

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



ZALA VALENČIČ

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZALA VALENČIČ

**VPLIV IZBRANIH SNOVI IZ EKSTRAKTA LUBJA BELE JELKE NA  
ODZIVNOST HUMANIH MOŽGANSKIH ŽIL**

**THE INFLUENCE OF SELECTED SUBSTANCES FROM BARK EXTRACT OF  
SILVER FIR (*Abies alba*) ON RESPONSIVENESS OF HUMAN BRAIN VESSELS**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na katedri za farmakologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm., in somentorstvom viš. znanst. sod. dr. Gorazdom Drevenškom, uni. dipl. biol.

Za usmeritev in pomoč se iskreno zahvaljujem somentorju viš. znanst. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, uni. dipl. biol.

Izjava

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

Zala Valenčič

## KAZALO VSEBINE

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1 UVOD.....                                                       | 1  |
| 1.1 NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI.....                               | 1  |
| 1.1.1 Parkinsonova bolezen .....                                  | 1  |
| 1.1.2 Multipla skleroza .....                                     | 2  |
| 1.1.3 Alzheimerjeva bolezen.....                                  | 3  |
| 1.1.4 Shizofrenija.....                                           | 3  |
| 1.2 ZGRADBA MOŽGANSKE ŽILNE STENE.....                            | 4  |
| 1.3. ZGRADBA KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE.....                        | 4  |
| 1.4 MEHANIZEM KRČENJA IN SPROŠČANJA GLADKOMIŠIČNIH CELIC ŽIL..... | 6  |
| 1.5 VLOGA ŽILNEGA ENDOTELIJA.....                                 | 8  |
| 1.5.1 Disfunkcija endotelija .....                                | 10 |
| 1.6 POLIFENOLNE SPOJINE IN NJIHOV UČINEK NA ŽILJE.....            | 11 |
| 1.6.1 Polifenoli .....                                            | 13 |
| 1.6.2 Kavna kislina .....                                         | 14 |
| 1.6.3 Maltol .....                                                | 14 |
| 1.6.4 Klorogenska kislina.....                                    | 15 |
| 1.6.5 Gentizinska kislina .....                                   | 16 |
| 2 NAMEN DELA.....                                                 | 17 |
| 3 METODE.....                                                     | 17 |
| 3.1 PRIPRAVA MATIČNIH RAZTOPIN IZBRANIH SPOJIN.....               | 19 |
| 3.2 POSTOPEK IZOLACIJE ŽIL.....                                   | 20 |
| 3.2.1 Postopek izolacije podganjih torakalnih aort .....          | 20 |
| 3.2.2 Postopek izolacije človeških možganskih arterij .....       | 21 |
| 3.2.3 Naprava za poskuse na izoliranih žilah .....                | 21 |
| 3.3 POTEK DELA.....                                               | 22 |
| 3.3.1 Protokoli poskusov.....                                     | 23 |
| 3.3.2. Obdelava podatkov .....                                    | 26 |
| 4 REZULTATI.....                                                  | 28 |
| 4.1 KAVNA KISLINA.....                                            | 28 |
| 4.2 MALTOL.....                                                   | 30 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 4.3 KLOROGENSKA KISLINA..... | 32 |
| 4.4 GENTIZINSKA KISLINA..... | 34 |
| 5.1 KAVNA KISLINA.....       | 36 |
| 5.2 MALTOL.....              | 37 |
| 5.3 KLOROGENSKA KISLINA..... | 38 |
| 5.4 GENTIZINSKA KISLINA..... | 38 |
| 6 SKLEP .....                | 40 |
| 7 LITERATURA .....           | 41 |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Slika 1: Sonografija možganov .....</i>                                                                                                                                       | <i>2</i>  |
| <i>Slika 2: Zgradba hematoencefalne bariere .....</i>                                                                                                                            | <i>6</i>  |
| <i>Slika 3: Mehanizem krčenja in sprostitve gladkih mišic .....</i>                                                                                                              | <i>7</i>  |
| <i>Slika 4: Fiziološki učinki polifenolov na različna tkiva .....</i>                                                                                                            | <i>12</i> |
| <i>Slika 5: Preglednica vsebnosti flavonoidov v hrani.....</i>                                                                                                                   | <i>13</i> |
| <i>Slika 6: Molekulska struktura kavne kisline .....</i>                                                                                                                         | <i>14</i> |
| <i>Slika 7: Molekulska struktura maltola .....</i>                                                                                                                               | <i>15</i> |
| <i>Slika 8: Molekulska struktura klorogenske kisline .....</i>                                                                                                                   | <i>16</i> |
| <i>Slika 9: Molekulska struktura gentizinske kisline.....</i>                                                                                                                    | <i>17</i> |
| <i>Slika 10: Slika naprave za poskuse na izoliranih žilah .....</i>                                                                                                              | <i>22</i> |
| <i>Slika 11: Grafični prikaz začetnega dela poskusa na izoliranih podganjih torakalnih aortah (A) in na izoliranih človeških možganskih arterijah (B). .....</i>                 | <i>24</i> |
| <i>Slika 12: Protokol 1.....</i>                                                                                                                                                 | <i>25</i> |
| <i>Slika 13: Protokol 2.....</i>                                                                                                                                                 | <i>25</i> |
| <i>Slika 14: Protokol 3.....</i>                                                                                                                                                 | <i>26</i> |
| <i>Slika 15: Shematski prikaz vrednosti, ki smo jih uporabili za računanje po protokolih 1 in 3 (a) in po protokolu 2 (b). .....</i>                                             | <i>27</i> |
| <i>Slika 16: Grafični prikaz odziva podganjih in človeških ŽO, predhodno skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje kavne kisline .....</i>                                        | <i>29</i> |
| <i>Slika 17: Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih s kavno kislino in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh. ....</i>              | <i>29</i> |
| <i>Slika 18: Grafični prikaz akutnega odziva predhodno skrčenih podganjih in človeških ŽO na kumulativno dodajanje maltola.....</i>                                              | <i>30</i> |
| <i>Slika 19: Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih z maltolom in nato skrčenih s Phe. ....</i>                                                 | <i>31</i> |
| <i>Slika 20: Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih ali neinkubiranih z L-NNA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje maltola.....</i> | <i>32</i> |
| <i>Slika 21: Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje CGA.....</i>                                                   | <i>33</i> |
| <i>Slika 22: Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih s CGA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh.....</i>                         | <i>33</i> |

|                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Slika 23: Grafični prikaz odziva podganjih in človeških ŽO, predhodno skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje GA. ....</i>                          | <i>34</i> |
| <i>Slika 24: Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih z GA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh.....</i> | <i>35</i> |

## **SEZNAM KRATIC**

ACh - acetilholin

ATP - adenzin trifosfat

Bcl-xL - limfom velikih limfocitov B

BECF - možganska zunajcelična tekočina

CaM - kompleks  $\text{Ca}^{2+}$  kalmodulin

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CAPE - ester kavne kisline in 2-fenil etanola

CGA- klorogenska kislina

cGMP- ciklični gvanozin monofosfat

CNS - centralni živčni sistem

COMT - katehol-O-metiltransferaza

DG - diacilglicerol

ED1 - celični marker

EDCF – konstriksijski dejavnik endotelijskega izvora

EDFHs - hiperpolarizacijski dejavniki endotelijskega izvora

eNOS - konstitutivna endotelijska sintaza dušikovega oksida

FGF - fibroblastni rastni faktorji

GA - gentizinska kislina

GABA -  $\gamma$ -aminomaslena kislina

GMC - gladkomišična celica

GDP - gvaninski difosfat

GTP - gvaninski trifosfat

HEB - krvno-možganska pregrada

IL-2 - interleukin 2

iNOS - inducibilna sintaza dušikovega oksida



IP3 - inozitol trifosfat

ISM - Inštitut za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

JAM - celične adhezivne molekule

K-H - modificirana raztopina po Krebs-Henseleitu

L-NNA - *N* $\omega$ - nitro- L-arginin

LPS - lipopolisaharid

MCT - monokarboksilni maščobni prenašalec

MLC - lahka veriga miozina

MLCK - kinaze lahke verige miozina

MP - mirovni potencial

MS - multipla skleroza

MŽB - možganskožilne bolezni

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NB - nevrodegenerativna bolezen

