnje vene cave priteče v desni atrij deoksigenirana venska kri, zaradi tlačne razlike med desnim atrijem in ventrikulom se odpre trikuspidalna zaklopka in kri steče v desni ventrikel. Trikuspidalna zaklopka se zapre, ko tlak ventrikla preseže tlak v atriju. Ko tlak v desnem ventriklu preseže tlak pljučne arterije se odpre pljučna zaklopka in kri steče v pljučni krvni obtok, kjer se oksigenira in se nato preko pljučne vene vrne v levi atrij. Ko tlak v levem atriju preseže tlak levega ventrikla se odpre mitralna zaklopka in tlak v ventriklu naraste, preseže tlak levega atrija in zaklopka se zapre in nato se odpre še aortna zaklopka, ko je tlak levega ventrikla višji od tlaka v aorti in srce tako iztisne kri v sistemski obtok, preko sistema arterij, arteriol in kapilar do ostalih tkiv v telesu (1).

Srčno steno sestavljajo notranji del (endokardij), srednji del (miokardij) in zunanji del (epikardij). Funkcionalna enota srca je miokardij, ki ga tvorijo enojedrne srčne mišične celice. Te so med seboj povezane s prečnimi povezavami. Meje med posameznimi celicami omogočajo hitro prevajanje impulza (3). Obstajata dva tipa srčnega akcijskega potenciala - hitri tip pri mišičnih vlaknih atrijev in ventriklov in pri prevodnih Pukinjejevih vlaknih. Počasni tip akcijskega potenciala najdemo v prevodnih vlaknih sinoatrialnega vozla (srčni ritmovnik) in atrioventrikularnega vozla (prevajanje impulza od atrija do ventrikla) (2).

Za normalno delovanje srca so potrebne optimalne koncentracije Na^+ , K^+ in Ca^{2+} . Da do depolarizacije sploh pride, potrebujemo vdor Na^+ v celico skozi hitre natrijeve kanale (faza

0). Sledi delna repolarizacija (faza 1) ko grejo iz celice K^+ ioni preko kalijevih kanalov. Sledi faza 2 (»plato«), v kateri K^+ ioni izhajajo iz celice in v celico skozi počasne kalcijeve kanale vstopajo Ca^{2+} ioni. Plato faza je značilnost akcijskega potenciala srčne mišice in je posledica aktivacije napetostno odvisnih kalcijevih kanalov. Vdor Ca^{2+} ionov je nujen za krčenje srčne mišice, ta se v nasprotju s skeletno mišico ne bo skrčila brez dotoka zunanjih Ca^{2+} ionov. Kljub temu pa je količina Ca^{2+} ionov, ki vstopijo v celico med akcijskim potencialom premajhna za interakcije med aktinom in miozinom in služijo kot povod za sproščanje Ca^{2+} iz sarkoplazemskega retikuluma, ki potem povzroči aktinsko-miozinske interakcije in s tem tudi kontrakcijo. Faza 3 ali repolarizacija- nastopi ko izhajanje kalija iz celice preseže vstopanje kalcija v celico, tu se kalcijevi kanali zaprejo in prehajajo samo še K^+ ioni in sledi faza 4 oziroma mirovni membranski potencial (1,2).

Srčna mišica je prav tako prečno-progasta mišica, vendar v nasprotju s skeletno, ni pod vplivom naše volje. Srčne mišične celice tvorijo funkcionalno enoto ali sincicij, kar jim omogoča sinhrono krčenje, ki je zelo pomembno pri aktivnosti črpanja. Kontraktilni element predstavlja sarkomera, ki je sestavljena iz debelejših miozinskih in tanjših aktinskih filamentov. Sinoatrialni vozal se nahaja v steni desnega atrija in je naravni ritmovnik ali »pacemaker« srca. Po spontani depolarizaciji se akcijski potencial razširi med celicami atrija, kar mu omogočajo presledkovni stiki med celicami in prevodna vlakna v atriju. Akcijski potencial nato potuje iz atrija v ventrikel skozi prevodni sistem med njima-atrioventrikularni vozal in nato potuje skozi ventrikel preko presledkovnih stikov med celicami in prevodni sistem v ventriklih (Hisov snop in Purkinjejeva vlakna). Akcijski potencial pri človeku potuje preko celotnega srca v 220 ms po začetku vzbujenja v sinoatrialnem vozlu (1,2).

1.2. Ishemična bolezen srca

1.2.1. Simptomi in posledice miokardne ishemije

Ishemija je stanje nezadostne prekrvavljenosti tkiva, takrat celicam začne primanjkovati kisika in hranil, kar vodi v okvaro tkiva ali organa (4). Najpogostejši vzrok za ishemično bolezen srca je ateroskleroza koronarnih žil – značilen je pojav aterosklerotičnega plaka, ki zoži svetlino koronarne arterije in zato ovira pretok krvi po njej. Ishemično dogajanje v srcu bolnik občuti kot topo, stiskajočo bolečino v predelu prsnice. Ishemija srčne mišice se pojavi, ko zožitev premera koronarne arterije doseže 70 % volumna žile ali več. Topa in

stiskajoča bolečina za prsnico nastopi ob telesni aktivnosti in popusti ob mirovanju ali ob uporabi vazodilatatorja za zdravljenje koronarne ishemije (na primer podjezična tableta gliceriltrinitrata), saj se pri tem izboljša prekrvavitev miokarda. To je *sindrom stabilne angine pectoris*. Vendar pa aterosklerotični proces lahko napreduje in kadar pride do kritičnega zoženja arterije (90 % in več) nastopi ishemija srčne mišice že med mirovanjem (*nestabilna angina pectoris*). Pri dolgotrajni, neprekinjeni bolečini, ko lahko pride do odmrtja dela srčne mišice govorimo o *miokardnem infarktu*. Pri tej obliki tudi uporaba vazodilatatorja za zdravljenje koronarne ishemije ne ublaži močnih bolečin v predelu prsnice. Kljub temu, da je značilna bolečina pomemben znak ishemične bolezni srca, so v zadnjih letih ugotovili, da se ishemija miokarda lahko pojavi tudi povsem brez bolečin (4,5,6).

1.2.2. Ishemično/ reperfuzijska poškodba

Miokard pokriva svoje energijske potrebe s presnavljanjem prostih maščobnih kislin (prevladujoča pot), glukoze in laktata. Te substrate uporabi za aerobno sintezo adenozin trifosfata (ATP). Ko je preskrba miokardnega tkiva s krvjo motena, se aerobna sinteza ATP ustavi in se nadaljuje po anaerobni poti, pri čemer nastaja mlečna kislina, ki razpade na H^+ in laktat. Pri tej, tako imenovani ishemični anoksiji, ne samo, da se laktat kot substrat ne porablja, temveč tudi nastaja. Sinteza molekul ATP je bistveno nižja, kot bi bila v normalnih pogojih, zaradi oslabljenega pretoka krvi pa se v tkivu akumulirajo H^+ ioni, oboje pa vodi v nenormalne ventrikularne kontrakcije (7). Čeprav je med ishemijo nastajanje ATP močno znižano, srčne mišične celice vseeno potrebujejo ATP za vzdrževanje osnovnih procesov, kot je ionska homeostaza, ki je glavna metabolna prioriteta srca. Ionska homeostaza temelji na energijsko odvisnih ionskih črpalkah Na^+/K^+ ATP-aza in Ca^{2+} ATP-aza. Sekundarni ionski kanali so Na^+/Ca^{2+} in Na^+/H^+ kanali. Ker se zaradi anaerobne sinteze ATP začnejo prekomerno kopičiti H^+ ioni se posledično zaradi Na^+/H^+ črpalke v notranjosti celice poviša koncentracija Na^+ ionov in za tem še Ca^{2+} ionov. Zaradi porušenega ionskega ravnovesja (povišane intracelularne koncentracije Na^+ Cl^- in Ca^{2+} in znižane intracelularne koncentracije K^+) začnejo celice nabrekati. Zaradi »energijskega stradanja« celic, kopičenja Ca^{2+} ionov in acidoze v miocitih, vse to privede do ishemičnih aritmij, kontraktilnih nepravilnosti in celične smrti (8).

Če ishemija traja dlje časa, se zaradi acidoze zavira glikoliza in nastopi ireverzibilna poškodba celic in uhajanje celičnih encimov iz celic v krvni obtok. Pri diagnosticiranju

miokardne ishemije merimo koncentracijo encimov miokardne kreatinin kinaze, aspartatne aminotransferaze in miokardne laktat dehidrogenaze (7).

1.2.3. Oksidacijski stres ob ishemično/reperfuzijski poškodbi miokarda

Preživetje srčnih mišičnih celic in s tem obnovitev funkcije delovanja miokarda sta odvisna od čimprejšnje reperfuzije, to je ponovne vzpostavitve pretoka krvi na prizadetem območju. Pomanjkanje kisika in ATP na ishemičnem območju inducira celo vrsto patoloških sprememb tako na celičnem, kot na tkivnem in organskem nivoju. Nastajanje reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin (v nadaljevanju ROS- *reactive oxygen species* in RNS- *reactive nitrogen species*) je povišano tako med ishemijo, kot med reperfuzijo, ko ponovni dotok kisika na ishemično področje generira nastanek ROS. ROS in RNS lahko spontano in samoiniciativno izzovejo številne radikalske reakcije z biomolekulami - povzročajo lipidno peroksidacijo, proteinsko oksidacijo in nitracijo ter poškodbo molekul DNK. ROS, kot so superoksidni radikal, vodikov peroksid in hidroksilni radikal, nastajajo v večjih količinah ob ishemiji in reperfuziji in presežejo zmoglosti endogenih antioksidacijskih sistemov, kot sta superoksidna dismutaza in glutation (8).

1.3. Model izoliranega podganjega srca

Najbolj točne podatke o farmakološkem in toksikološkem profilu preiskovane učinkovine dobimo, če jo testiramo *in-vivo* na človeku. Zaradi etičnih razlogov pa taka testiranja, ko še nimamo dovolj ali celo nobenih podatkov o biološki aktivnosti preiskovane učinkovine, niso možna. Zato uporabljamo *in-vitro* modele ali poskuse na živalih *in vivo*. *In vitro* metode so primerne za ugotavljanje mehanizma delovanja učinkovine, slabost teh metod pa je, da ne moremo preučiti *in vivo* biokinetike. Na primer, če učinkovina *in vivo* težko doseže tarčne celice, so le-te izpostavljene nižji koncentraciji učinkovine kot v *in vitro* poskusu; in obratno, če se preiskovana učinkovina akumulira v določenem organu ali tkivu to vodi do daljše izpostavljenosti in delovanja učinkovine na tarčne celice. Biotransformacija učinkovine je pomemben dejavnik, ki ga pri *in vitro* metodah ne moremo direktno določiti. To lahko predstavlja težavo, ko preučujemo učinkovine, katerih metaboliti imajo večjo aktivnost, oziroma v primeru ko le metabolit deluje aktivno na tarčne celice (9).

Model izoliranega podganjega srca je *in vitro* metoda, ki se je razširila v 80. letih prejšnjega stoletja za ugotavljanje učinkov različnih spojin na ventrikularno fibrilacijo, nastale zaradi inducirane ishemije. Model je uporaben v prvi fazi raziskovanja antiaritmogenih učinkov in za ugotavljanje, ali ima preiskovana učinkovina direkten učinek na srčno funkcijo. Metoda je relativno hitra in poceni (v primerjavi z *in-vivo* živalskim testiranjem) in daje obsežne informacije o možni učinkovitosti in koncentracijski odvisnosti preiskovane snovi. Vsekakor pa je na podlagi poskusov na izoliranem srcu predhodno pred kliničnim testiranjem potrebna še *in-vivo* študija na živalskem modelu (10).

1.4. Ateroskleroza

Ateroskleroza koronarnih arterij je najpogostejši vzrok za zmanjšan koronarni pretok in posledično ishemijo miokarda. Ker ateroskleroza najpogosteje prizadene prav koronarne arterije, je ishemična bolezen srca klinično kar sinonim za polno razvito aterosklerozo (11).

1.4.1. Nastanek in razvoj ateroskleroze

Prva stopnja ateroskleroze je poškodba arterijske endotelijske celice, ki jo lahko povzročijo velike strižne sile med krvjo in žilno steno, povišan arterijski krvni tlak, reaktivne kisikove in dušikove spojine, infekcije in imunske poškodbe, najpogosteje pa nastane zaradi presnovne poškodbe - hipoksija endotelijske celice, endotoksinov in trombina. Hiperholesterolemija je glavni dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze, saj se že pred nastankom značilnih morfoloških sprememb kopičijo maščobe v obliki lis v intimi arterijske stene. Poškodovane endotelijske celice niso več učinkovita pregrada med plazmo in subendotelijskim prostorom, zato se monociti na njih lažje prilepijo in vstopijo v subendotelijski del žilne stene, kjer se le-ti preobrazijo v makrofage, ki fagocitirajo nakopičene molekule lipoproteinov nizke gostote (LDL); take makrofage imenujemo *penaste celice*. V tej fazi je značilna tudi adhezija trombocitov na poškodovano plast endotelija in sproščanje trombocitnih dejavnikov, ki med drugim spodbujajo gladkomišične celice k razmnoževanju in le-te se začnejo premikati iz medije v žilno intimo, kjer prav tako fagocitirajo maščobe in v okolico izločajo vezivno tkivo (nastanek vezivnih leh) in s tem prispevajo k rasti aterosklerotične morfološke spremembe na žilni steni. Poleg kopičenja lipidov v makrofagih spremlja proces aterogeneze kronično vnetje zaradi specifične in nespecifične imunosti. Nekroza penastih celic dodatno spodbuja

razmnoževanje gladkih mišičnih celic in s tem nastajanje vezivnih vlaken in posledično vezivnih leh, ki so sestavljene iz kolagena, elastičnih vlaken in proteoglikanov. Možen je pojav zapletov na lehah, kot je ulceracija, tromboza (najnevarnejši zaplet) in kopičenje kalcijevih soli s prostimi maščobnimi kislinami, zato postane arterijska stena trda in neelastična (t.i. poapnenje žil). Če je vezivna leha še brez zapletov v velikih arterijah ni zelo nevarna. V možganskih in koronarnih arterijah pa lahko enaka poškodba nevarno ovira krvni obtok in povzroči ishemijo, ki vodi v možgansko ali srčno kap (4,5,6,7).

1.4.2. Dejavniki tveganja in preprečevanje ateroskleroze

Ateroskleroza je značilna bolezen sodobnega časa v razvitem svetu. Je kompleksna degenerativna bolezen, ki se stopnjuje s starostjo in pri kateri se brez posebnih opozorilnih znakov oži žilna svetlina in se tako ovira dotok krvi življenjsko pomembnim organom. Aterosklerozo lahko zdravimo, v zgodnjih fazah pa tudi preprečujemo. Najboljša preventiva je spodbujanje zdravega življenjskega sloga in sprememba življenjskih navad (12). Razvoj bolezni je močno odvisen od številnih dejavnikov tveganja - tako genetskih, kot dejavnikov okolja. To so: dislipidemija, arterijska hipertenzija, sladkorna bolezen, kajenje, nezdrav življenjski slog ter motnje v procesu koagulacije oziroma fibrinolize. Agresivnost ateroskleroze pa se še povečuje s kopičenjem dejavnikov tveganja (4,12).

1.5. Polifenolne spojine

S pravilno prehrano lahko preprečimo nastanek oziroma upočasnimo napredek ateroskleroze in posledično ostalih srčno-žilnih bolezni. Ena izmed možnosti so živila, bogata s polifenolnimi spojinami, za katere so v številnih raziskavah ugotovili zaščitni učinek pred srčno-žilnimi obolenji. Med polifenolne spojine uvrščamo veliko skupino spojin, ki jim je skupno to, da so sestavljene iz vsaj enega aromatskega obroča, na katerega je pripeta ena ali več hidroksilnih skupin. Ta je lahko prosta ali pa povezana v eter, ester ali glikozid. Za definicijo rastlinskih polifenolov je ta opis preveč splošen, saj bi potemtakem lahko med rastlinske polifenole uvrščali tudi nekatere druge spojine, ki vsebujejo ta strukturni element - na primer morfin (spada med alkaloide) ali pa timol in karnozol (spadata med terpene). Zato uporabljamo za kriterij biosintezno pot do aromatskega obroča (13).

Obstaja dve poti biosinteze aromatskega obroča:

- *Pot preko šikimske kisline:* preko monosaharidov do aromatskih aminokislin (fenilalanin in tirozin), sledi deaminacija do cimetine kisline in njenih številnih derivatov kot na primer benzojska kislina, acetofenoni, lignani, lignini, kumarini.
- *Pot preko acetata:* se začne z acetatom do poli- β -ketoestrov različnih dolžin do poliketidov, kateri se nato s ciklizacijo (Claisnova ali aldolna kondenzacija) pretvorijo v različne policiklične spojine, kot na primer izokumarini, orcinoli, ksantoni, kvinoni.

Polifenoli tvorijo strukturno zelo raznoliko skupino spojin tudi zato, ker pogosto pride do kombinacije obeh sinteznih poti, kot je na primer pri flavonoidih, stilbenih, pironih, ksantonih. Včasih pa se v sintezo vključi še tretji element- mevalonat in tako nastanejo derivati iz šikimske kisline in mevalonata (nekateri kinoni, furano- in piranokumarini) ali derivati iz acetata in mevalonata (kanabinoidi). V primeru rotenoidov pa v sintezi sodelujejo vsi trije prekursorji (13).

Polifenole lahko razdelimo na več podskupin, glede na to koliko fenolnih obročev vsebujejo in s katerimi strukturnimi elementi so le-ti povezani med seboj (različni viri navajajo različne razdelitve na podskupine). Na splošno so to:

- **Fenolne kisline:** te se ločijo na derivate benzojske kisline (primera: protokatehujska, galna kislina) in na derivate cimetine kisline (primeri: kumarna, kavna, ferulna kislina). Delež derivatov benzojske kisline je v rastlinah, ki jih uporabljamo za prehrano, relativno nizek (največ v jagodičevju), bolj pogosti so derivati cimetine kisline (jagodičevje, češnje, slive, kivi, radič).
- **Flavonoidi:** predstavljajo najbolj preučevano skupino polifenolnih spojin. V splošnem so to rastlinski pigmenti in rastlino ščitijo pred UV žarki. Osnovno strukturo predstavlja 2-fenil-kroman-4-on. Glede na stopnjo oksidacije centralnega piranskega obroča, ali če je ta zamenjan s furanskim in glede na število in pozicijo hidroksilnih skupin ločimo več podskupin (flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoli itd.) V terapevtske namene flavonoide uporabljamo zaradi antioksidativnih lastnosti in zaščitnih učinkov na vene in kapilare. Največ raziskav je narejeno na flavonoidih kvercetin, katehini, miricetin.

- **Stilbeni:** v rastlinah imajo vlogo fitoaleksinov - to so snovi, ki jih rastlina začne tvoriti kot obrambno snov ob mehanskih poškodbah ali pri infekcijah. V to skupino spada resveratrol, ki se nahaja v grozdju in rdečem vinu. V številnih raziskavah so dokazali antikancerogene, kardioprotektivne in antidiabetične učinke te spojine.
- **Lignani:** V rastlinah imajo obrambno vlogo - delujejo antibakterijsko in antimikotično (13,14,15).

Biosinteze aromatskega obroča so sposobne samo rastline in mikroorganizmi (obstaja nekaj izjem, na primer sinteza estrogena). Živalski organizmi morajo zato te spojine vnesti v telo s prehrano, da jih lahko uporabijo dalje za biosintezo različnih spojin (aminokislina, vitamine, pigmente, toksine) (13). Polifenoli imajo v rastlinah zaščitno vlogo- pred ultravijoličnim sevanjem, mehanskimi poškodbami in obrambo pred različnimi patogeni (15).

Prav zaradi zaščitnih učinkov v rastlinah so v zadnjih desetletjih začeli podrobneje preučevati tudi ugodne zaščitne učinke polifenolnih spojin na živalski (človeški) organizem. Uživanje živil, bogatih s polifenolnimi spojinami, se je izkazalo kot učinkovit način preprečevanja nastanka in napredovanja številnih kroničnih obolenj, kot na primer srčno-žilne bolezni, rak in sladkorna bolezen. Nekateri biološki učinki teh spojin na organizem so že znanstveno dokazani in razloženi, vendar so za popolno razumevanje potrebne še številne raziskave na tem področju. Predvsem podatki o biološki uporabnosti ter kinetiki absorpcije in eliminacije številnih spojin še niso poznani (14, 16, 17).

1.5.1. Srčno-žilni sistem in polifenolne učinkovine

Dokazano je, da je zvišan vnos polifenolnih spojin iz živil povezan z znižanjem tveganja za obolenje za srčno-žilnimi boleznimi. V številnih raziskavah so uporabili mešanico več polifenolnih spojin ali pa so uporabili rastlinske izvlečke, zato pogosto aktivna učinkovina, ki je odgovorna za učinek, ni bila poznana ali pa nastopi sinergistični učinek kombinacije več spojin. V splošnem polifenolne spojine delujejo antioksidativno in kot lovilci prostih radikalov. Fenolni obroč lahko sprejme elektron in tako tvori relativno stabilen fenoksi radikal, s katerim upočasnjuje nadaljevanje oziroma prekine verižne oksidacijske reakcije v celici. Tako se na primer zniža oksidacija LDL. Prav tako pa uravnavajo sintezo dušikovega oksida v žilnem endoteliju in sodelujejo v vnetnih mehanizmih in mehanizmih, ki vodijo do apoptoze žilnih endotelialnih celic. Vse to zavira napredovanje endotelne

disfunkcije, ki je eden izmed glavnih razlogov za nastanek številnih srčno žilnih obolenj, kot na primer hipertenzije in ateroskleroze (5, 18, 19).

1.5.2. Vloga endotelija in vpliv polifenolnih spojin nanj

Žilni endotelij ima pomembno vlogo pri uravnavanju žilnega tonusa in žilne homeostaze. Sodeluje v mehanizmih vazokonstrikcije/ vazodilatacije, v mehanizmu koagulacije / antitrombotičnih učinkih, ter pri mehanizmih celične proliferacije in apoptoze. Žilni endotelij je selektivna prepustna bariera, skozi katero prehajajo številne molekule preko različnih transportnih mehanizmov iz krvi v tkiva in obratno (1, 2).

Polifenolni spojini katehin in kvercetin sta lovilca ROS, ki lahko poškodujejo lipide, proteine in DNA. Fenolni obroč sprejme elektron od ROS, kar naredi te spojine manj reaktivne. Nekateri polifenoli, kot na primer kvercetin, lahko kelirajo železove ione, ki so udeleženi pri nastanku prostih radikalov (18, 20).

Polifenolne spojine zmanjšajo občutljivost lipidov na oksidacijo. Resveratrol, ki je polifenolna spojina prisotna v rdečem vinu, ščiti endotelne celice pred citotoksičnimi učinki oksidirane LDL (21). Raziskave na živalskih modelih kažejo, da polifenolne spojine prisotne v rdečem vinu inducirajo od endotelija odvisno relaksacijo žilne stene, zaradi stimuliranja sinteze NO in tako ugodno vplivajo na povišan krvni tlak (14, 17).

Ugotovili so tudi obratno sorazmerje med vnosom flavonoidov iz zelenega čaja in incidenco miokardnega infarkta. Zmerno uživanje rdečega vina zaradi vsebnosti polifenolov v njem zmanjša zaplete po srčni ishemiji. Polifenoli v rdečem vinu, kot so flavon, resveratrol in kvercetin zmanjšajo kontraktilne disfunkcije srca in ščitijo srčne celice pred poškodbami, ki nastanejo zaradi ishemije. Ti učinki so vidni tako po peroralnem vnosu teh spojin, kot tudi po perfuziji izoliranega srca pred indukcijo ishemije (16, 17, 18).

1.6. Izvleček lubja jelke

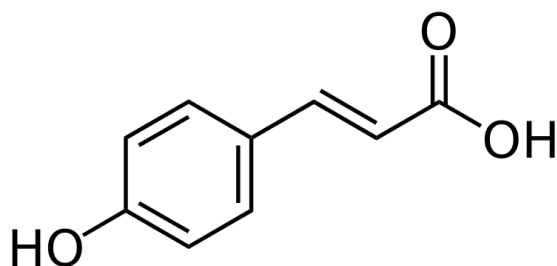
Največ raziskav o bioloških učinkih in načinu delovanja na človeški organizem je bilo narejenih z izvlečkom lubja francoskega obmorskega bora (*Pinus maritima*), katerega tržno ime je Pycnogenol®. Izvleček vsebuje številne polifenolne spojine, kot so katehin, epikatehin, taksifolin, fenolne kisline ter flavonoide. Dokazali so številne ugodne učinke in

izboljšanje stanj pri srčno-žilnih obolenjih, diabetesu in kroničnih vnetnih boleznih. Učinke pripisujejo predvsem močnemu antioksidativnemu delovanju izvlečka (22, 23).

Izveček lubja jelke ima podobno sestavo kot izveček lubja francoskega obmorskega bora. Na tržišču se nahaja pod imenom Abigenol®. V nedavni raziskavi so identificirali 13 spojin, ki sestavljajo izveček lubja jelke. Od tega je bilo 6 fenolnih kislin (galna, homovanilna, protokatehujska, p-hidroksibenzojska, vanilna in p-kumarna kislina) 3 flavonoidi (katehin, epikatehin in katehin tetrametil eter) ter 4 spojine, ki jih uvrščamo v skupino lignanov. In vitro test je pokazal celo boljše antioksidativno delovanje izvlečka lubja jelke, kot izvlečka lubja obmorskega bora (24).

1.7. Para-kumarna kislina

Para-kumarna kislina je fenolna kislina, ki je hidroksilni derivat cimetne kisline. Obstajajo tri izomere kumarne kisline, *orto*-, *meta*- in *para*-kumarna kislina, ki se med seboj razlikujejo po položaju hidroksilne substituyente na fenilnem obroču. V naravi je najbolj prisotna *p*-kumarna kislina. V večjih količinah jo najdemo v žitih, kot so oves in pšenica, v koruzi, ter sadju in zelenjavi, kot so jabolka, jagodičevje, grozdje, pomaranče, paradižnik, krompir, špinača, česen, fižol in v arašidih ter v vinu in čaju. V zadnjem desetletju je bilo narejenih precej znanstvenih raziskav, ki dokazujejo ugodne učinke *p*-kumarne kisline. Dokazali so, da učinkovito ščiti pred različnimi patološkimi stanji, kot so ateroskleroza, oksidativna poškodba srca, karcinogeneza, ter da ima antimikrobne, antiagregatorne in antiinflamatorne učinke (25, 26).



Slika 1: Strukturna formula para-kumarne kisline.

Zaščitni učinki na srce: V študiji so ugotovili preventivni učinek p-kumarne kisline na lizosomsko disfunkcijo v srčnih mišičnih celicah in zmanjšan obseg poškodb zaradi miokardnega infarkta. Podganam so 7 dni oralno po cevki dajali p-kumarno kislino

(8mg/kg telesne mase) in nato 8. dan inducirali miokardni infarkt. Podgane, ki so prejemale p-kumarno kislino so imele značilno nižje produkte lizosomske lipidne peroksidacije in nižjo aktivnost lizosomskih encimov kot kontrolna skupina. Lizosomi so citoplazemski organeli, ki vsebujejo hidrolitične encime, ki lahko razgrajujejo celične komponente. Stabilnost in celovitost lizosomske membrane je ključnega pomena pri ohranjanju normalnih vrednosti lizosomskih encimov v tkivih in telesnih tekočinah. Sproščanje lizosomskih encimov v notranjosti celice lahko povzroči spremembe na celičnem nivoju, ki vodijo od reverzibilne miokardne ishemije v ireverzibilni miokardni infarkt. Ob pojavu miokardne ishemije, ko je oskrba srčnih mišičnih celic s kisikom nizka, pride do poškodbe srčnih mišičnih celic, celična membrana teh celic postane permeabilna, kar pripelje do izplavljanja različnih snovi (tudi diagnostičnih markerjev) iz celic v krvni obtok. p-Kumarna kislina deluje kot lovilce prostih radikalov, ki ob ishemiji nastajajo v večjih količinah in na ta način stabilizira celične membrane. To prepreči uhajanje snovi iz srčnih mišičnih celic in jih na tak način ščiti pred ishemičnimi poškodbami (25).