NF- $\kappa$ B - jedrni faktor kapa B

nNOS - nevronalna sintaza dušikovega oksida

P1 - protokol 1

P2 - protokol 2

P3 - protokol 3

PAL - fenilalanin amino liaza

PBMC - periferne mononuklearne krvne celice

PEG - polietilenglikol

PGE - prostaglandin E2

PGI2 - prostaciklin I2

Phe - fenilefrin

PKC - protein kinaza C

PLGA - poli (mlečno glikolna) kislina

RGD - arginin glicin aspartat

ROS - reaktivne kisikove spojine

SEM - standardna napaka ocene aritmetične sredine

SSRI - selektivni zaviralec ponovnega privzema serotonina

SULTs - citosolna sulfontransferaza

TXA2 - tromboksan A2

UGTs - citosolni uridin 5-difosfo-glukuronoziltransferaza

VEGF - rastni dejavnik žilnega endotelija

ŽO - žilni obroček

ŽO človeka - izolirani žilni obročki humanih možganskih arterij

ŽO podgane - izolirani žilni obročki podganjih torakalnih aort

## POVZETEK

Nevrodegenerativne bolezni (NB) povezujejo s kroničnim možganskim vnetjem, okvarjeno avtoregulacijo pretoka krvi skozi možgane ter dušikovim in oksidativnim stresom. Zanje je značilna progresivna degeneracija nevronov, ki postopoma vodi v celično smrt. S pomočjo študij na ljudeh in živalih razvijajo nove in učinkovitejše postopke diagnostike in zdravljenja NB s ciljem upočasniti oziroma ustaviti njihovo napredovanje ali doseči njihovo zmanjšanje. Vendar možgansko-žilni sistem zaradi posebnosti v anatomske zgradbi, funkciji in selektivni prepustnosti, predstavlja izziv pri preučevanju svoje odzivnosti in pri načrtovanju razvoja novih zdravil. Namen diplomske naloge je ugotoviti učinke in mehanizem delovanja izbranih naravnih spojin (klorogenska kislina, maltol, kavna kislina in gentizinska kislina) iz izvlečka lubja bele jelke na izoliranih humanih možganskih žilah. Predvidevali smo, da je njihov učinek povezan z delovanjem v žilnem endoteliju, z zaviranjem nastajanja kisikovih radikalov in sinteze vazokonstriktorjev ter z aktivacijo NO sintaze.

Merili smo izometrično silo krčenja žilnih obročkov in preučevali akutni učinek spojin na s Phe predhodno skrčene žilne obročke (Protokol 1), akutne učinke Ach po inkubaciji s spojino (Protokol 2) in akutni učinek naraščajočih koncentracij spojin na predhodno skrčene žilne obročke po inkubaciji z vazokonstriktorjem L-NNA (Protokol 3). Rezultate smo statistično obdelali z dvofaktorsko analizo variance (dvosmerna ANOVA).

Odzive izoliranih humanih možganskih arterij smo primerjali s podganjimi torakalnimi aortami. Ugotovili smo, da so imele vse spojine vazodilatacijski učinek na človeške in podganje žilne obročke. Učinkovitost sproščanja spojin na človeških arterijah se je razlikovala od učinkovitosti na podganjih aortah. Relaksacijski učinek spojin na žilne obročke je bil posredovan preko endotelijskih mehanizmov.

Za učinkovite na izoliranih humanih možganskih arterijah so se izkazale naše izbrane spojine, ki bi lahko predstavljale potencialne nove spojine vodnice pri razvoju zdravil za bolezni možganov.

## **ABSTRACT**

Neurodegenerative diseases (NB) are associated with chronic cerebral inflammation, impaired autoregulation of blood flow through the brain and nitrogen and oxidative stresses. They are characterized by a progressive degeneration of neurons, which gradually leads to cell death. By present studies on humans and animals, new and more effective procedures for diagnosis and treatment of NBs have been developed, with the aim to slow down or stop their progression or to reduce them. However, the cerebral-vascular system, due to its specific anatomical structure, function and selective permeability, represents a challenge in studying its response and in designing new drugs. The purpose of this diploma thesis was to determine the effects and mechanism of action of selected natural compounds (chlorogenic acid, maltol, caffeic acid and gentisic acid) from the extract of the white fir tree bark on isolated human brain veins. It was assumed that their effect is connected with their functioning inside the vascular endothelium, by inhibiting the production of free oxygen radicals and the synthesis of vasoconstrictors and the activation of the NO synthase.

We measured the isometric contractile force of the vascular rings and studied the acute effect of compounds on the vascular rings that had been previously pre-contracted with phenylephrine (Protocol 1), the acute effects of acetylcholine after incubation with a compound (Protocol 2), and the acute effect of the increasing concentrations of compounds in the previously contracted vascular rings after incubation with vasoconstrictor L-NNA (Protocol 3). The results were statistically analyzed using a two-factor analysis of variance (two-way ANOVA).

The responses of human isolated cerebral arteries were compared with the thoracic aortas of rats. It was found that all the compounds had a vasodilatory effect on human and rat vascular rings. The efficiency of the release of the compounds on human arteries was different than the efficiency on the rat aortas. The relaxant effect of compounds on vascular rings was transmitted through the endothelial mechanisms.

Our tested compounds proved effective in response of human cerebral arteries and could represent a potential new lead compounds for the development of brain diseases' drugs.

## **1 UVOD**

Nevrodegenerativne bolezni (NB) postajajo vedno večji javnozdravstveni problem zaradi velikega porasta starejše populacije. Starost ostaja še vedno največji dejavnik tveganja za nastanek NB. Med temi motnjami največje breme predstavljajo demence, pri čemer Alzheimerjeva bolezen in sorodne bolezni prizadenejo okrog 7 milijonov ljudi v Evropi. Predvidevajo pa, da naj bi se število obolelih vsakih dvajset let podvojilo zaradi staranja prebivalstva. V Sloveniji demenca prizadene približno odstotek starih 60 ali več let, in 30-45 % oseb starih 85 ali več let. Vsem motnjam je skupno, da so progresivne, kronične, ni specifične terapije, značilne so patološke spremembe v specifičnih možganskih področjih in nevronske populacije in predstavljajo pomembno medicinsko, socialno in finančno breme zaradi visoke prevalence, morbiditete in mortalitete (zdravljenje bolnikov z demenco v Evropi trenutno stane okrog 130 milijard evrov letno). So eden izmed največjih zdravstvenih in družbenih izzivov današnjega časa, vendar klub vsemu ostaja še veliko možnosti izboljšav zdravljenja na tem področju (26).

### **1.1 NEURODEGENERATIVNE BOLEZNI**

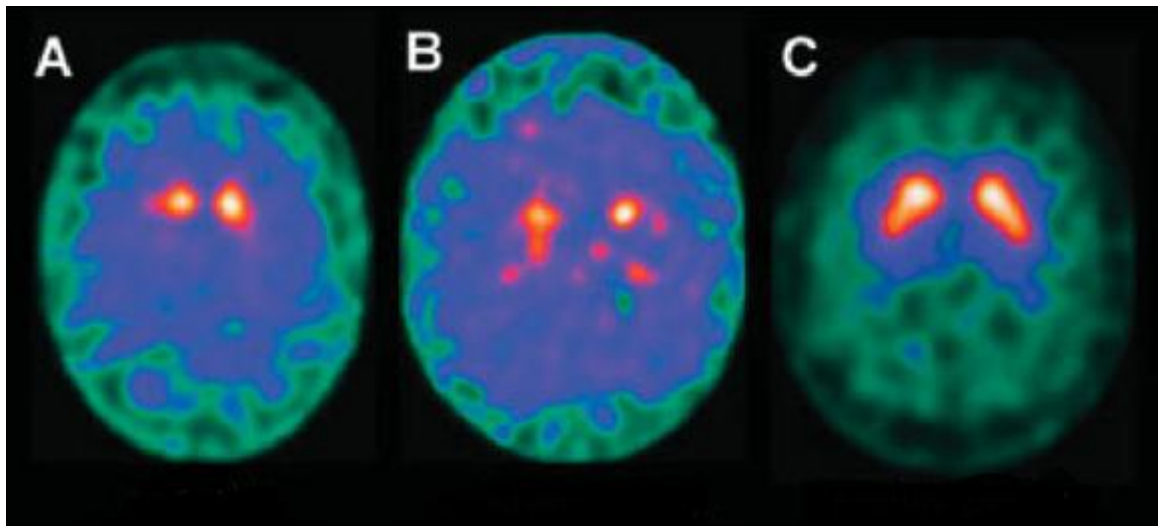
Pojem NB zajema širok spekter bolezenskih stanj živčevja, ki v prvi vrsti prizadenejo nevrone. Povzročijo njihovo degeneracijo in/ali celo odmiranje. Glede na mesto okvare se delijo na:

- degenerativna okvara možganske skorje: Alzheimerjeva, Pickova bolezen
- degenerativna okvara motoričnih nevronov: amiotrofična lateralna skleroza (ALS)
- degenerativna okvara bazalnih ganglijev: Parkinsonova bolezen, Huntingtonova horea
- degenerativna okvara več sistemov: shizofrenija, multipla skleroza

#### **1.1.1 Parkinsonova bolezen**

Parkinsonova bolezen je kronična in napredujoča bolezen, ki prizadene predvsem starejšo populacijo (pojavnost zelo naraste po 75. letu starosti). Vzrok njenega nastanka je slabo poznan (1). Razvoj bolezni je posledica pomanjkanja dopamina v striatumu (slika 1) zaradi degeneracije dopaminskih receptorjev v substanci nigri. Propadanje dopaminskih nevronov je pospešeno in znaki pomanjkanja dopamina se pokažejo šele, ko propade 70-80 % le-teh.

Simptomi, ki opredeljujejo to bolezen, so parkinsonska rigidnost, parkinsonski tremor (tresenje v mirovanju), akinezija (nezmožnost izvajanja hotenih gibov), posturalne motnje (motnje telesne drže) in bradikinezija (upočasnjeno izvajanje gibov).



**Slika 1:** Sonografija možganov

Rdeča barva označuje koncentracijo dopaminskega transportnega proteina v striatumu, ki pa z napredovanjem bolezni upada. A – možgani bolnika z zgodnjo obliko PB (trajanje bolezni poteka 1 leto), B – možgani bolnika z napredovano obliko PB (trajanje bolezni poteka 12 let) in C- možgani zdrave osebe. (Scherfler C., 2007, str. 1232)

Povezana je s progresivnim in relativno selektivnim propadanjem dopaminskih nigrostriatnih nevronov, ki povezujejo dve bazalni jedri, substanco nigro kompakto (SNc) in kaudatus-putamen (korpus striatum).

### 1.1.2 Multipla skleroza

Multipla skleroza je kronična avtoimuna bolezen, ki prizadene možgane in hrbtenjačo. Ob razvoju bolezni pride do uničenja ali zabrazgotinjenja mielinske ovojnice, ki je ovita okoli aksona. Mielinska ovojnica je zaščitna membrana, ki obdaja živčne celice, in ob njenem propadu se signali med živčnimi celicami upočasnijo ali ustavijo. Onemogočena je komunikacija med živčnimi celicami, kar se kaže s številnimi znaki in simptomi, ki vključujejo fizične in mentalne težave. Vzrok za nastanek multiple skleroze je slabo poznan. Poškodba živčnih celic je posledica vnetja, do katerega pride, ko telesu lastne imunske celice napadejo živčevje. Predvidevajo, da gre za spremenjen imunski odziv, ko imunske celice napadejo sestavine lastnega telesa, mielin. Poškodbe se lahko pojavijo na

katerem koli delu možganov, hrbtenjače in vidnega živca. Bolezen je pogosteje diagnosticirana pri ženskah med 20. in 50. letom starosti (7).

### **1.1.3 Alzheimerjeva bolezen**

Alzheimerjeva bolezen je oblika demence, ki povzroča probleme s spominom, mišljenjem in obnašanjem. Simptomi se razvijajo počasi, vendar napredujejo do stopnje, ko posamezniku onemogočijo opravljanje osnovnih dnevnih opravil (3). Prvi najbolj pogost simptom je izguba kratkotrajnega spomina. Z napredovanjem bolezni pa simptomi zajemajo še zmedenost, razdražljivost, agresijo, nihanje razpoloženja, dezorientiranost v času in prostoru, upad pozornosti, težave z govorjenjem in izgubo dolgotrajnega spomina. Postopoma pride do izgube gibalnih sposobnosti, kar na koncu vodi v smrt. Bolezen je povezana z nastankom amiloidnih plakov in nevrofibrilarnih pentelj, na katerih temelji potrditev diagnoze. Pri bolniku pride do atrofije možganskih vijug in zvečanja stranskih ventriklov. Pojavijo se amiloidne lehe in odmiranje nevronov v možganski skorji, čemur sledi pojavljanje nevrofibrilarnih pentelj (vlaknasti snopiči, sestavljeni iz čezmerno fosforiliranega proteina tau) v nevronih pomembnih nevrotransmitorskih sistemov. Ko omenjeni nevrotransmitorski sistemi propadejo, se v področjih, ki jih oživčujejo, zmanjša holinerški, noradrenerški in serotoninerški prenos. V hipokampusu pride do nevrodegenerativnih sprememb in znižanja holinerškega prenosa, kar vodi v motnje prehajanja kratkotrajnega v trajni spomin.

### **1.1.4 Shizofrenija**

Shizofrenija je nevrodegenerativna bolezen, za katero je značilna motnja mišljenja, hotenja in čustvovanja. Poznamo vsaj dva tipa bolezni, ki se med seboj prepletata, vendar v eni fazi prevladuje ali eden ali drugi. Za tip 1 so značilni pozitivni znaki in simptomi, ki vključujejo vsaj dve psihični motnji. Ti znaki so blodnje, halucinacije (vidne, slušne in taktilne) in motnje mišljenja. Oboleli je prepričani, da ga drugi preganjajo, mu sledijo, ga opazujejo in mu želijo škodovati, celo streči po življenju. Strahove vidi vsepovsod. Opazne so nenavadnosti v govoru in pisanju, misli so nejasne, celo nepovezane, težko jih razberemo in razumemo. Za tip 2 je značilna odsotnost pozitivnih znakov, prisotni pa so negativni znaki, kot so čustvena otopelost, plitvo mišljenje, zmanjšanje interesov in hotenja, vsebinsko obubožan govor, umik iz realnosti, telesna zanemarjenost, umik v notranji svet, intelektualni propad, nenormalni gibi... Ti vodijo v postopno propadanje

posameznikove osebnosti. Pri bolnikih pride do sprememb v možganskih predelih, ki so pomembni za mišljenje, spoznavne funkcije ter čustvovanje. Sočasno je okvarjeno delovanje številnih med seboj povezanih predelov. Pri bolnikih pride do stanjšanja sprednje čelne skorje, izgube piramidnih nevronov, tkivnih motenj, izgube inhibicijskih GABA-nergičnih nevronov, motnje migracije nevroblastov v embrionalnem razvoju možganov. Zmanjšana sta dopaminski prenos in koncentracija dopaminskih receptorjev D<sub>1</sub>. Hipokampus, katerega naloga je organiziranje prostorskih informacij, ima manjši volumen in pride do tkivnih sprememb. Striatum in wernickejevo področje, ki je pomembno za razumevanje govora in logično mišljenje, se zmanjšata. Vloga talamusa, ki selektivno prepušča senzorične prilive v možgansko skorjo in na ta način deluje kot filter, je okrnjena. Posledica je pretirana odprtost talamičnega filtra in s tem neselektivno prepuščanje senzoričnih informacij v možgansko skorjo. Zmanjšan je tudi njegov volumen.