Zaščitni učinki p-kumarne kisline na srce so se pokazali tudi pri študiji z doksorubicinom, ki je antibiotik antraciklinskega tipa, ki se uporablja v kemoterapiji raka. Njegova uporaba je omejena zaradi visoke kardiotoksičnosti, saj inducira oksidativni stres v srčnih mišičnih celicah. Dolgotrajna terapija povzroča hude ireverzibilne poškodbe miokarda, ki lahko vodijo v smrt. V skupini živali, ki je prejemala p-kumarno kislino (5 dni, 100mg/kg na dan) se je značilno znižala oksidativna poškodba srca, ki je nastala zaradi odmerka doksorubicina (27).

Antioksidativni učinek pri oksidaciji LDL: Oksidacija LDL je znan dejavnik tveganja pri patogenezi ateroskleroze. Holesterol je v plazmi vezan na lipoproteine, ki ga dostavijo v periferna tkiva, kjer regulira *de novo* sintezo holesterola. Vsaka LDL enota prenaša približno 1500 molekul holesterola, ki so zaestrene s poli-nenasičenimi maščobnimi kislinami. To hidrofobno jedro pa obdaja plast fosfolipidov in nezaestrenega holesterola. Če LDL skelet razpade, se poveša plazemska vrednost holesterola. Hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$) lahko odvzame vodikov atom nenasičenim maščobnim kislinam in s tem povzroči lipidno peroksidacijo in začetek verižnih radikalskih reakcij, ki močno poškodujejo biološke molekule, kot so DNA, celične membrane in lipoproteini. Zato uničenje oziroma lovljenje prostih radikalov, kot je $\bullet\text{OH}$ izdatno pripomore k preprečevanju lipidne peroksidacije in posledično znižanju serumske vrednosti holesterola. S študijo so dokazali,

da *p*-kumarna kislina deluje kot zelo učinkovit antioksidant za hidroksilni radikal (za eno stopnjo bolj učinkovit kot askorbinska kislina in glutation) ter tako ščiti LDL pred oksidacijo in posledično zniža serumsko vrednost holesterola. V nasprotju pa se vrednosti HDL niso značilno spremenile (28).

Antiagregatorni učinek: V študiji so dokazali značilno znižanje agregacije trombocitov po dvotedenski terapiji s *p*-kumarno kislino v odmerkih, ki so podobni, kot če dnevno uživamo hrano, bogato s polifenolnimi spojinami. Znižana agregacija trombocitov je povezana z zmanjšano sintezo tromboksana B₂ (TXB₂), ker *p*-kumarna kislina zavira encima ciklooksigenaza 1 in 2 (COX-1 in COX-2). Ti rezultati kažejo na smiselno uživanje hrane bogate s *p*-kumarno kislino kot primarno preventivo za nastanek vaskularnih bolezni, ki so posledica zvečane agregacije trombocitov (29).

Imunomodulatorni in protivnetni učinki: Dokazali so, da *p*-kumarna kislina omili avtoimunski odgovor pri revmatoidnem artritisu, saj zniža izražanje proinflammatoryh citokinov, kot sta α -faktor tumorske nekroze (TNF- α) in interleukin-1 (IL-1). Ti citokini igrajo ključno vlogo v patogenezi revmatoidnega artritisa, saj jih najdemo v višjih koncentracijah v sklepnem tkivu, sklepnih tekočinah in serumu pri teh bolnikih. V študiji so dokazali značilno znižanje izražanja TNF- α pri podganah tretiranih s *p*-kumarno kislino (4dni, intraperitonealno 100mg/kg telesne mase) v primerjavi s kontrolno skupino živali, kar kaže na protivnetni učinek spojine. Pri zdravih živalih, brez avtoimunske bolezni, kot je revmatoidni artritis, pa so ugotovili povišane nivoje serumskih imunoglobulinov po dodatku *p*-kumarne kisline, kar kaže na imunostimulativni učinek *p*-kumarne kisline (26).

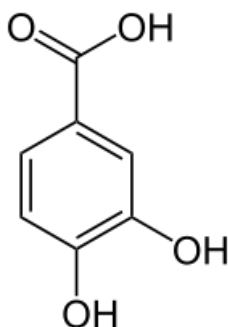
Druga študija je prav tako dokazala izboljšanje stanja pri revmatoidnem artritisu, zaradi močnega antioksidativnega delovanja *p*-kumarne kisline. Obstaja namreč močna povezava med poškodbo hrustanca zaradi ROS. Zaradi izpostavitve superoksidnemu radikalnemu ($\bullet\text{O}_2^-$) in vodikovemu peroksidu (H_2O_2) pride do razpada hialuronske kisline, kolagena in ostalih komponent v hrustancu. Pri živalih, tretiranih s *p*-kumarno kislino (8 dni, 100 mg/kg telesne mase), so opazili značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino, saj se je zmanjšala erozija in poškodba kosti, ki nastane zaradi ROS (30).

Nevroprotektivni učinki: Oksidativni stres, na katerega deluje *p*-kumarna kislina, je vpleten tudi v patogenezo Parkinsonove bolezni - povišane koncentracije produktov lipidne peroksidacije in oksidacije DNA ter redoks aktivnih transportnih kovinskih ionov, kot je

železo v črni substanci (substancia nigra) v možganih. V in-vitro študiji so dokazali, da je p-kumarna kislina uporabljena v koncentracijah, podobnih normalnim fiziološkim pogojem po uživanju hrane bogate s polifenolnimi spojinami, izkazala večje neuroprotektivne učinke, kot že znani flavonoidi s takimi učinki (npr. (+)-katehin, (-)-epikatehin in kvercetin) (31).

1.8. Protokatehujska kislina

Protokatehujska ali 3,4-dihidroksi benzojska kislina je fenolna kislina. Je eden izmed glavnih metabolitov številnih antioksidativnih polifenolov iz zelenega čaja. Deluje antioksidativno in protivnetno. V večjih količinah jo najdemo v olivah, hibiskusu in belem vinu (32).



Slika 2: Strukturna formula protokatehujske kisline.

Metabolizem protokatehujske kisline v srcu: V študiji so ugotavljali metabolizem protokatehujske kisline v srčnih mišičnih celicah in dokazali njeno učinkovitost v ishemičnem srcu. Protokatehujska kislina se najprej metilira na hidroksilni skupini na benzenovem obroču v vanilinsko kislino, kar poteka v citosolu in mikrosomih v srčnih mišičnih celicah. Nastali metabolit difundira v mitohondrije, kjer nastane vanilil -CoA tioester- ta postopek je podoben lipidni peroksidaciji. Del tega metabolita pa je v mitohondrijih podvržen še konjugaciji z glicinom. Metabolizem protokatehujske kisline v srčnih mišičnih celicah je v tesni povezavi z zaviranjem lipidne peroksidacije. Znižanje lipidne peroksidacije je koristno za ishemično srce, ker začnejo celice kot energijski substrat namesto maščobnih kislin porabljati glukozo, kar učinkovito poveča porabo kisika za sintezo ATP (33).

Antioksidativni učinek pri oksidaciji lipoproteinov visoke gostote: V študiji so ugotavljali zaščitne učinke rastline *Eucommia*, katere listi se uporabljajo za pripravo čajev v tradicionalni kitajski medicini, ker znižujejo arterijski krvni tlak in koncentracijo serumskih lipidov. Glavna sestavina listov te rastline, ki deluje antioksidativno, je prav protokatehujska kislina. Dokazali so značilno znižanje oksidacije LDL *in vitro* (34).

Neuroprotektivni učinek: V študiji so dokazali antioksidativne učinke protokatehujske kisline *in vitro* in *in vivo*. Ker ROS igrajo pomembno vlogo v patofiziologiji nevrodegenerativnih bolezni, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, so preučevali ugodne učinke protokatehujske kisline zaradi njenih antioksidativnih lastnosti. Starim podganam so 7 dni injicirali raztopino protokatehujske kisline (5mg/kg telesne mase). Ugotovili so, da protokatehujska kislina v možganih spodbuja delovanje endogenih antioksidativnih encimskih sistemov superoksidna dismutaza (SOD) in glutation peroksidaza (GSH) in zato posledično ugotovili nižje vrednosti produktov lipidne peroksidacije pri teh testiranih živalih (35).

2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen našega dela je ugotoviti direkten vpliv protokatehujske kisline in para-kumarne kisline na nastanek srčnih okvar, nastalih zaradi poškodb, povzročenih z akutno ishemijo/reperfuzijo (I/R) na izoliranih podganjih srcih. Izolirali bomo srca podgan, jih namestili na napravo za izolirano srce in jih perfundirali z oksigenirano raztopino Krebs-Henseleit z dodatkom para-kumarne kisline in protokatehujske kisline, vsake v koncentraciji 1 $\mu\text{mol/l}$. Srca bomo potem izpostavili splošni ishemiji in nato ocenjevali stopnje okvare srca v reperfuziji. Ugotoviti želimo, ali akutna aplikacija raztopine protokatehujske kisline in para-kumarne kisline zmanjša incidenco srčnih aritmij in izboljša postishemično srčno funkcijo. Učinke teh dveh spojin bomo primerjali z učinki izvlečka lubja navadne jelke, ki je že pokazal zaščitne učinke pred ishemično/reperfuzijskimi okvarami izoliranega podganjega srca. Spremljali bomo spremljivke, ki odražajo delovanje in morebitne okvare srčne mišice: moč kontrakcij levega prekata, koronarni pretok, frekvenco srčnih utripov, hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH) in pojavnost in trajanje aritmij.

Delovne hipoteze:

- akutna aplikacija raztopine protokatehujske kisline in para-kumarne kisline značilno zmanjša ishemično- reperfuzijsko poškodbo srca v primerjavi z netretirano (kontrolno) skupino (dobimo nižje vrednosti LDH).
- akutna aplikacija raztopine protokatehujske kisline in para-kumarne kisline deluje na srce antiaritmično.
- akutna aplikacija raztopine protokatehujske kisline in para-kumarne kisline poviša koronarni pretok v primerjavi s kontrolno skupino in skupino z izvlečkom lubja jelke.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Poskusne živali

Za izvedbo poskusov smo uporabili podgane tipa Wistar, moškega spola, stare od 6-8 mesecev (izvor živali je Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih številka: 34401-14/2011/12 je izdalo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava Republike Slovenije). Poskusne živali so tehtale od 270 do 330g. Živali so bivale pri konstantnih klimatskih pogojih- temperatura okolja med 23 in 25 °C, dnevno - nočna osvetlitev se je menjala na 12 ur. Na voljo so imele poljubno količino vode, hranjene so bile s standardno prehrano za podgane v obliki briketov Altromin 1324 (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Nemčija).

3.2. Reagenti in raztopine pri poskusih na izoliranih podganjih srcih

- **Raztopina Krebs- Henseleit**

Izolirana podganja srca smo perfundirali s fiziološko raztopino Krebs-Henseleit (K-H) naslednje sestave:

- 118,6 mmol/L NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 4,7 mmol/L KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 11,1 mmol/L glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 25 mmol/L NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 1,66 mmol/L MgSO₄ (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 1,2 mmol/L NaH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 2,52 mmol/L CaCl₂ (Kemika, Zagreb, Hrvaška).

- **Raztopina protokatehujske kisline**

V pripravljeno raztopino K-H smo dodali preračunano količino protokatehujske kisline, da smo dobili končno raztopino s koncentracijo 1 μmol/L.

Protokatehujska kislina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija. M= 154,1 g/mol)

- **Raztopina p-kumarne kisline**

V pripravljeno raztopino K-H smo dodali preračunano količino p-kumarne kisline, da smo dobili končno raztopino s koncentracijo 1 $\mu\text{mol/L}$.

p-kumarna kislina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija. M= 164,2 g/mol)

- **Uretan**

Uretan ali etil karbamat je anestetik, ki pa se zaradi potencialne kancerogenosti ne uporablja več v humani medicini. Za anestezijo živali smo uporabili 20% raztopino uretana. Odmerek je bil 0,7 ml raztopine na 100g telesne teže živali.

- **Heparin** (Krka d.d., Novo mesto, Slovenija)

Heparin je glikozaminoglikan, antitrombotična učinkovina, ki se veže na antitrombin III, ga aktivira, ta pa se potem veže na koagulacijske faktorje II, XII, XI, IX, X, jih inaktivira in prepreči pretvorbo protrombina v trombin. Živalim smo ga vbrizgali 0,3 ml (cca. 1500 i.e.) intraperitonealno pred izolacijo srca. Ena viala vsebuje 5 ml raztopine za injiciranje, kar ustreza 25000 i.e. natrijevega heparinata.

- **LDH reagent**

LDH reagent je sestavljen iz piruvata (9,7 mmol/L) in NADH (0,24 mmol/L) raztopljenih v TRIS pufri. Piruvat (Boehringer Mannheim, Nemčija) je spojina z dvojno ogljikovo vezjo, ki jo cepi encim LDH. Na podlagi te encimske reakcije lahko določimo količino v efluentu prisotne LDH. NADH (Roche, Švica) je donor H^+ , ki se vežejo na prosto vez po razcepu dvojne ogljikove vezi v piruvatu. Zato smo ga uporabili pri določanju LDH.

- **Karbogen** (Messer, Slovenija)

To je plinska mešanica 95% O_2 in 5% CO_2 , ki smo jo uporabili za preprihanje K-H raztopine v kivetah.