## 1.2 ZGRADBA MOŽGANSKE ŽILNE STENE

Žilno steno možganskih žil (arterij in arteriol) sestavljajo od svetline proti zunanosti: tunika intima (zgrajena iz plasti endotelijskih celic), tunika medija (zgrajena iz mišičnih celic, elastičnih in kolagenskih vlaken) in tunika adventicija (zgrajena iz kolagenskih vlaken). Adventicija parenhimskih arteriol in kapilar vsebuje še pericite in končiče astrocitov. Tunika medija je od tunike intime ločena z notranjo elastično lamino (lat. lamina elastica interna). Od ostalih sistemskih arterij se možganske arterije razlikujejo po tem, da nimajo zunanje elastične lamine (lat. lamina elastica externa), imajo pa bolj razvito notranjo elastično lamino. Zaradi manjšega števila gladkomišičnih celic (GMC), manj razvite tunike adventicije in odsotnosti zunanje elastične lamine je posledično njihova stena tanjša. Poglavitna razlika med perifernim in možganskim žiljem je, da možgansko žilje obdaja krvno-možganska pregrada. Ta je sestavljena predvsem iz astrocitov, ki direktno preprečujejo prehajanje snovi med krvjo in možganskim tkivom (41).

## 1.3. ZGRADBA KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE

Krvno-možganska pregrada ali hematoencefalna pregrada (HEB) je visoko selektivno prepustna membrana, ki ločuje cirkulacijsko kri od možganske zunajcelične tekočine (BECF) v centralnem živčevju (CNS). Je posledica tesnih stikov med endotelijskimi celicami in centralnim živčnim sistemom. Tesne stike tvorijo endotelijske celice in astrociti, ki se povezujejo na stičišču krvi in možganovine. V osnovi jo sestavlja izjemna

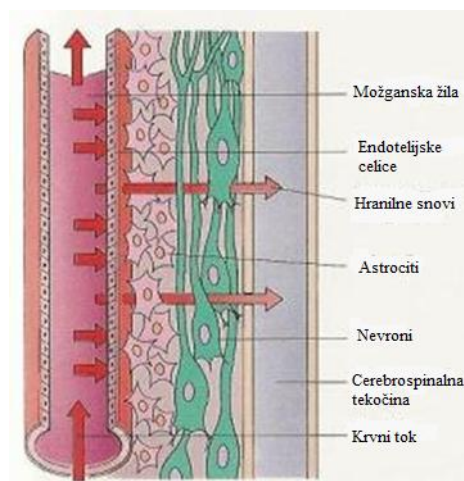


gostota celic, ki je nekajkrat večja kakor med endotelijskimi celicami drugod v telesu. Endotelijske celice krvno-možganske pregrade so obdane s podaljški astrocitov in na ta način pride do izmenjave snovi z živčnimi celicami (14).

Pregrada predstavlja odločujoč dejavnik prehajanja zdravil v možgane, saj omejuje transport v možgane na fizikalni (tesni stiki) in metabolni (encimi) način. Hkrati pa omogoča prehod snovem, ki so nujno potrebne za metabolno funkcijo živčnega tkiva (kisik). Pomembno vlogo ima pri varovanju možganov pred številnimi bakterijskimi infekcijami. Zaradi tega so bakterijske okužbe možganov redke. Izredna trdnost in tesnost pa predstavlja težave v primeru nekaterih zdravljenj, zato so okužbe možganov povezane z zelo resnimi in hkrati težko ozdravljivimi obolenji.

Problem pri diagnosticiranju in terapiji možganskih obolenj je slab prehod terapevtskih učinkovin. V ta namen so razvili različne dostavne sisteme za dostavo zadostne količine zdravilne učinkovine v možgane. Zelo obetaven vnos snovi skozi hematoencefalno pregrado predstavlja razvoj nanotehnologije.

HEB je zgrajena iz možganskih endotelijskih celic, astroglije, pericitov in perivaskularnih mastocitov. Plast možganskih endotelijskih celic je med seboj povezana s tesnimi in adherentnimi stiki. Tesni stiki opravljajo dve funkciji; preprečujejo prehod majhnim molekulam in ionom skozi medcelični prostor in jih tako prisilijo, da prehajajo skozi celico s pomočjo difuzije ali aktivnega transporta. Na ta način kontrolirajo vrsto in količino snovi, ki lahko prehajajo bariero. Preprečujejo gibanje membranskih proteinov (integrinov) preko celičnega stika (med apikalno in bazolateralno domeno), tako da vsak del membranske površine ohrani svojo funkcijo npr. receptorsko posredovana endocitoza na apikalni površini in eksocitoza na bazolateralni površini. V tesnih stikih se nahajajo trije integrini: okludin, klavdin in celične adhezivne molekule (JAM) (13). HEB ni samo mehanska pregrada, ampak tudi dinamična biološka enota, kjer poteka aktiven metabolizem in transport s pomočjo prenašalcev. Različna hranila, kot so glukoza, aminokisline in ketonska telesa, vstopijo v možgane s pomočjo specifičnih prenašalcev. Večje molekule, kot so nevrofili in citokini, pa vstopijo z receptorsko posredovano endocitozo. HEB onemogoča privzem v možgane večini zdravilnih učinkovin, z izjemo majhnih hidrofilnih spojin z maso, manjšo od 150 Da, in visoko hidrofobnih spojin z maso, manjšo od 400-600 Da, ki prečkajo membrano s pasivno difuzijo.



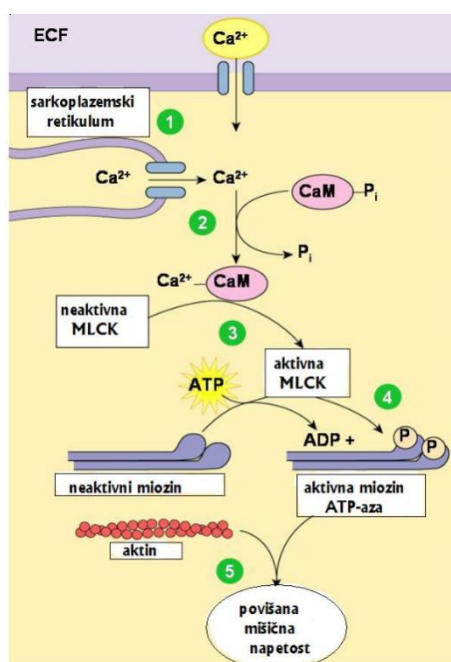
**Slika 2:** Zgradba hematoencefalne bariere  
(Darling D., 2009, str. 763).

Spojine, ki prehajajo membrano so opiat (morfin, metadon, meperidin), anksiolitiki (diazepam, temazepam), SSRI s (paroksetin) in antipsihotiki (klorpromazin, prometazin) (13).