3.3. Pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na izoliranih podganjih srcih

- Škarje različnih velikosti

- Mala in velika pinceta
- Kirurška prijemalka
- Sukanec
- Kanila
- Čaše, bučke in epruvete
- Parafilm
- Polavtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska)
- Aparatura po Langendorff-u (Laboratorij za eksperimentalno srčno- žilno farmakologijo, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Ljubljana)
- Srebrove elektrode (Ag/AgCl) s predojačevalnikom za merjenje EKG, 100x predojačitev signala (Dewetron, Slovenija)
- Napetostni ojačevalniki DAQP-V (Dewetron, Avstrija)
- Termostat LAUDA E 100 z grelcem in črpalko LAUDA ecoline 003 (Lauda dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Nemčija)
- Tlačna kateterska sonda MILLAR Micro-tip SPR-524 (Millar Instruments, Inc., ZDA)
- Kontrolna enota tlačne sonde MILLAR PCU 2000 (Millar Instruments, Inc., ZDA)
- Analogno digitalni (AD) pretvornik PCI-6013, 200 K-Hz, 16 bit (National Instruments, ZDA)
- Osebni računalnik
- Spektrofotometer (Eon- One Chemistry analyser, Vital diagnostics, Italija)
- Dewesoft 6.1b14 Prof (Dewetron, Slovenija)
- GraphPad Prism version 6.00 za Windows (GraphPad Software, ZDA) za statistično in grafično obdelavo podatkov

3.4. Izolacija podganjih src po Langendorffu

Živalim smo v trebušno votlino najprej vbrizgali 20 % raztopino uretana (0,7 ml/100g telesne teže živali) in nato proti strjevanju krvi še heparin, in sicer 1500 i.e. heparina v 0,3 ml. Anestezirani živali smo nato odprli prsni koš, v aorto vstavili kanilo, napolnjeno z raztopino K-H, odstranili srce in ga namestili na aparaturu po Langendorffu. Med postopkom smo srce hladili z mrzlo raztopino K-H, da smo umirili moč kontrakcij. V srce

smo nato skozi levi atrij v levi ventrikel vstavili Millarjevo tlačno sondo, s katero smo merili moč kontrakcij levega ventrikla. Na srce smo v smeri električne osi srca namestili tudi dve srebrovi elektrodi, s katerima smo merili EKG. Tekom poskusov smo obe raztopini s termostatom vzdrževali na temperaturi 38 °C. Srce smo pred zunanjimi vplivi zaščitili z ogrevanim steklenim plaščem, vmesni prostor med srcem in aparaturo pa smo še dodatno ovili s parafilmom, da smo onemogočili pretok zraka in posledično hlajenje src.

3.4.1. Potek poskusov na izoliranem podganjem srcu

Po namestitvi srca na aparaturo po Langendorffu smo le-to takoj perfundirali z termostatirano in oksigenirano raztopino K-H. Po namestitvi tlačne sonde in elektrod smo začeli s 120 minutnim poskusom. Najprej smo srce 10 minut perfundirali z raztopino K-H, v katero smo dovajali plinsko mešanico 95 % kisika in 5 % ogljikovega dioksida. Nato smo 20 minut srce perfundirali z raztopino K-H, ki je vsebovala 1 $\mu\text{mol/L}$ protokatehujske kisline oz. 1 $\mu\text{mol/L}$ p-kumarne kisline. Tudi te raztopine so bile oksigenirane s plinsko mešanico kisika in ogljikovega dioksida. Sledila je 40 minutna globalna ishemija, tako da smo popolnoma prekinili dotok perfuzijske raztopine. Nato smo 50 minut srce ponovno perfundirali z raztopino K-H v kateri je bil raztopljen protokatehujska kislina (1 $\mu\text{mol/L}$), v drugem primeru pa p-kumarna kislina (1 $\mu\text{mol/L}$).

3.4.2. Merjene spremenljivke

Tekom poskusa (razen v času 40 minutne ishemije) smo merili naslednje spremenljivke: koronarni pretok, moč kontrakcij levega ventrikla, hitrost sproščanja LDH, iz elektrokardiograma smo izračunali tudi frekvenco srčnih utripov ter odčitali in sešteli čas trajanja štirih vrst aritmij (asistolije, ventrikularne tahikardije, ventrikularne fibrilacije in ventrikularni prezgodnji utripi oz. ekstrasistole)

- Koronarni pretok

Srce smo perfundirali z raztopino K-H skozi kanilo, ki smo jo vstavili v aorto. Njen spodnji del je segal nad semilunarne zaklopke. Vhodi v koronarne žile se nahajajo nad temi zaklopkami, zato smo srce perfundirali skozi koronarne žile. Perfuzijska tekočina je tekla preko leve in desne koronarne arterije, ki imata vhoda na ustju aorte, v desni atrij in nato jo je srce iztisnilo skozi prerezane žile. Efluent smo lovili v umerjeno epruveto v vnaprej določenih časovnih intervalih in tako merili koronarni pretok (ml/min).

- Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)

Iz efluenta, ki smo ga vzeli v točno določenem časovnem zaporedju smo odpipetirali 33 μL in temu dodali 1 mL LDH reagenta. Nato smo epruveto s to zmesjo pol minute ročno mešali, jo prenesli v kiveto in s spektrofotometrom pri valovni dolžini 340 nm merili porabo NADH. Na ta način posredno določamo aktivnost encima LDH v vzorcu. Hitrost sproščanja smo izrazili v $\mu\text{kat g}^{-1}\text{min}^{-1}$.

- Moč kontrakcij levega ventrikla

Tlak oziroma moč kontrakcij levega ventrikla smo merili z Millarjevo tlačno katetersko sondo, ki smo jo uvedli skozi levi atrij in mitralno zaklopko v levi ventrikel. Sonda je bila priklopljena na ojačevalnik preko Millarjeve kontrolne enote. Spremembo tlaka smo vzorčili s tlačno katetersko sondo MILLAR Micro-tip SPR-524 s frekvenco 500 Hz. Ojačane signale smo preko analogno–digitalnega pretvornika ves čas poskusa shranjevali na računalniški trdi disk preko programske opreme Dewesoft. Spremembo tlaka pri kontrakciji levega ventrikla smo izrazili v mm živega srebra (mmHg).

- Frekvenca srčnih utripov

Število utripov na minuto oziroma frekvenco smo odčitali iz elektrokardiograma v enakih časovnih intervalih, kot smo lovili efluent za merjenje LDH in koronarnega pretoka. Če so bile na tisti časovni točki prisotne aritmije, frekvence nismo mogli odčitati.

- Elektrokardiogram (EKG)

EKG smo snemali s srebrovimi (Ag/AgCl) elektrodami, ki so bile nameščene na srce. Signal smo predhodno 100x ojačali s predojačevalnikom (Dewetron, Slovenija) in nato s pomočjo ojačevalnika DAQP-V (Dewetron, Avstrija) in analogno-digitalnega pretvornika podatke shranjevali na trdi disk računalnika. Iz elektrokardiograma smo odčitali frekvenco utripov srca (število utripov na minuto) in 4 vrste aritmij.

Aritmije smo odčitavali tekom celotnega poskusa. Aritmija je vsaka sprememba srčnega ritma od normalnega sinusnega ritma. Trajanje posamezne vrste aritmije smo izrazili v sekundah (s).

Asistolija: je odsotnost električne aktivnosti srca, srčna frekvenca je nič, na elektrokardiogramu vidimo raven signal.

Ventrikularna fibrilacija: je signal, pri katerem ne moremo ločiti posameznih QRS kompleksov, zato tudi ne moremo določiti frekvence.

Ventrikularna tahikardija: je nenormalno hiter ritem srca s širokimi QRS kompleksi. Pri človeškem srcu je to več kot 150 utripov/min, pri podganjem srcu pa je ventrikularna tahikardija definirana pri 500-600 utripov/min.

Ventrikularni prezgodnji utripi ali ekstrasistole: so prezgodnje kontrakcije ventrikla, ki jih prepoznamo po prezgodnjih QRS kompleksih, glede na P val.

3.5 Obdelava podatkov

Z računalniškim programom GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, ZDA) smo dobljene podatke statistično in grafično obdelali. Dobljene rezultate pri posamezni skupini smo povprečili ter jih izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM). Izračunali smo tudi površine pod 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 značilno razliko predstavljala vrednost $p < 0,05$.

4. REZULTATI

Poskuse na izoliranem podganjem srcu smo izvajali v dveh skupinah, s protokatehujsko in p-kumarno kislino, v vsaki je bilo po pet živali. Koncentracija obeh kislin je bila $1\ \mu\text{mol/L}$, kar ustreza masni koncentraciji $154\ \mu\text{g/L}$ protokatehujske kisline in $164\ \mu\text{g/L}$ p-kumarne kisline. Kontrolni poskusi (poskusi brez dodane katerekoli farmakološko aktivne učinkovine) in poskusi z izvlečkom lubja jelke z masno koncentracijo $10\ \mu\text{g/L}$ so bili narejeni v predhodno izdelanem diplomskem delu (36), zato smo rezultate primerjali z našimi poskusi, saj iz etičnih razlogov poskusov nismo ponovno izvajali. Potek poskusov je bil enak pri obeh raziskavah, zato so rezultati primerljivi.

Posamezen poskus je trajal 120 minut. Do 20. minute smo v vseh skupinah izolirana srca perfundirali z oksigenirano raztopino K-H. Po 20 minutah smo pri poskusih s protokatehujsko, p-kumarno kislino in z izvlečkom lubja jelke za 10 minut srca perfundirali z oksigenirano raztopino K-H, ki je vsebovala protokatehujsko, p-kumarno kislino oziroma izvleček lubja jelke. V kontrolnih poskusih pa so bila srca vseh 30 minut perfundirana samo z oksigenirano raztopino K-H.

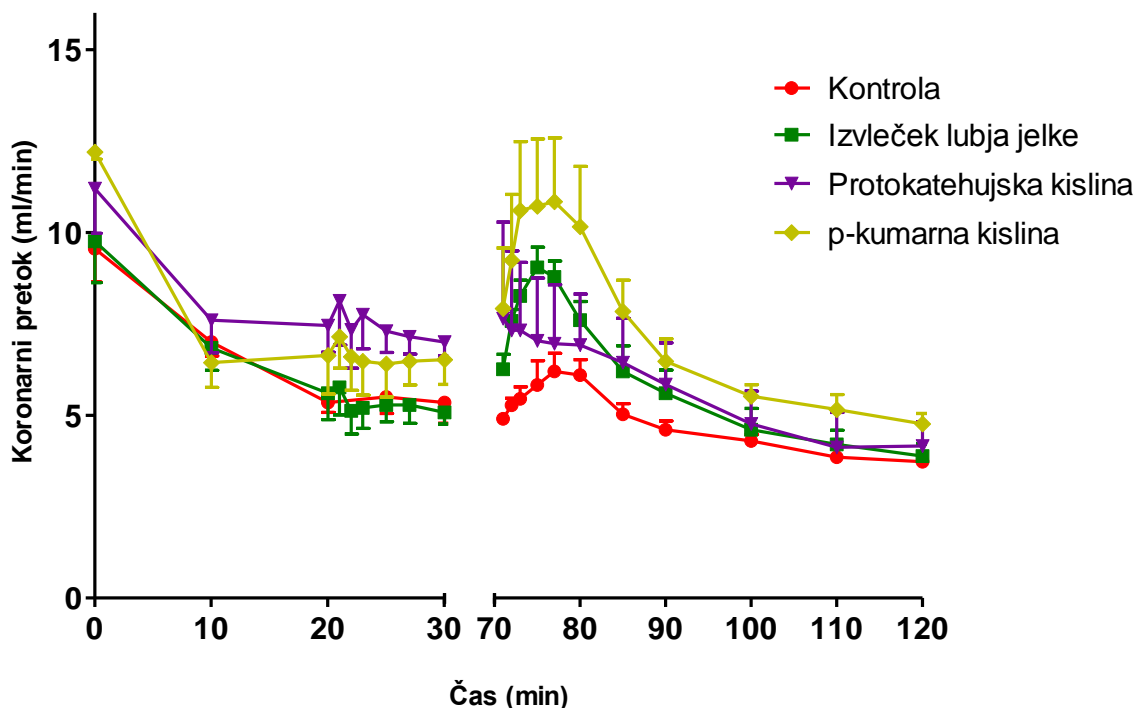
Nato smo v vseh skupinah vzpostavili 40 minutno ishemijo- prekinili smo pretok raztopine skozi srce. Po 40-minutni ishemiji smo ponovno vzpostavili pretok, z enako raztopino kot tik pred ishemijo in nadaljnjih 50 minut, od 70.- 120. minute merili spremenljivke.

4.1. Koronarni pretok

Koronarni pretok je bil od začetka poskusov s protokatehujsko in p-kumarno kislino povišan, vendar je do pričetka ishemije upadal pri vseh štirih skupinah poskusov. V reperfuziji se je pretok naglo povišal, dosegel vrh v 75. -77. minuti, nato pa začel upadati in se od 100. minute dalje v vseh štirih skupinah ustalil na približno enako vrednost. V skupini s protokatehujsko kislino ni prišlo do naglega povišanja koronarnega pretoka v začetku reperfuzije, ampak je bila vrednost podobna kot tik pred nastopom ishemije in je nato do konca poskusa postopoma upadala.

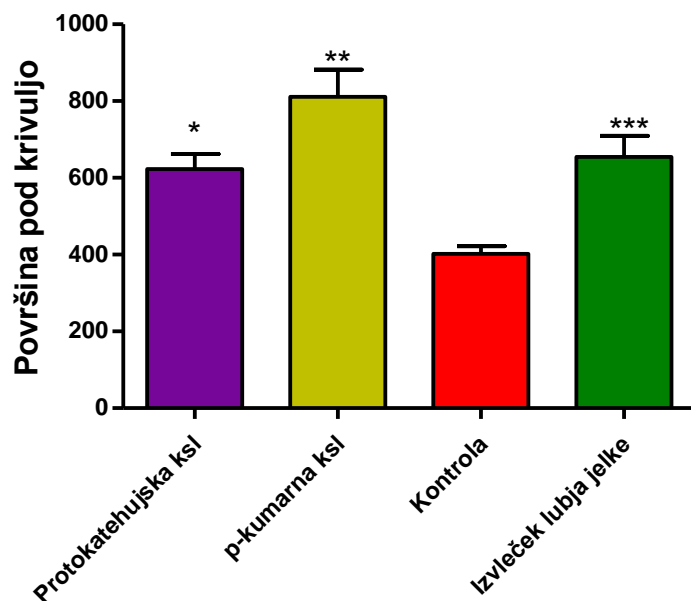
Primerjava površin pod krivuljo nam pokaže, da je bil koronarni pretok pri skupinah s protokatehujsko in p-kumarno kislino in izvlečkom lubja jelke značilno povišan v

primerjavi s kontrolno skupino z razliko $p < 0,05$. Ni pa bilo značilnih razlik med temi tremi skupinami.