#### 1.4 MEHANIZEM KRČENJA IN SPROŠČANJA GLADKOMIŠIČNIH CELIC ŽIL

Električni, kemični ali mehanski dražljaji so odgovorni za krčenje GMC žil. Ti povzročijo dvig znotrajcelične koncentracije kalcija. Do dviga kalcija v citosolu pride zaradi sprostitve  $\text{Ca}^{2+}$  iz ekstracelularnega prostora preko  $\text{Ca}^{2+}$  kanalov, kot tudi preko sprostitve kalcija iz znotrajceličnih zalog (sarkoplazemskega retikuluma). Kalcijevi ioni se vežejo na beljakovino kalmodulin, ki ima štiri vezavna mesta za kalcijeve ione. Nastali kompleks aktivira MLC kinazo, ki fosforilira lahke verige miozina ob porabi adenozintrifosfata (ATP) in omogoči stik miozina in aktina (3). Nastali stik povzroči vazokonstrikcijo. Vazodilatatorni in vazokonstriktorni mediatorji vplivajo na znotrajcelično koncentracijo kalcijevih ionov v GMC in tako uravnavajo njeno aktivnost. Vazokonstriktorji zvišajo koncentracijo kalcijevih ionov in omogočijo kaskado biokemijskih reakcij, ki privede do premikanja aktinskih in miozinskih filamentov in s tem do skrčitve GMC. Eden izmed mehanizmov, ki povzroči dvig znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ , je vezava agonista, (noradrenalina, angiotenzina II, endotelina..) na 7 TM receptor. Ta je sestavljen iz 7  $\alpha$ -heliksov in vezava liganda privede do konformacijske spremembe receptorja, kar omogoči aktivacijo trimerne G-proteina, sestavljenega iz  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$  podenote.  $\alpha$  in  $\gamma$  podenoti sta z membrano povezani preko kovalentno vezanih maščobnih kislin. V neaktivirani obliki je na G protein

oz. natančneje na  $\alpha$  podenoto vezan GDP. Po aktivaciji pride do zamenjave GDP-ja z GTP-jem, kar vodi do konformacijske spremembe, v kateri  $\alpha$  podenota disocira od  $\beta$  in  $\gamma$  podenote (34). Podenota  $\alpha$  aktivira fosfolipazo C, encim, odgovoren za cepitev, fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat v dva sekundarna prenašalca, inozitol trifosfat (IP3) in diacilglicerol (DG). IP3 se veže na receptorje na sarkoplazemskem retikulumu in povzroči sprostitvev  $\text{Ca}^{2+}$  v citosol celice. DG skupaj s  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira protein kinazo C (PKC), ki fosforilizira specifične tarčne proteine. V gladkih mišicah se nahaja več različnih izoencimov PKC, vsak s specifično tkivno vlogo (vaskularni, intestinalni, maternični..). PKC fosforilira L-tip  $\text{Ca}^{2+}$  kanalov (napetostno odvisni kanali) in ostale proteine, ki so odgovorni za tvorbo prečnih mostičkov med aktinom in miozinom (3).



**Slika 3:** Mehanizem krčenja in sprostitve gladkih mišic

1- povečana znotrajcelična koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$ , po vstopu  $\text{Ca}^{2+}$  iz zunajceličnega prostora in sprostitvi le-tega iz sarkoplazemskega retikuluma. 2 - vezava  $\text{Ca}^{2+}$  na kalmodulin (CaM). 3 - CaM aktivira kinazo miozinske lahke verige ( MLCK). 4 - MLCK fosforilira lahke verige v miozinskih glavah in poveča aktivnost miozin ATP-aze. 5 - aktiviran miozin drsi ob aktinu po mehanizmu drsečih filamentov in ustvarja kontrakcijo (Povzeto in prirejeno po Brooks and Cole, 2013, 37).

Za defosforilacijo MLC je odgovoren encim miozin fosfataza, ki je konstitutivno aktiven, zato je sproščanje GMC odvisno le od zmanjšane aktivnosti MLCK. Dejavnost MLCK je

odvisna od koncentracije kalcija v celici in od občutljivosti proteinov, vpletenih v fosforilacijo in defosforilacijo MLC. (32,33) Fosforilacija lahkih verig miozina je regulirana s strani MLC fosfataze, ki odstrani visoko energijske fosfate iz lahkih verig miozina in sproži relaksacijo GMC. Obstajajo tri podenote MLC fosfataze; 37 kDa velika katalitična podenota, 20 kDa velika variabilna podenota in 110-130 kDa velika miozin-vezajoča podenota. Ko pride do fosforilacije miozin-vezajoče podenote, ta inhibira encimsko aktivnost MLC fosfataze (3). Učinek vazodilatatorjev izzove izhajanje kalcijevih ionov iz GMC. To prekine delovanje aktinskih in miozinskih filamentov ter tako ustavi njeno krčenje (7). Relaksacija GMC je rezultat odsotnosti kontraktilnih stimulusov ali pa je posledica direktnega delovanja snovi, ki stimulirajo inhibicijo kontraktilnega mehanizma (npr. atrijski natriuretični dejavnik, ki je vazodilatator). Ne glede na vse, relaksacijski mehanizem zahteva znižano koncentracijo znotrajceličnega kalcija in povečano aktivnost MLC fosfataze. V znižanje znotrajcelične koncentracije kalcija sta vpletena sarkoplazemski retikulum in plazemska membrana. Oba vsebujeta  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ATP-azo, ki odstranjuje kalcij iz citosola. Na plazemski membrani pa se nahaja še  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmenjevalec, ki pripomore k zmanjšanju znotrajceličnega kalcija. Med relaksacijo pride do zaprtja napetostno in receptorsko odvisnih kalcijevih kanalčkov zaradi zmanjšane vstopa kalcija v celico.

## 1.5 VLOGA ŽILNEGA ENDOTELIJA

Posebnost odziva možganskih arterij je t. i. stalna intrinzična avtoregulacija pretoka, ki ščiti možgane pred hitrimi nihanji krvnega tlaka (15). Ob povišanem pritisku znotraj žilne svetline pride do krčenja žile, ob zmanjšanem pa do sprostitve – tako se ohranja stalen pretok (60–160 mm Hg) ob fiziološkem nihanju tlaka (16).

Pri možganskih arterijah so pomemben dejavnik odziva žil tudi astrociti. Arterije znotraj dure so obdane z likvorjem in širokimi perivaskularnimi prostori ter pokrite s podaljški specializiranih astrocitov, ki prek nevrohumoralnih dejavnikov sodelujejo pri uravnavanju žilnega tonusa in prepustnosti endotelija.

Odziv možganskih arterij na mediatorje, ki sproščajo ali krčijo žile ni linearen, temveč ritmično oscilira (20). Impulzi izvirajo iz GMC ali endotelija, neodvisno od dihanja, ritma srca, oživčenja (20). Temu ritmičnemu spreminjanju žilnega tonusa ali premera pravimo