Slika 3: Koronarni pretok izoliranih podganjih src. Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posamezni skupini. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.

Prvih 20 minut so bila srca perfundirana z raztopino K-H in nato 10 minut z dodatkom preiskovane snovi. Sledila je 40 minutna ishemija in od 70. minute dalje reperfuzija z enako raztopino kot pred nastopom ishemije.



Slika 4: Površina pod krivuljo koronarnega pretoka izoliranih podganjih src.

* - značilne razlike ($p < 0,05$) v skupini s protokatehujsko kislino glede na kontrolno skupino

** - značilne razlike ($p < 0,01$) v skupini s p-kumarno kislino glede na kontrolno skupino

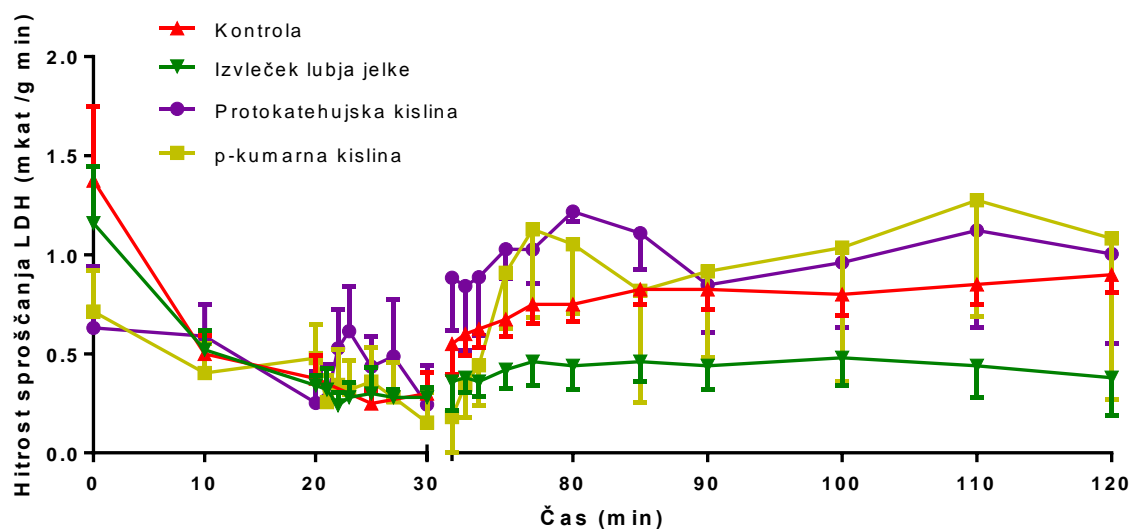
*** - značilne razlike ($p < 0,05$) v skupini z izvlečkom lubja jelke glede na kontrolno skupino

4.2. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)

Hitrost sproščanja LDH je bila v vseh skupinah najvišja na začetku poskusa, nato je do začetka ishemije v vseh skupinah upadla na približno enako vrednost. Na začetku reperfuzije je v vseh skupinah hitrost sproščanja LDH naraščala, nato pa se je v skupini z izvlečkom lubja jelke in v kontrolni skupini v 77. minuti hitrost ustalila in se do konca poskusov ni spreminjala. V skupinah s protokatehujsko in p-kumarno kislino je na začetku reperfuzije hitrost narasla in do konca poskusov so vrednosti nihale in bile ves čas višje kot v kontrolni skupini.

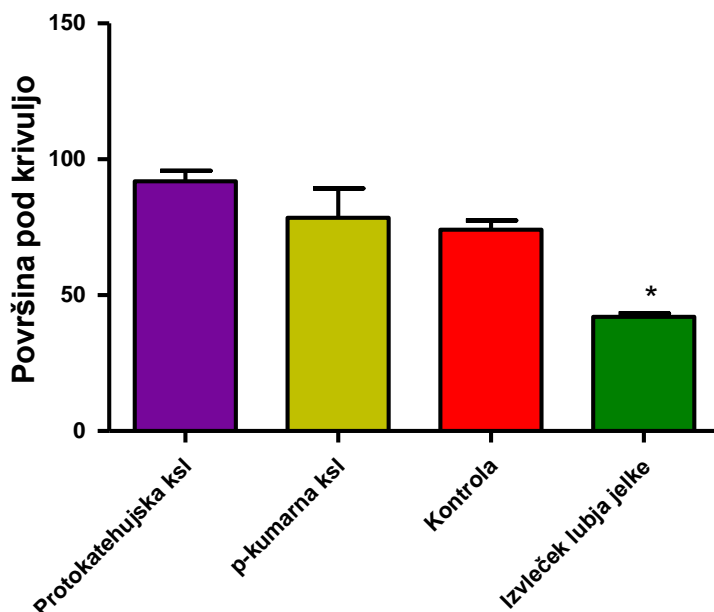
Primerjava površin pod krivuljo nam pokaže, da je skupina s protokatehujsko kislino imela celo nekoliko višjo hitrost sproščanja LDH kot kontrolna skupina, vendar razlike niso

statistično značilne. Hitrost sproščanja LDH se značilno ($p < 0,05$) zniža pri skupini z izvlečkom lubja jelke, kjer so značilno nižje razlike tudi v primerjavi s skupino z dodano protokatehujsko kislino.



Slika 5: Hitrost sproščanja LDH iz izoliranih podganjih src pri poskusih s 40 minutno ishemijo. Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posamezni skupini. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.

Prvih 20 minut so bila srca perfundirana z raztopino K-H in nato 10 minut z dodatkom preiskovane snovi. Sledila je 40 minutna ishemija in od 70. minute dalje reperfuzija z enako raztopino kot pred nastopom ishemije.



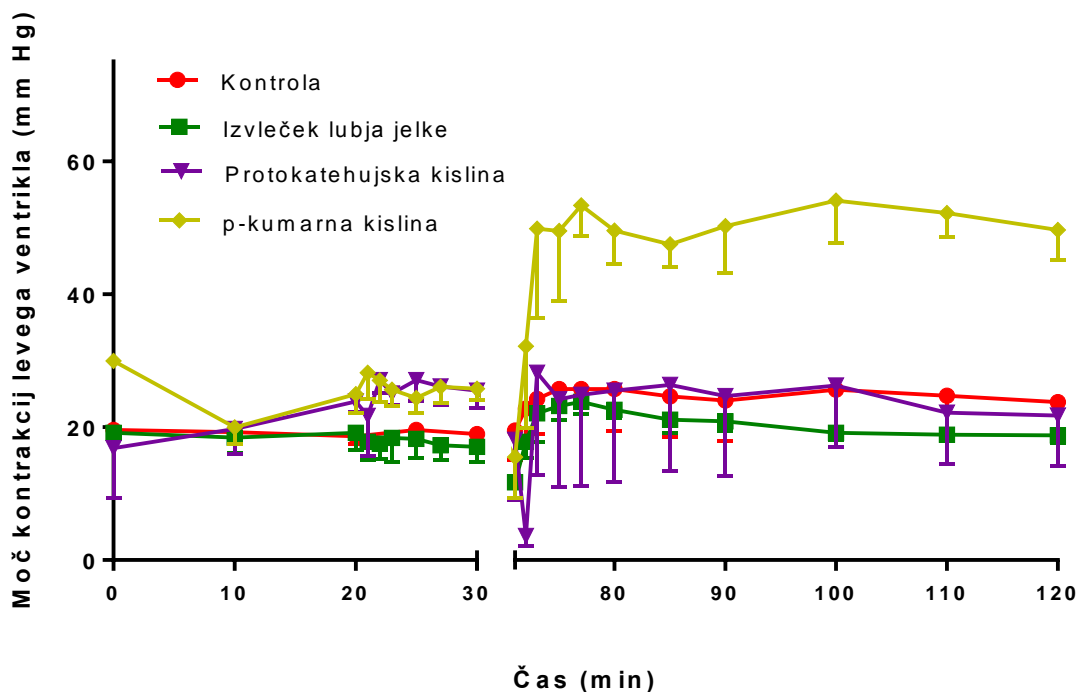
Slika 6: Površina pod krivuljo hitrosti izločanja LDH iz izoliranih podganjih src.

*- značilne razlike ($p < 0,05$) v skupini z izvlečkom lubja jelke glede na kontrolno skupino in značilne razlike ($p < 0,01$) glede na skupini s protokatehujsko in p-kumarno kislino.

4.3. Moč kontrakcij levega ventrikla

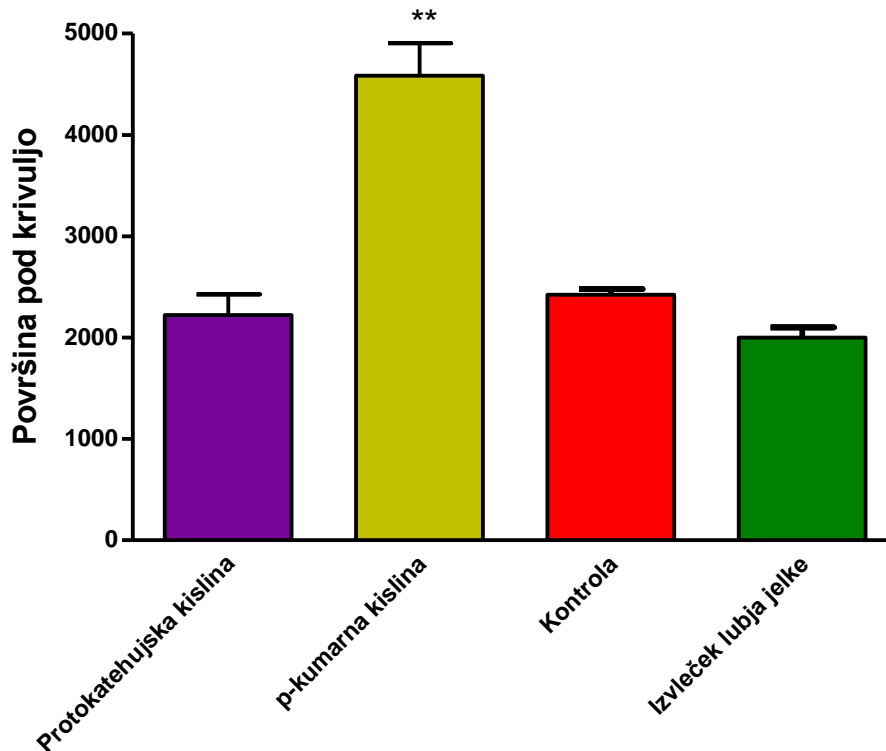
Moč kontrakcij levega ventrikla oziroma razlika med sistolnim in diastolnim tlakom v levem ventriklu je bila v prvih 30 minutah do pričetka ishemije stalna in pri skupinah s protokatehujsko in p-kumarno kislino nekoliko višja v primerjavi z ostalima skupinama. Po začetku reperfuzije, ob pojavu sinusnega ritma in do konca poskusa je bila moč kontrakcij v kontrolni skupini in skupinama s protokatehujsko kislino in izvlečkom lubja jelke konstantna in enaka vrednosti pred ishemijo. V teh treh skupinah se vrednosti niso značilno razlikovale med seboj, skupina s protokatehujsko kislino je imela zelo podobne vrednosti kontrolni skupini, skupina z izvlečkom lubja jelke pa je imela ves čas reperfuzije nižje vrednosti. V skupini s p-kumarno kislino je moč kontrakcij v reperfuziji naglo in močno narasla na dvakratno vrednost glede na ostale tri skupine in tak trend se je ohranil do konca poskusa.

Površina pod krivuljo tlaka v levem ventriklu skupine s p-kumarno kislino je bila statistično značilno višja ($p < 0,05$) v primerjavi z vsemi tremi ostalimi skupinami. Med ostalimi tremi skupinami ni bilo značilnih razlik.



Slika 7: Moč kontrakcij oziroma tlak v levem ventriklu izoliranih podganjih src pri poskusih s 40 minutno ishemijo. Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posamezni skupini. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.

Prvih 20 minut so bila srca perfundirana z raztopino K-H in nato 10 minut z dodatkom preiskovane snovi. Sledila je 40 minutna ishemija in od 70. minute dalje reperfuzija z enako raztopino kot pred nastopom ishemije.

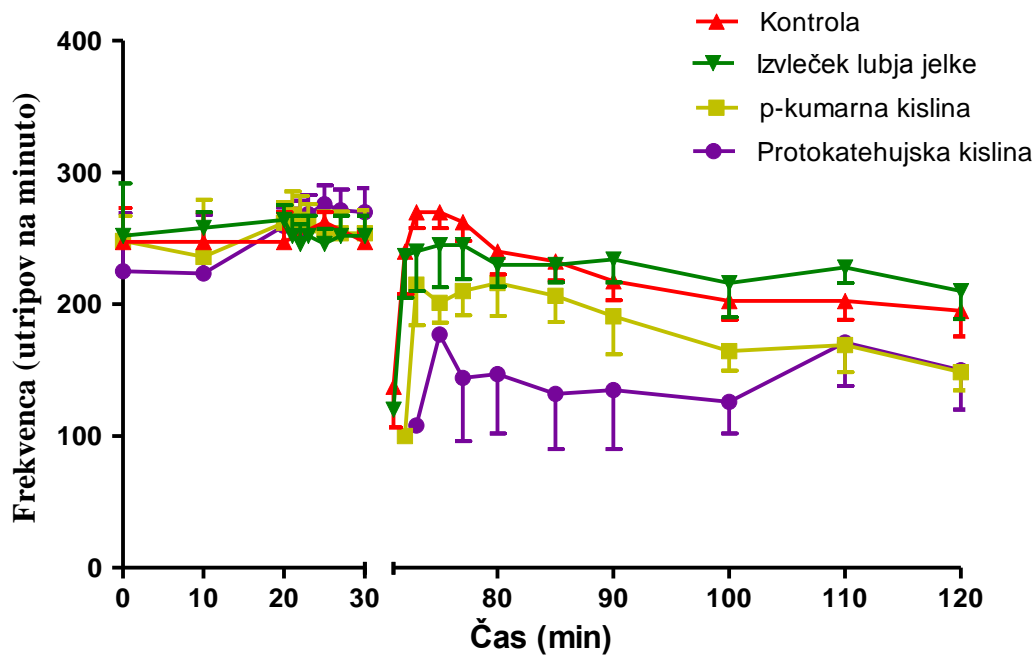


Slika 8: Površina pod krivuljo moči kontrakcij levega ventrikla v izoliranih podganjih srcih.

** - značilne razlike ($p < 0,001$) v skupini s p-kumarno kislino glede na kontrolno skupino, skupino s protokatehujsko kislino in skupino z izvlečkom lubja jelke.

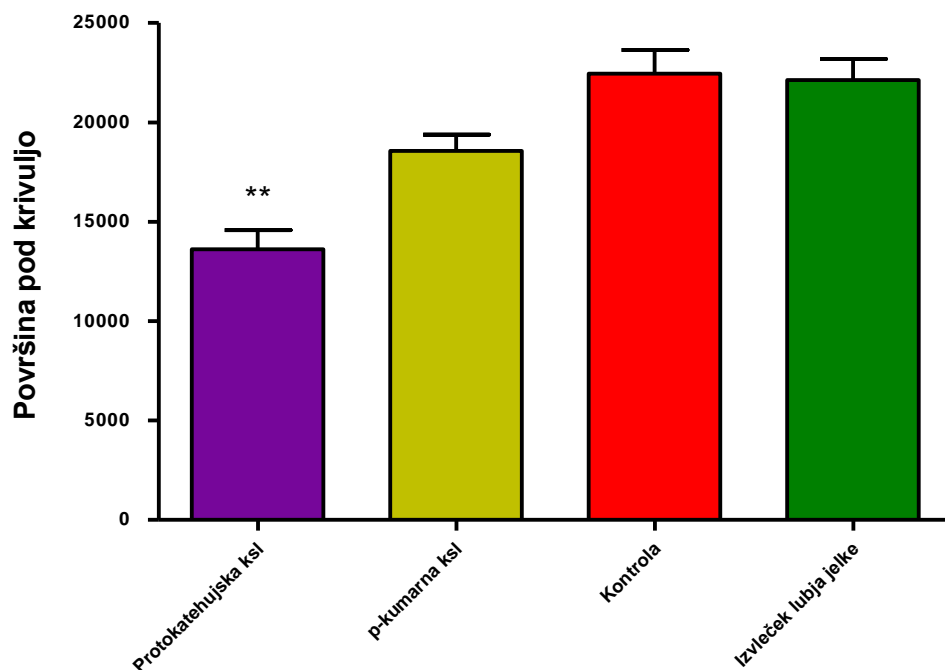
4.4. Frekvenca srčnih utripov

V prvih 30 minutah poskusov ni bilo večjih odstopanj vrednosti frekvence srčnih utripov med posameznimi skupinami. V začetku reperfuzije je frekvenca v kontrolni skupini in v skupinah s p-kumarno kislino in z izvlečkom lubja jelke naglo narastla do vrednosti pred ishemijo in nato do konca poskusov postopoma upadala, trend je bil podoben v vseh treh skupinah in med njimi ni bilo značilnih razlik. Skupina s protokatehujsko kislino je imela ves čas reperfuzije nižjo frekvenco srčnih utripov in ob primerjavi površine pod krivuljo je razvidno, da je imela značilno ($p < 0,01$) nižjo frekvenco srčnih utripov glede na kontrolno skupino in skupino z izvlečkom lubja jelke. Med ostalimi skupinami ni bilo značilnih razlik.



Slika 9: Frekvenca srčnih utripov izoliranih podganjih src pri poskusih s 40 minutno ishemijo. Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posamezni skupini. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.

Prvih 20 minut so bila srca perfundirana z raztopino K-H in nato 10 minut z dodatkom preiskovane snovi. Sledila je 40 minutna ishemija in od 70. minute dalje reperfuzija z enako raztopino kot pred nastopom ishemije.



Slika 10: Površina pod krivuljo frekvence srčnih utripov izoliranih podganjih src.

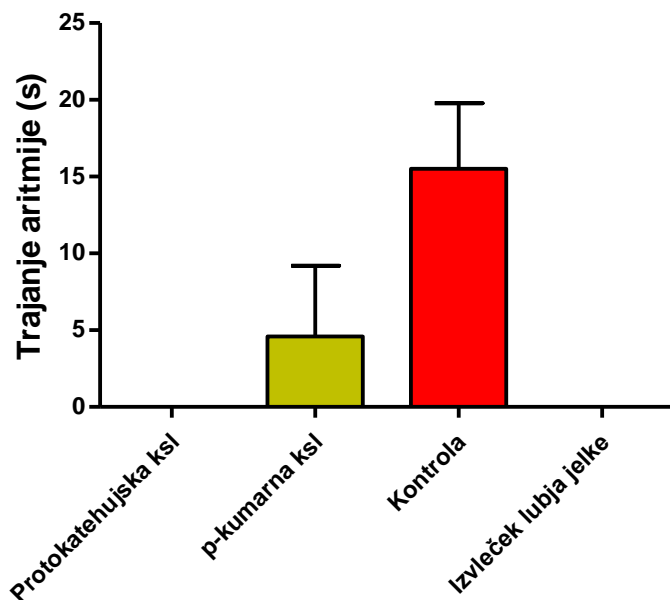
** - značilne razlike ($p < 0,01$) v skupini s protokatehujško kislino glede na kontrolno skupino in skupino z izvlečkom lubja jelke in značilne razlike ($p < 0,05$) glede na skupino s p-kumarno kislino.

4.5. Aritmije

Tekom celotnega poskusa smo snemali EKG, s pomočjo katerega smo nato ovrednotili pojav in trajanje 4 vrst aritmij. Vrednotili smo naslednje aritmije: asistolija, ventrikularna fibrilacija (VF), ventrikularna tahikardija (VT) in ventrikularni prezgodnji utripi ali ekstrasistole. Trajanje aritmij smo izrazili v sekundah in rezultate prikazali kot trajanje posamezne aritmije za vsako skupino in celokupno trajanje vseh aritmij skupaj za vsako testirano skupino.

4.5.1. Asistolija

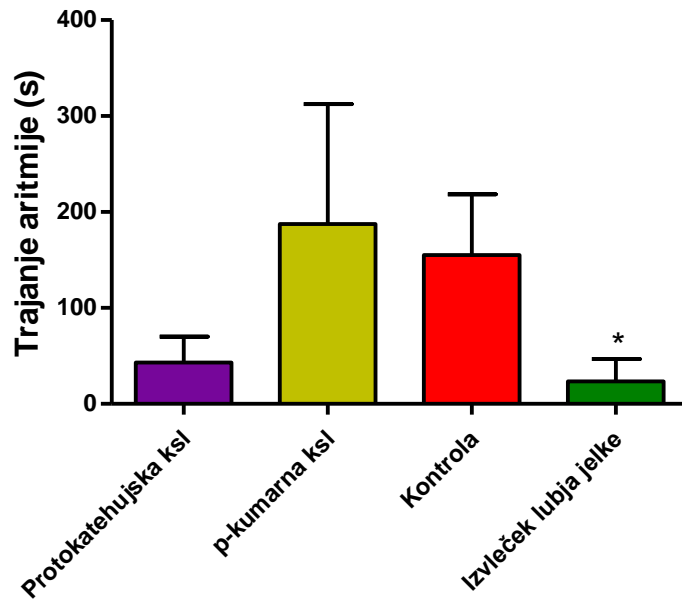
Asistolija se je pojavila le pri kontrolni skupini poskusov in za nekaj sekund v skupini s p-kumarno kislino, vendar razlika med njima ni značilna. V skupini z izvlečkom lubja jelke in protokatehujsko kislino se asistolija ni pojavila.



Slika 11: Graf trajanja asistolij pri izoliranih podganjih srcih.

4.5.2. Ventrikularna fibrilacija

Ventrikularna fibrilacija (VF) se je pojavljala v vseh skupinah, največ v kontrolni skupini in skupini s p-kumarno kislino. Značilno ($p < 0,05$) krajši je bil čas pojavljanja VF glede na kontrolno skupino le v skupini z izvlečkom lubja jelke.

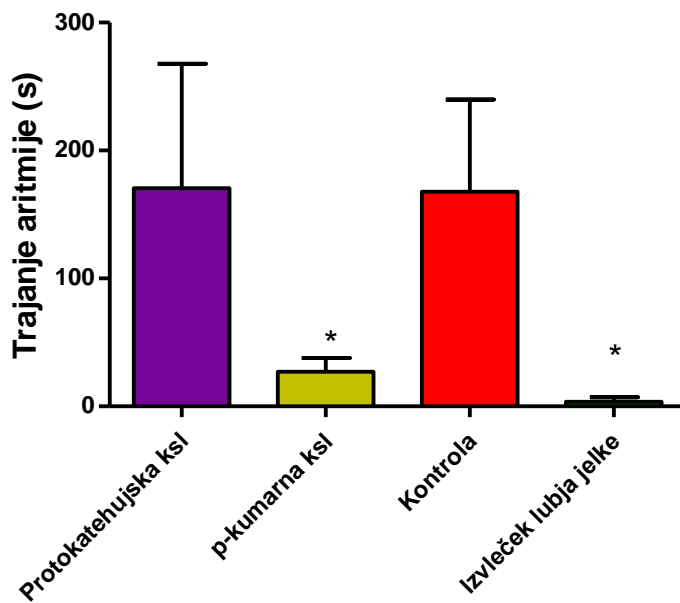


Slika 12: Graf trajanja ventrikularne fibrilacije pri izoliranih podganjih srcih.

*- značilne razlike ($p < 0,05$) v skupini z izvlečkom lubja jelke, glede na kontrolno skupino.

4.5.3. Ventrikularna tahikardija

Ventrikularna tahikardija (VT) se je pojavila v vseh skupinah, vendar v skupini z izvlečkom lubja jelke v povprečju le za nekaj sekund; ta skupina je imela značilno ($p < 0,05$) krajši čas trajanja VT glede na kontrolno skupino in skupino s protokatehujsko kislino. Značilno krajši čas trajanja VT ($p < 0,05$) glede na kontrolno skupino in skupino s protokatehujsko kislino je bil tudi v skupini s p-kumarno kislino. Kontrolna skupina in skupina s protokatehujsko kislino sta imeli podoben povprečen čas trajanja VT.

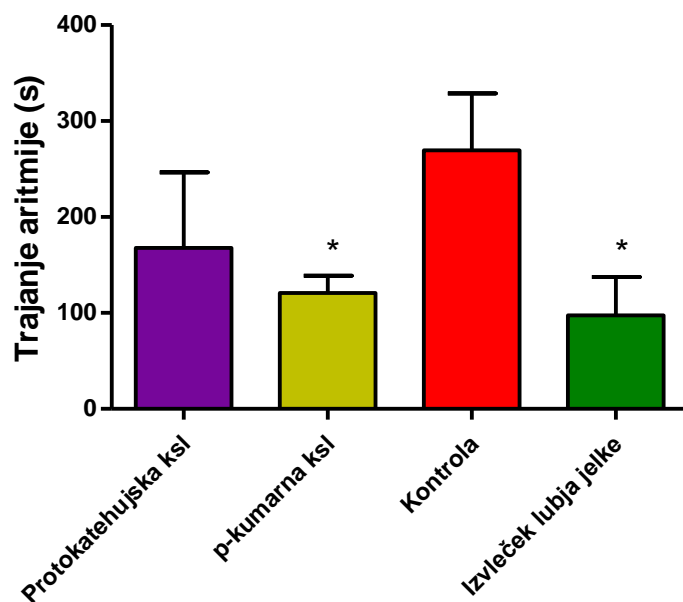


Slika 13: Graf trajanja ventrikularne tahikardije pri izoliranih podganjih srcih.

*- značilne razlike ($p < 0,05$) v skupini s p-kumarno kislino in skupini z izvlečkom lubja jelke, glede na kontrolno skupino in skupino s protokatehujsko kislino.

4.5.4. Ekstrasistola ali ventrikularni prezgodnji utrip

Ta vrsta aritmije se je prav tako pojavljala v vseh skupinah, največ pa v kontrolni skupini. Čas trajanja ekstrasistol glede na kontrolno skupino je bil v skupini s p-kumarno kislino in izvlečkom lubja jelke značilno krajši ($p < 0,05$).

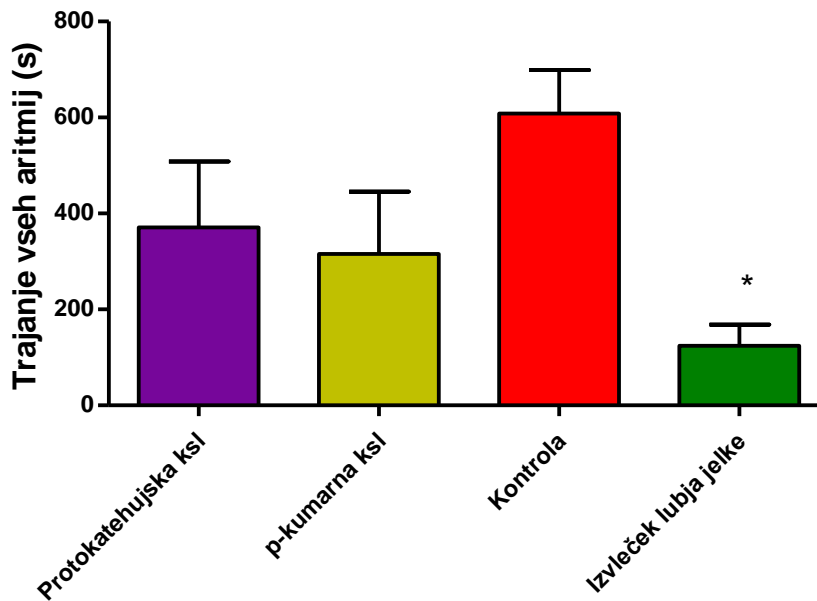


Slika 14: Graf trajanja ekstrasistol pri izoliranih podganjih srcih.