vazomocija. Opisana je tudi pri človeških koronarnih arterijah, kjer je ritem hitrejši in vezan na frekvenco krčenja srca (20). Vazomocija bi lahko predstavljala obrambo tkiva pred ishemijo, saj je ob vazomotornem odzivu pretok skozi žilo večji, po drugi strani pa naj bi bil vazomotoren odziv povečan pri nekaterih bolezenskih stanjih (npr. diabetes, arterijska hipertenzija) (20). Ključni dejavnik pri uravnavanju žilnega tonusa je endotelij, ki tvori in izloča tako dejavnike sproščanja kot krčenja. V fizioloških razmerah se odziva na hemodinamske (npr. strižne sile) in humoralne spremembe (npr. spremembe v parcialnem tlaku  $O_2$  in pH) s sproščanjem številnih snovi, ki povzročajo skrčitev ali sprostitvev gladkomišičnih celic (GMC). Endotelij tako uravnava upornost žil in s tem vpliva na krvni tlak in pretok skozi tkivo. Endotelijske celice izločajo številne vazokonstriktorje, npr. endoteline, angiotenzin II, superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), vmesne produkte prostaglandinov (PGG2 in PGH2), krčivni dejavnik endotelijskega izvora in tromboksan  $A_2$ . Od endotelija odvisni dejavniki, ki povzročajo sprostitvev GMC, so dušikov oksid (NO), ogljikov monoksid (CO), prostaciklin (PGI2), prostaglandin E2 (PGE2), C-natriuretični peptid (vazodilatator, ki poveča koncentracijo cikličnega gvanozin monofosfata, cGMP), adrenomedulin (vazodilatator, ki poveča koncentracijo cikličnega adenozin monofosfata, cAMP), endokanabinoidi in skupina neznanih snovi, ki jih označujemo s skupnim imenom hiperpolarizacijski dejavniki endotelijskega izvora (ang. Endothelium derived hyperpolarizing factors, EDHFs). Preko povečanja sproščanja NO iz endotelijskih celic na sproščanje GMC vplivajo tudi ACh preko muskarinskih  $M_3$  receptorjev na membrani endotelijskih celic, substanca P, bradikinin in histamin. NO nastaja iz L-arginina v reakciji, ki jo katalizira encim NO-sintaza (NOS). Opisane so tri oblike NOS: endotelijska NOS (eNOS ali NOS III), nevronska NOS (nNOS ali NOS I) in inducibilna NOS (iNOS ali NOS II), ki je prisotna v endotelijskih celicah in gladkih mišičnih celicah. Ekspresija iNOS močno naraste pri patoloških stanjih. V žilni steni lahko najdemo vse tri oblike NOS, vendar ima glavno vlogo pri uravnavanju žilnega tonusa eNOS. Ta predstavlja osrednjo izomerno obliko NOS – je konstitutiven encim, ki tvori NO v običajnih fizioloških pogojih (10). Endotelijske celice sproščajo NO v špranjo med endotelijem in GMC, od koder NO difundira v GMC, kjer aktivira od hema odvisno topno gvanilatno ciklazo, ki prek zvišanja koncentracije cGMP vodi do sprostitvev GMC (11). Prek cGMP poti deluje tudi CO. Kadar je sinteza NO motena, se poveča vpliv iz endotelija izločenega EDHF na sproščanje žil. EDHF deluje preko aktivacije za kalij občutljivih kalcijevih kanalčkov na membrani GMC (11). Prostaglandina PGE2 in PGI2 sproščata

gladko mišično celico preko aktivacije adenilat-ciklaze in posledičnim dvigom koncentracije cAMP. Povišana raven cAMP aktivira fosfokinazo A, kar zmanjša delovanje aktinskih in miozinskih filamentov. Predvidevajo, da povečan krvni pretok, ki v fizioloških razmerah poveča strižne sile na endoteliju, sproži sintezo PGE<sub>2</sub> in PGI<sub>2</sub>. Hiperpolarizirajoči dejavnik endotelijskega izvora (EDHF) predstavlja proces, ki povzroči hiperpolarizacijo gladkomišičnih celic žile preko aktivacije od kalcija odvisnih K<sup>+</sup> kanalov ali napetostno odvisnih K<sup>+</sup> kanalov, kar privede do sprostitve žile (3). Ob dodatku vazodilatornih snovi (npr. ACh, bradikina) omogoča sprostitvev GMC tudi, kadar je encim NOS zavrt. Od endotelija odvisni dejavniki, ki povzročajo krčenje GMC, so endotelin-1 (ET-1) (preko endotelijskih receptorjev tipa A) in presnovki arahidonske kisline (npr. tromboksan A<sub>2</sub>, prostaglandin F<sub>2</sub>α). Angiotenzin II povzroča krčenje prek spodbujanja tvorbe ET-1 in prek receptorjev za angiotenzin na membrani GMC. Pomemben vpliv na žilni tonus, ki ga nadzoruje endotelij, imajo tudi reaktivne kisikove spojine (angl. reactive oxygen species, ROS) (1). Superoksidni anion, vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in hidroksilni radikal v nizkih koncentracijah in peroksinitrit v visoki koncentraciji povzročajo sprostitvev GMC. Superoksidni anion v visoki in peroksinitrit v nizki koncentraciji povzročita krčenje. Pri tvorbi ROS v endotelijskih celicah so vpleteni encimi nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza, ksantin oksidaza in lipooksigenaze (LOX) (11).

### **1.5.1 Disfunkcija endotelija**

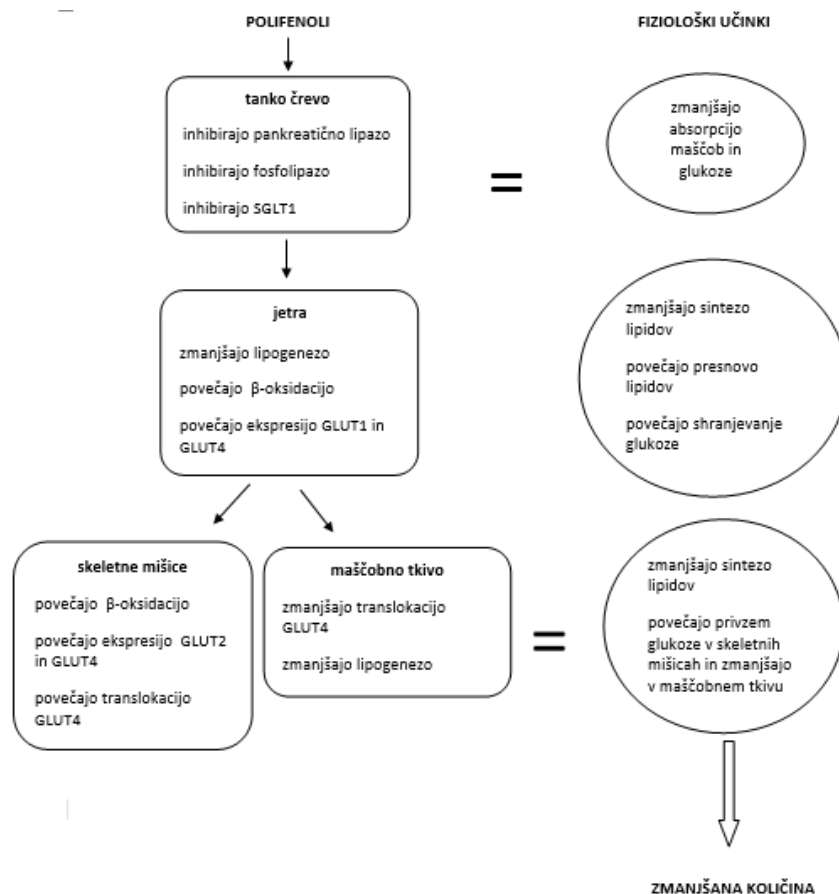
Okrnjeno delovanje endotelija je patofiziološki proces, ki se prične ob staranju organizma in s tem tudi žil, začetek in napredovanje procesa pospešijo dejavniki tveganja za srčno žilne bolezni (kajenje, hipertenzija, sladkorna bolezen...) (21). Pri uravnavanju tonusa žilne stene, pretoka krvi in delovanja trombocitov imajo poglavitno vlogo endotelijske celice. Disfunkcija le-teh predstavlja motnjo v delovanju endotelija, ki privede do porušenega ravnovesja med vazodilatacijskim in vazokonstriktornim delovanjem (13). Najzgodnejša motnja v delovanju endotelija je nesposobnost razširitve žile in povečanja pretoka v njej po fizioloških ali farmakoloških dražljajih (14). Kaže se zlasti z motenim od endotelija odvisnim sproščanjem žil zaradi zmanjšane tvorbe NO prek zmanjšane izražanja eNOS. Manjši vpliv ima povečano izločanje od endotelija odvisnih snovi, ki žile krčijo (npr. angiotenzin II in ET-1), ter povečana tvorba ROS znotraj endotelijskih celic (14, 22). Okrnjeno delovanje endotelija se pokaže kot zmanjšana sposobnost krčenja žile in posledično pride tudi do oslabitve avtoregulacije pretoka skozi možgane. Poruši se