*- značilne razlike ($p < 0,05$) v skupini s p-kumarno kislino in skupini z izvlečkom lubja jelke, glede na kontrolno skupino.

4.5.5. Trajanje vseh aritmij

Vsota trajanja vseh vrst aritmij je bila največja v kontrolni skupini, vendar značilnih razlik v primerjavi s protokatehujsko in p-kumarno kislino ni bilo. Značilne razlike ($p < 0,05$) v vsoti trajanja vseh aritmij glede na kontrolno skupino so bile prisotne v skupini z izvlečkom lubja jelke. Značilnih razlik med izvlečkom lubja jelke in obema preučevanima kislinama ni bilo.



Slika 15: Graf vsote trajanja vseh aritmij pri izoliranih podganjih srcih.

*- značilne razlike ($p < 0,05$) v skupini z izvlečkom lubja jelke, glede na kontrolno skupino.

5. RAZPRAVA

V tej diplomski nalogi smo raziskovali vpliv dveh spojin, ki sta sestavni del izvlečka lubja navadne jelke na njune morebitne zaščitne učinke pred ishemično- reperfuzijskimi poškodbami izoliranega podganjega srca ob akutni aplikaciji obeh spojin. V podobni raziskavi v diplomskem delu na Fakulteti za farmacijo (36) je bilo dokazano, da izvleček lubja jelke zaščiti pred nastankom ishemično- reperfuzijskih okvar izoliranih podganjih src. Izvedli smo poskuse z enakim protokolom in preverjali ali protokatehujska kislina in p-kumarna kislina delujeta antiaritmogeno in ali ščitita pred ishemično- reperfuzijskimi poškodbami. S temi rezultati lahko pokažemo, ali gre v izvlečku lubja jelke za sinergistično delovanje več spojin, ki ga sestavljajo ali za delovanje posamičnih spojin.

5.1. Razprava o materialih in metodah

5.1.1. Protokatehujska in p-kumarna kislina ter izvleček lubja jelke

Največ raziskav iz lubja iglavcev je bilo doslej narejenih na izvlečku lubja francoskega obmorskega bora (*Pinus maritima*). Pycnogenol® je na tržišču registriran pripravek iz lubja tega bora. Raziskave na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, so pokazale, da poleg bora tudi izvleček lubja drugih iglavcev vsebuje zmesi polifenolov, ki delujejo enako učinkovito. Tak je izvleček lubja jelke, ki vsebuje podobno zmes polifenolov kot izvleček lubja francoskega obmorskega bora. Leta 2012 je podjetje *Ars pharmae* dalo na tržišče pripravek z izvlečkom lubja jelke Abigenol® (sedanji izdelek, dopolnjen z vitamini se imenuje Enduranza®), prehransko dopolnilo, ki vsebuje izvleček lubja kočevske navadne jelke, pridobljen po patentiranem postopku (37). Izvleček iz lubja jelke ima zelo podobno sestavo kot Pycnogenol®, za katerega so v številnih raziskavah dokazali, da ima antioksidativne, protivnetne, antiagregatorne in druge ugodne učinke (22, 23, 38). Raziskav, ki bi vse to dokazale tudi za izvleček lubja jelke, je bistveno manj. V diplomskem delu na Fakulteti za farmacijo so ugotovili, da izvleček lubja jelke deluje zaščitno na izolirano podganje srce, ki je bilo predhodno izpostavljeno ishemiji (36). V nedavni raziskavi so dokazali, da ima *in vitro* izvleček lubja jelke močnejše antioksidativno delovanje kot izvleček lubja obmorskega bora (24).

Nas je zato zanimalo ali in v kakšni meri k tem učinkom prispevata protokatehujska kislina in p-kumarna kislina, ki sta sestavini izvlečka lubja jelke.

V naši raziskavi smo za obe kislini uporabili koncentracijo 1 $\mu\text{mol/L}$, kar je precej višja koncentracija od tiste, ki je prisotna v izvlečku lubja jelke, saj le-ta ob začetku naše raziskave še ni bila poznana. V raziskavi so ugotovili, da je vsebnost protokatehujske kisline v izvlečku 0,77%, p-kumarne kisline pa 0,37% (24). Masna koncentracija izvlečka lubja jelke je bila 10 $\mu\text{g/L}$, masna koncentracija protokatehujske kisline v naši raziskavi je bila 154 $\mu\text{g/L}$, p-kumarne kisline pa 164 $\mu\text{g/L}$.

Po pregledu podatkovnih baz smo ugotovili, da še ni objavljenih člankov, ki bi raziskovali akutni učinek p-kumarne in protokatehujske kisline na ishemično-reperfuzijske okvare v srcu. Več drugih raziskav je bilo narejenih s p-kumarno kislino. Ugotovili so zaščitne učinke na srčne mišične celice pri miokardnem infarktu ob kronični uporabi p-kumarne kisline. Dokazali so tudi antioksidativno, antiagregatorno in protivnetno delovanje (25, 26, 29).

Raziskav s protokatehujsko kislino je bilo narejenih še manj, dokazali pa so antioksidativni, protivnetni in nevroprotektivni učinek (32, 34, 35)

5.1.2. Poskusne živali

Za poskuse smo uporabili izolirana srca podgan Wistar, ki so eden najbolj pogosto uporabljenih modelov izoliranega srca. Prav tako je v laboratoriju, kjer so bili poskusi izvedeni, to standarden postopek, tako da je na voljo dovolj primerljivih rezultatov. Podgane in ostale manjše živali so najbolj pogosto uporabljen živalski model, saj je njihova vzreja za laboratorijsko delo enostavna in poceni (10). Živali so bile vzgajane pod kontroliranimi pogoji in zato večjih odstopanj rezultatov glede na prejšnje študije ne bi smelo biti.

5.1.3. Model izoliranega podganjega srca

Prednosti modela izoliranega podganjega srca je dostopnost in zanesljivost, poskusi so relativno preprosti zaradi hitre in enostavne izolacije podganjih src. Poskusi na izoliranem podganjem srcu so navadno prva izbira za ugotavljanje in preučevanje morebitne antiaritmogene aktivnosti preiskovane učinkovine po predhodni izpostavljenosti ishemiji, ugotavljamo pa lahko tudi odvisnost učinkov od uporabljene koncentracije (10). Za

ovrednotenje učinkov in delovanja naravnih snovi vsekakor ni dovolj, če učinkovino testiramo samo na enem modelu, kot je model izoliranega podganjega srca. Preskuse naredimo na tkivih ali organih, kjer predvidevamo morebitne učinke, prav tako pa moramo, preden pričnemo s postopki za klinično testiranje, opraviti še toksikološka in druga *in vivo* testiranja na vsaj dveh živalskih modelih, kar je zahtevnejši, dražji in časovno bolj zahteven del neklinične raziskave takih učinkovin (9). S poskusi na izoliranih srcih dobimo dovolj obsežne podatke o učinkovitosti in koncentracijski odvisnosti učinkovine, na podlagi katerih presodimo, ali je preiskovana učinkovina primerna za nadaljnja testiranja. Problem, ki se pojavi, je skupen vsem *in vitro* poskusom - učinkovine, ki jih preučujemo namreč dodamo v raztopino, s katero perfundiramo srce. *In vivo* so učinkovine podvržene metabolizmu v jetrih, zato je potrebno ugotoviti, kako in s kakšno hitrostjo se preiskovana učinkovina presnavlja v telesu, da vemo, ali v *in vivo* pogojih pride na tarčno mesto v enaki obliki, kot smo jo uporabili v poskusih na izoliranem srcu.

5.2. Razprava o rezultatih

5.2.1. Koronarni pretok

Pri vseh treh skupinah se je koronarni pretok src povišal takoj po koncu ishemije, ob vzpostavitvi reperfuzijske raztopine. Najbolj se je pretok povišal v skupini s p-kumarno kislino in izvlečkom lubja jelke, kjer so razlike bile značilne glede na kontrolno skupino. Pri poskusih z dodano protokatehujsko kislino pa je koronarni pretok ob začetku reperfuzije dosegel enako vrednost, kot so jih srca imela pred nastopom ishemije. Za razliko od ostalih src, kjer se je koronarni pretok povečeval nekaj nadaljnjih minut po začetku reperfuzije, je pretok stalno in počasi upadal, sicer manj kot v kontrolni skupini in bolj kot v skupinah z izvlečkom lubja jelke in pri p-kumarni kislini. Na podlagi tega sklepamo, da tudi p-kumarna kislina deluje akutno vazodilatatorno, kar je že dokazano za izvleček lubja jelke. Ta učinek traja le nekaj minut, doseže vrh v 77. minuti, nato pa postopoma izzveni in se vrednosti v vseh skupinah približajo vrednostim v kontrolni skupini. Predvidevamo, da se to verjetno ne bi zgodilo pri *in vivo* poskusih, kjer bi se sproti sproščali encimi odgovorni za vazodilatacijo, učinke pa bi lahko vrednotili šele po daljšem trajajočem dajanju učinkovin živalim. V naših poskusih z izoliranim organom, kjer je metabolizem spremenjen, pa koncentracija encimov, na katere delujejo preiskovane snovi, sčasoma upadejo in zaradi tega upade tudi koronarni pretok.

5.2.2. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)

Laktatna dehidrogenaza je encim, ki se nahaja v mnogih telesnih tkivih, med drugim tudi v srčnih mišičnih celicah. Ko pride do poškodbe tkiva oziroma membran celic se sprošča v večjih količinah in tako služi kot diagnostični kazalec, na primer ob srčnem infarktu ali katerem drugem srčno-žilnem dogodku. Količino LDH smo merili v efluentih pred in po ishemiji. Med ishemijo nismo vzorčili, saj smo srcem ustavili dotok K-H raztopine in zato tudi ni bilo izplavljanja snovi iz celic. V reperfuziji, ko smo ponovno vzpostavili pretok raztopine K-H skozi srce, so se iz celic začele sproščati snovi, med drugim tudi LDH, ki smo ga nato merili v efluentu. Okvaro srca opisujemo kot ishemično-reperfuzijsko, saj iz metode ne moremo sklepati, v kakšnem razmerju k okvaram prispevajo ishemične in koliko so to reperfuzijske okvare.

V času pred ishemijo je bila hitrost sproščanja LDH podobna v vseh štirih skupinah. Po ishemiji pa je hitrost najbolj narastla v skupini s protokatehujsko in p-kumarno kislino; vrednosti so bile celo višje kot v kontrolni skupini. Iz površine pod krivuljo je razvidno, da samo v skupini z izvlečkom lubja jelke pride do značilnega znižanja hitrosti sproščanja LDH, skupini s protokatehujsko in p-kumarno kislino pa sta primerljivi s kontrolno. Iz tega sklepamo, da p-kumarna in protokatehujska kislina ne delujeta zaščitno na srčne mišične celice tako kot celoten izvleček in da na ta način deluje ena ali več drugih komponent izvlečka lubja jelke, najverjetneje pa gre za sinergistični učinek, vendar bi bile za potrditev potrebne nadaljnje raziskave.

5.2.3. Moč kontrakcij levega ventrikla

Pri naših poskusih smo merili sistolni tlak in potek spremembe tlaka. Razliko med sistolnim in diastolnim tlakom smo izrazili kot moč kontrakcije levega ventrikla. Povečana moč kontrakcij levega ventrikla v reperfuziji kaže na poškodbe miokarda, saj v poškodovane srčne mišične celice vdre večja količina zunajceličnega kalcija in drugih kationov, zaradi česar pride do (prehodno) povečane kontraktilnosti miokarda.

Povečanje kontraktilnosti srca se je pojavilo pri poskusih s p-kumarno kislino, saj so bile vrednosti tlaka v levem ventriklu ves čas reperfuzije višje kot pri ostalih skupinah. To povišanje se sklada tudi s hitrostjo sproščanja LDH, ki je v skupini s p-kumarno kislino bila ves čas višja kot v kontrolni skupini. Sklepamo, da p-kumarna kislina ne deluje

zaščitno na srčne mišične celice, saj je bilo sproščanje LDH neznačilno povišano, značilno pa je bil povišan tlak v levem ventriklu v primerjavi z ostalimi tremi skupinami.

Protokatehujska kislina ni vplivala na spremembo tlaka, prav tako pa ni značilno vplivala na hitrost sproščanja LDH. Iz tega sklepamo, da tudi protokatehujska kislina ne poseduje zaščitnega učinka pred nastankom ishemično reperfuzijskih okvar, ki jih kaže izvleček lubja jelke.

5.2.4. Frekvenca srčnih utripov

Pri poskusih na izoliranih srcih, kjer delovanje srca nadzirajo le avtonomni sistem srca, frekvenco določa ritmovnik. Ta notranja frekvenca se spremeni le pod vplivom hidrostatskega tlaka perfuzijske tekočine ali pod vplivom farmakoloških učinkovin. Na začetku poskusa pred ishemijo so bile frekvence bitja src v vseh skupinah medsebojno primerljive. V začetku reperfuzije je frekvenca v kontrolni skupini in pri skupinah z izvlečkom lubja jelke in p-kumarno kislino hitro narastla. Skupina z izvlečkom lubja jelke je bila primerljiva s kontrolno skupino, skupina s p-kumarno kislino je imela nekoliko nižje frekvence v reperfuziji, vendar značilnih razlik med temi tremi skupinami ni bilo. V skupini s protokatehujsko kislino je bila frekvenca bitja src ves čas reperfuzije nižja kot v ostalih skupinah in iz površin pod krivuljo je razvidno, da je bila značilno nižja kot v kontrolni skupini in skupini z izvlečkom lubja jelke. Poskusi s protokatehujsko kislino kažejo na njen verjeten zaviralni vpliv na prevajanje signalov skozi električni prevodni sistem srca, saj se upočasnijo le frekvenca utripov, ne spremeni pa se moč kontrakcij srca. Za dokaz take aktivnosti bi bilo potrebno izvesti dodatne poskuse s spremenjenimi protokoli od teh, ki smo jih uporabili v tej nalogi, in jih primerjati z našimi rezultati. Eden od takih poskusov bi lahko bil vsiljeni ritem s povišano frekvenco bitja srca.

5.2.5. Pojavljanje in trajanje aritmij

I-R poškodbe in srčne okvare smo določali tudi na podlagi pojavljanja in trajanja aritmij. Opazovali smo štiri vrste aritmij: asistolijo, ventrikularno fibrilacijo (VF), ventrikularno tahikardijo (VT) in ekstrasistole. Asistolija je najnevarnejši in najmanj zaželen pojav, to je tako imenovana »ravna črta« na EKG. Gre za popolno odsotnost električne aktivnosti srca, srce se ne krči in posledično ne prečrpava krvi, zato je aritmija, ki popolnoma izniči osnovno funkcijo srca. Druga najnevarnejša aritmija je ventrikularna fibrilacija, ki je glavni vzrok za srčni zastoj in nenadno srčno smrt. Tretja aritmija, ki smo jo spremljali je

ventrikularna tahikardija, ki je nenormalno hiter ritem bitja srca in sama po sebi ni življenjsko ogrožajoča in ekstrasistole ali ventrikularni prezgodnji utripi, ki prav tako niso nevarni, če se pojavijo za kratek časovni interval.

Asistolija se sploh ni pojavila v skupinah z izvlečkom lubja jelke in protokatehujsko kislino. Za nekaj sekund se je pojavila v skupini s p-kumarno kislino in še za nekoliko daljši interval v kontrolni skupini, vendar razlika med njima ni bila značilna. Ostale tri vrste aritmij so se pojavile v vseh skupinah. Značilno krajši čas trajanja ventrikularne fibrilacije, prav tako ene najmanj zelenih aritmij, se je pokazal le v skupini z izvlečkom lubja jelke. Ventrikularna tahikardija je najdlje trajala v kontrolni skupini in skupini s protokatehujsko kislino, značilno krajše trajanje pa je bilo v skupinah z izvlečkom lubja jelke in p-kumarno kislino. Enako skrajšanje aritmij je bilo tudi pri ekstrasistolah, kjer je značilno krajše trajanje glede na kontrolo v skupini z izvlečkom lubja jelke in p-kumarno kislino. Po pregledu vsote trajanja vseh vrst aritmij lahko zaključimo, da so najdlje časa trajale v kontrolni skupini, vendar smo značilno krajše trajanje aritmij ugotovili le v skupini z izvlečkom lubja jelke. Iz tega lahko zaključimo, da protokatehujska in p-kumarna kislina delujeta le delno antiaritmogeno in manj zaščitno, kot celoten izvleček lubja jelke. Pri protokatehujski kislini se asistolije sploh niso pojavile, vendar pa pri drugih vrstah aritmij ni značilnih razlik glede na kontrolno skupino. P-kumarna kislina je sicer pokazala zaščitni učinek pred VT in ekstrasistolami, vendar so se v tej skupini pojavile tako asistolije kot VF, ki so bolj nevarne in se v skupini z izvlečkom lubja niso pojavile oziroma so se pojavile le za zelo kratek čas. Izvleček lubja jelke je izkazal mnogo boljše antiaritmogeno delovanje, saj ima značilno nižje trajanje vseh vrst aritmij, kot tudi vsoto trajanja vseh aritmij, zato sklepamo, da je za antiaritmogeni učinek v izvlečku odgovorno sinergistično delovanje več spojin, ki ga sestavljajo. Sklepamo tudi, da p-kumarna in protokatehujska kislina delno prispevata k takemu delovanju.

5.3. Primerjava naših rezultatov s podobnimi raziskavami

Narejenih je že bilo nekaj podobnih raziskav, kot je naša, kjer so preučevali zaščitne učinke rastlinskih polifenolov pred ishemično reperfuzijskimi poškodbami izoliranega podganjega srca. Največ takih raziskav je bilo narejenih z resveratrolom, to je polifenol, ki se nahaja v rdečem vinu. Dokazali so, da zmerno uživanje rdečega vina ščiti pred srčno žilnimi boleznimi in deluje zaščitno pred ishemično reperfuzijskimi poškodbami izoliranih

podganjih src. Resveratrol je izboljšal ventrikularno funkcijo srca in zmanjšal obseg miokardnih poškodb. Kardioprotektivne učinke resveratrola pripisujejo njegovemu močnemu antioksidativnemu in protivnetnemu delovanju (39, 40, 41).

Podobne raziskave kot naša so bile narejene tudi s polifenoli in flavonoidi iz zelenega čaja. V eni od takih raziskav so dokazali, da epigalokatehin- 3- galat, polifenol prisoten v zelenem čaju, deluje antioksidativno in značilno zniža obseg poškodb miokardnih celic izoliranega srca podgane povzročenih z ishemično- reperfuzijo ter jih ščiti pred apoptozo. (42).

Raziskav, podobnim naši, z izvlečkom lubja jelke po pregledu podatkovnih baz nismo našli, so pa bile narejene številne raziskave z izvlečkom lubja francoskega obmorskega bora (*Pinus pinaster*), ki ima podobno sestavo kot izvleček lubja navadne jelke. Odkrili so ugodne učinke pri števnih degenerativnih obolenjih, med drugim tudi zaščitne učinke pri srčno žilnih boleznih in zaščitni učinek pred ishemično- reperfuzijskimi poškodbami (22).

6. ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo raziskovali vpliv protokatehujske in p-kumarne kisline na ishemično- reperfuzijske poškodbe izoliranega srca podgane ob njuni akutni aplikaciji. Kislini sta sestavni del izvlečka lubja navadne jelke, ki je ob akutni aplikaciji že pokazal dobre zaščitne učinke pred ishemično-reperfuzijskimi poškodbami in antiaritmogeno delovanje po ishemiji. Raziskali smo, ali in v kakšni meri k tem učinkom prispevata protokatehujska in p-kumarna kislina.

Izvleček lubja jelke je pokazal antiaritmogeno delovanje, saj je značilno znižal čas trajanja vseh vrst aritmij. Tega ne moremo pripisati protokatehujski in p-kumarni kislini, saj sta izkazali zaščitni učinek le pri določeni vrsti aritmij, celokupnega trajanja pa nista značilno znižali. Predpostavljamo pa, da obe kislini delno prispevata k antiaritmogenemu delovanju izvlečka lubja jelke.

Izvleček lubja jelke je značilno zmanjšal hitrost sproščanja LDH in na ta način zaščitil miocite pred ishemično - reperfuzijskimi okvarami. Protokatehujska in p-kumarna kislina nista zmanjšali stopnje okvare srčnih mišičnih celic, saj je bila hitrost sproščanja LDH višja kot pri izvlečku lubja jelke in podobna kot v kontrolni skupini. Pri p-kumarni kislini smo ugotovili še značilno povišanje moči kontrakcij levega ventrikla, kar je še dodatni pokazatelj postishemične okvare srčne mišice.

Protokatehujska in p-kumarna kislina sta značilno povišali koronarni pretok, kar kaže na njuno sposobnost širjenja žil. Kot taki, bi lahko bili potencialno uporabni učinkovini v patoloških stanjih, kjer je zmanjšana relaksacijska kapaciteta žil in kjer je zato zaželena dilatacija žil, drugi učinki pa niso potrebni, na primer za izboljšanje krvnega pretoka določenih organov. Spojini pa nista primerni v ishemičnih stanjih, ravno zaradi odsotnosti citoprotektivnega učinka na miocite.

Po pregledu vseh spremenljivk lahko zaključimo, da je izvleček lubja jelke kot celota učinkovitejši kot sami protokatehujska in p-kumarna kislina. V drugih raziskavah sta ob kronični uporabi obe preučevani kislini, zlasti p-kumarna kislina, pokazali zelo dobre antioksidativne in protivnetne učinke, zato smo ugodne farmakološke učinke pričakovali tudi pri naši raziskavi, vendar so le-ti slabši kot pri izvlečku lubja jelke. Zato lahko

predpostavimo, da je seštevek učinkov izvlečka lubja jelke očitno večplasten in ga ne moremo pripisati le nekaj spojinam, ki ga sestavljajo.

Ker smo v diplomskem delu preverjali samo akutne učinke protokatehajske in p-kumarne kisline, bi bilo smiselno preveriti še, kakšni so učinki ob daljšem uživanju obeh spojin, kot je bilo to že narejeno za p-kumarno kislino (25) in kjer je le-ta pokazala zaščitne učinke na srčne mišične celice po infarktu. Zato bi bilo smiselno raziskati tudi metabolizem obeh spojin in koncentracijsko odvisnost potencialnih ugodnih učinkov.

7. LITERATURA

- 1.) Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Physiology, 5th Ed., Mosby, St. Louis, Missouri, 2004: 263-442
- 2.) Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Berne & Levy Principles of physiology, 4th Ed., Elsevier Mosby, Philadelphia, 2006: 178-357
- 3.) Zorc Pleskovič R, Milutinović Živin A, Petrovič D: Histologija, učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2006: 33-35; 49-53
- 4.) Bresjanac M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije, 3. izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002: 19-46
- 5.) Ribarič S, et al: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 163-182
- 6.) McPhee SJ, Ganong WF: Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine, 5th Ed., The McGraw-Hill Companies, USA, 2006: 259-326
- 7.) Silbernagel S, Lang F: Color atlas of pathophysiology, 5th Ed., Thieme, Stuttgart, 2000: 176-241
- 8.) Raedschelders K, Ansley DM, Chen DDY: The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. Pharmacology & Therapeutics, 2012; 133: 230-255
- 9.) Blaauboer BJ: In vitro and other non-animal experiments in the biomedical sciences. Anzccart news, 1996; 9: 1-4
- 10.) Curtis MJ: Characterisation, utilisation and clinical relevance of isolated perfused heart models of ischaemia-induced ventricular fibrillation. Cardiovascular Research, 1998, 39: 194-215.
- 11.) Ribarič S, Bresjanac M, et al: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. Izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2001: 32 in 235-250
- 12.) Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G: Ateroskleroza- dejavniki tveganja in zapleti. Medicinski mesečnik, 2007: 235-240
- 13.) Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, 2nd Ed., Lavoisier Publishing, Paris, 1999: 225-261
- 14.) Pandey KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009; 2: 270-278

- 15.) Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004; 79: 727-747
- 16.) Arts I, Hollman P: Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81: 317S–25S.
- 17.) Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer J: Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2010; 2: 1106-1131
- 18.) Curin Y, Andriantssitohaina R: Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological Reports*, 2005; 57: 97-107
- 19.) Vita JA: Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81: 292S-7S
- 20.) Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M: Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81: 215S-7S
- 21.) Ou HC, Chou F, Sheen H et al: Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clinica Chimica Acta*, 2006; 364: 196 – 204
- 22.) Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K: A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 133: 261-277.
- 23.) D'Andrea G: Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 2010; 81: 724-736
- 24.) Tavčar Benković E, Grohar T, Žigon D, Švajger U, Janeš D, Kreft S, Štrukelj B: Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 2014; 52: 23-28
- 25.) Roy AJ, Maizen Prince PS: Preventive effects of *p*-coumaric acid on lysosomal dysfunction and myocardial infarct size in experimentally induced myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology*, 2013; 699: 33-39
- 26.) Pragasam SJ, Venkatesan V, Rasool M: Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effect of *p*-Coumaric Acid, a Common Dietary Polyphenol on Experimental Inflammation in Rats. *Inflammation*, 2012; 36: 169-176
- 27.) Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM: Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacological Research*, 2003; 48: 461-465

- 28.) Zang LY, Cosma G, Gardner H, Shi X, Castranova V, Vallyathan V: Effect of antioxidant protection by *p*-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000; 279: C954-C960
- 29.) Luceri C, Giannini L, Lodovici M, Antonucci E, Abbate R, Masini E, Dolaro P: *p*-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*, 2007; 97: 458-463
- 30.) Pragasam SJ, Murunikara V, Sabina EP, Rasool M: Antiperoxidative potential of *p*-coumaric acid, a common dietary phenol, in adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2012; 10: 932-938
- 31.) Vauzour D, Corona G, Spencer PE: Caffeic acid, tyrosol and *p*-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010; 501: 106-111
- 32.) Lin C, Huang C, Huang C, Yin M: Anticoagulatory, antiinflammatory and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. *J. Agric. Food Chem*, 2009; 57: 6661-6667 (3PR)
- 33.) Cao Y, Zhang L, Ma C, Chang B, et al: Metabolism of protocatechuic acid influences fatty acid oxidation in rat heart: New anti-angina mechanism implication. *Biochemical Pharmacology*, 2009; 77: 1096-1104
- 34.) Yen GC, Hsieh CL: Inhibitory effects of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) against low-density lipoprotein oxidative modification. *Food Chemistry*, 2002; 77: 449-456
- 35.) Shi GF, An LJ, Jiang B, Guan S, Bao YM: Alpina protocatechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo. *Neuroscience Letters*, 2006; 403: 206-210
- 36.) Žibert M: Akutni učinki izvlečka navadne jelke (*Abies alba* Mill.) na ishemično/reperfuzijske okvare srca in sposobnost razširitve torakalne aorte pri podganah. *Diplomsko delo*, Ljubljana, 2013
- 37.) <http://www.enduranza.com/sl/enduranza-proti-izgorelosti/> (datum dostopa 5. 12. 2013)
- 38.) Zibadi S, Rohdewald PJ, Park D, Watson RR: Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol supplementation. *Nutrition Research*, 2008; 28: 315-320

- 39.) Shen M, Jia GL, Wang YM, Ma H: Cardioprotective effect of resveratrol pretreatment on myocardial ischemia- reperfusion induced injury in rats. *Vascular Pharmacology*, 2006; 45: 122-126
- 40.) Shigematsu S, Ishida S, Hara M, Takahashi N, Yoshimatsu H, Sakta T, Korthuis R: Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide- dependent inflammatory responses induced by ischemia/ reperfusion, platelet- activating factor, or oxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003; 34: 810-817
- 41.) Ray PS, Maulik G, Cordis G, Bertelli AE, Bertelli A, Das DK: The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999; 27: 160-169
- 42.) Yanagi S, Matsumura K, Marui A, et al: Oral pretreatment with a green tea polyphenol for cardioprotection against ischemia- reperfusion injury in an isolated rat heart model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2011; 141: 511-517