ravnovesje med snovmi, ki žilo sproščajo oz. krčijo in se prevesi v smer nastajanja tistih, ki žilo krčijo. Poveča se prepustnost endotelija, pride do agregacije trombocitov, adhezije levkocitov in nastanka vnetnih citokinov, kar vse skupaj spodbuja napredovanje procesa ateroskleroze. Dandanes se vse več ljudi zateka k zdravljenju z naravnimi zdravili, ki v mnogih primerih kažejo obetajoče rezultate. V novejši študiji, opravljeni pod okriljem azijskih raziskovalcev, so ugotovili da ikarin - glavni flavonoid v kitajski rastlini *Epimedium brevicornum*, zmanjša raven A $\beta$  (beta amiloida) in ekspresijo amiloidnega prekursorskega proteina (APP) v podganjem hipokampusu, kar ugodno vpliva na zdravljenje Alzheimerjeve bolezni. Raziskava skupine tajvanskih znanstvenikov je pokazala, da flavonoid luteolin deluje protivnetno in nevroprotektivno tako, da zavira vnetno signalno pot v podganji mikrogliji preko inhibicije delovanja NF- $\kappa$ B, STAT1 in IRF-1 (31).

## 1.6 POLIFENOLNE SPOJINE IN NJIHOV UČINEK NA ŽILJE

Polifenolne spojine so v naravi zelo razširjene. Nahajajo se v sadju, zelenjavi, kakavu in v pijačah, kot sta rdeče vino in čaj. Številne raziskave so pokazale pozitiven učinek uživanja hrane, bogate s polifenolnimi spojinami, na srčnožilni sistem (21). Njihov učinek je odvisen od dnevnega vnosa in biološke uporabnosti. Polifenoli prehajajo črevesno pregrado in dosežejo sistemski krvni obtok v koncentracijah, ki v *in vitro* študijah kažejo farmakološke učinke (16). Zaščitni učinki, preko katerih naj bi polifenolne spojine delovale, vključujejo preprečevanje nastajanja prostih kisikovih radikalov, spodbujajo nastanek vazorelaksacijskih mediatorjev, kot so NO, EDHF in prostaciklin, ter zavirajo nastanek vazokonstriktorjev, npr. endotelina-1 v endotelijskih celicah.

S poskusi na izoliranih arterijah so pokazali, da nekateri polifenoli povzročijo od endotelija odvisno relaksacijo žil in povečajo sintezo eNOS. S polifenoli inducirana relaksacija arterij naj bi vključevala tudi aktivacijo preko EDHF. Sadje in pijače, kot sta npr. vino in čaj, predstavljajo glavni vir polifenolov. Posamezni polifenoli kot je kvercetin, se nahajajo v večini rastlinskih izdelkov (sadju, zelenjavi, kosmičih, stročnicah, sadnih sokovih, čaju, vinu..), medtem ko so nekateri specifični za točno določeno hrano (flavanoni so v citrusih, izoflavoni v soji). V posamezni hrani najdemo različne vrste polifenolov, nikoli ni zastopana samo ena vrsta. Na vsebnost polifenolov v rastlinah vplivajo okoljski dejavniki, ki se delijo na pedološke (tip zemlje, na kateri rastlina raste), klimatske (izpostavljenost soncu, količina padavin) in pogoje pridelave (rastlinjaki, polja, hidroponično kmetijstvo).

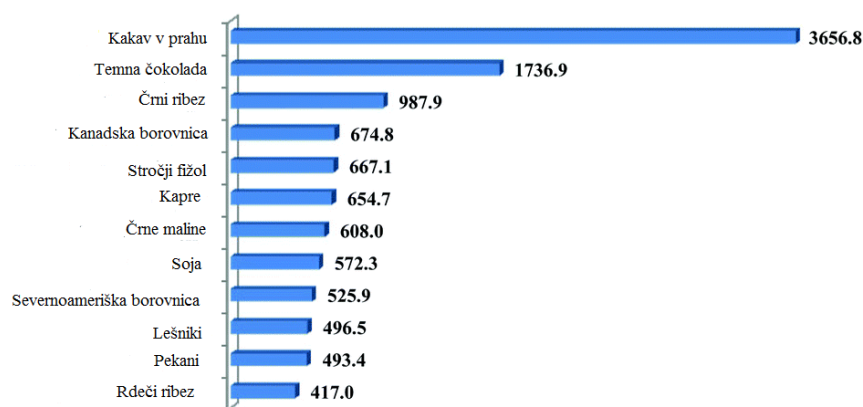


**Slika 4:** Fiziološki učinki polifenolov na različna tkiva

Pomemben dejavnik je tudi stopnja zrelosti, ki vpliva na koncentracijo in delež različnih polifenolov. Shranjevanje in priprava zelenjave in sadja vpliva tudi na delež polifenolov, predvsem tistih, ki hitro oksidirajo. Način oz. kuharska metoda priprave hrane ima pomemben vpliv na vnos učinkovin. Že s samim lupljenjem in kuhanjem sadja in zelenjave velik delež polifenolov izgubimo (29).

Celotni dnevni vnos polifenolov znaša približno 1g/dan. Vrsta in količina zaužitega polifenola je odvisna od prehranjevalnih navad posameznika in države, v kateri se nahaja. V Španiji je bilo ocenjeno, da celoten vnos katehinov in proantocianidnih dimerov in trimerov znaša 18-31 mg/dan zaradi velikega vnosa jabolk, hrušk, grozdja in rdečega vina (29).





**Slika 5:** Preglednica vsebnosti flavonoidov v hrani  
(mg flavonoidov na 100g hrane).  
(Valdes L., 2015, str. 2429)

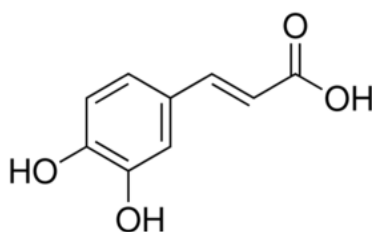
### 1.6.1 Polifenoli

Delijo se v pet skupin: flavonoidi (flavonoli, flavononoli, flavan-3-oli, izoflavoni in antocianidini), fenolne kisline (hidroksibenzojska kislina, hidroksicimetna kislina), fenolni alkoholi, stilbeni in lignani. Ključni intermediat pri biosintezi polifenolov je hidroksicimetna kislina. Ta nastane iz šikimske kisline, ki je skupni prekursor številnih alkaloidov, aromatičnih aminokislin in indolnih derivatov. Šikimska kislina se sintetizira iz eritroze-4-fosfata in fosfoenolpiruvata. Sledi pretvorba v aminokislino fenilalanin po šikimski poti. Nato encim fenilalanin-amino liaza (PAL) katalizira nastanek cimetne kisline, iz katere se sintetizira večina fenolnih spojin (16).

Polifenoli so kemijsko zelo heterogena skupina. Na splošno velja, da se slabo absorbirajo v črevesju, hitro metabolizirajo v jetrih in hitro izločijo iz telesa. V hrani se nahajajo v obliki estrov, glikozidov ali vezani na polimere. Za uspešno absorpcijo mora poteci razgradnja oz. hidroliza le-teh, da nastanejo prosti polifenoli. Razgradnja poteka s pomočjo črevesnih encimov ali s črevesnimi bakterijami. V nekaterih primerih črevesne bakterije ne samo razgradijo, ampak tudi metabolizirajo polifenole in s tem zmanjšajo delež celokupne absorpcije. Sočasno z absorpcijo potekajo v tankem črevesju reakcije metabolizma. Absorpciji sledi metabolizem v jetrih, kjer potekajo večinoma reakcije metilacije, konjugacije z glukuronsko kislino in s sulfatom. V krvi jih najdemo največkrat vezane na albumine. Eliminacija poteka preko urina ali žolča. Vrsta poti je odvisna od njihove molekulske mase. Polifenoli z veliko molekulsko maso se večinoma izločijo preko žolča, manjši pa preko urina.

### 1.6.2 Kavna kislina

Spada med fenolne spojine in ima sposobnost vezave prostih radikalov, kar pomeni, da ima antioksidativne lastnosti. Čista kavna kislina je rjavkast prah. Nahaja se v kavi, arganovem olju, propolisu, sadju, zelenjavi in ostalih rastlinah (arniki, ameriškem slamniku, nepozebniku, sončničnih semenih, timijanu, pehtranu, listu oljke, lubju evkaliptusa, ječmenovih zrnih). Deluje protimikrobno proti bakteriji *Escherichia coli*, protivirusno in antimikotično. Število in mesto hidroksilnih skupin, vezanih na benzenov obroč, vpliva na toksičnost do določenega mikroorganizma. Večja hidroksilacija pomeni večjo toksičnost (15,16). Ima tudi protivnetno in antibiotično delovanje (inhibira dihidrofolat reduktazo). Ester kavne kisline in 2-fenil etanola (CAPE) ima sposobnost ublažiti sekundarne poškodbe po možganski kapi. V študiji so na podganjem modelu, pri katerem so izzvali žariščno ishemijo v centralnem delu možganov, ugotovili, da je nevroprotektiven učinek CAPE-ja odvisen od odmerka (1-10mg/kg telesne teže) in da ima dolg razpolovni čas, saj se na mestu delovanja zadržuje 18 ur. Po aplikaciji CAPE se je zvišala koncentracija NO in glutationa, zmanjšala pa lipidna peroksidacija in koncentracija nitrotirozina. Okrepil se je tudi možganski krvni obtok. Vpliva tudi na zmanjšano izražanje faktorja NF-κB, ki je odgovoren za vnetne procese (zviša koncentracijo adhezijskih molekul, citokinov in NO-sintaze). Protivnetno delovanje se kaže tudi z zmanjšano ekspresijo ED1 (celični marker aktivacije mikroglije, makrofagov in monocitov). Inhibira apoptozo z zmanjšanjem izražanja kapsaze 3 in zvečanjem antiapoptotičnega proteina Bcl-xL. (16). Absorbira se s paraceluralno difuzijo skozi enterocite v črevesju. V krvi jo najdemo v nespremenjeni obliki po čemer sklepamo, da se izogne učinku prvega prehoda (27).

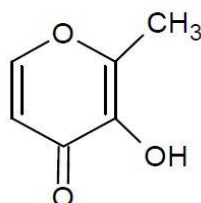


**Slika 6:** Molekulska struktura kavne kisline

### 1.6.3 Maltol

Maltol je naravno prisotna organska spojina, ki se primarno uporablja kot ojačevalec okusa. Najdemo ga v lubju macesna, borovih iglicah in praženem sladu. Je bel kristaliničen

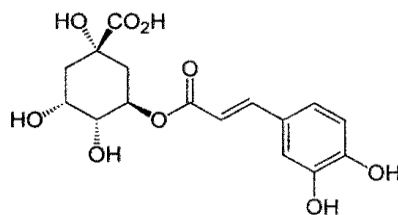
prah, topen v vroči vodi, kloroformu in ostalih organskih topilih. Zaradi vonja po sladkorni peni in karameli dodan k hrani poudari njeno sladkobo in ima vonj po svežem pecivu ter karameli (15). Z visoko selektivnostjo in afiniteto tvori kelate s kovinskimi ioni  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  in  $\text{VO}^{2+}$ . V telesu poveča privzem aluminija, biološko uporabnost galija in železa. V študiji na podganjem modelu je maltol povečal nevrotoksičnost aluminija. Izkazal se je kot močen ojačevalec kopičenja aluminija v serumu, možganih in kosteh (18).



**Slika 7:** Molekulska struktura maltola

#### 1.6.4 Klorogenska kislina

Klorogenska kislina (CGA) je naravna spojina, ki je ester med kavno in kininsko kislino. Je pomemben člen pri biosintezi lignina. Nahaja se v bambusu vrste *Phyllostachys edulis* in številnih drugih rastlinah. Je ena glavnih fenolnih komponent v breskvah, slivah in kavnih zrnih zelene kave. V telesu po obroku upočasni sprostitvev glukoze v krvni obtok. Na trgu jo kot standardiziran ekstrakt zelene kave najdemo pod trgovskim imenom Svetol®. Uporablja se kot aditiv h kavnim izdelkom, žvečilnim gumijem in kot samostojen izdelek. Ima protivnetne učinke. Študija je pokazala, da CGA značilno zavre produkcijo NO in sprostitvev TNF- $\alpha$  iz lipopolisaharida (LPS) stimulirane mikroglije. Zmanjša LPS stimulirano fosforilacijo, razgradnjo zaviralnega dejavnika kapa B-alfa ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ) in preprečuje translokacijo nuklearnega faktorja kapa B (NF- $\kappa\text{B}$ ). Preprečuje nevrotoksičnost, povzročeno z aktivacijo mikroglije, in izboljša preživetje dopaminergičnih nevronov. *In vivo* študija je pokazala, da preventivno zdravljenje s CGA oslabi sprostitvev LPS, IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  v substanci nigri ter inhibira aktivacijo mikroglije. Zaradi teh učinkov ima potencialno nevroprotektiven učinek pri nevrodegenerativnih boleznih, pri katerih igrajo osrednjo vlogo proinflammatory dejavniki (19). Dobro je topna v etanolu in acetonu. Ima dve izomerni obliki, kriptoklorogensko in neoklorogensko kislino. Izomera z dvema kavnim kislinama pa se imenuje izoklorogenska kislina. To najdemo v kavi.



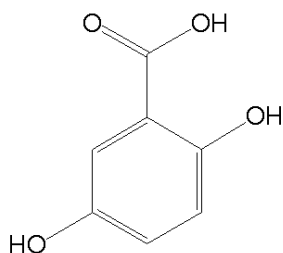
**Slika 8:** Molekulska struktura klorogenske kisline

### 1.6.5 Gentizinska kislina

Gentizinska kislina (GA) je dihidroksibenzojska kislina. Je derivat benzojske kisline in eden od metabolitov pri razgradnji acetilsalicilne kisline. Ima protivnetne, antirevmatične in antioksidativne lastnosti. Nastane kot stranski produkt pri metabolizmu aminokisline tirozina in benzoata (20).

Nahaja se v listih afriškega drevesa *Alchornea cordifolia*, v vinu in korenini rumenega svišča. GA v ekstraktu korenine rumenega svišča se že stoletja uporablja kot antiflogistik (21). Topna je v alkoholu in etru. Temperatura tališča je od 200-205 °C (22). V *in vivo* študiji so ugotovili, da GA inhibira fibroblastne rastne faktorje (FGF). Ti so v normalnih razmerah pritrjeni na zunajcelični matriks. Pri patologiji številnih bolezni pa pride do njihove nebrzdane akumulacije v zunajcelično območje zaradi nekontrolirane sinteze /sprostitve. FGF spodbujajo tumorsko resistenco na kemoterapevtike in sevanje. Vpleteni so v nastanek patoloških angiogenz in s tem posledično v nastanek in pospešitev številnih bolezni, vključno z rakom. V terapevtskem pogledu so torej snovi, ki nevtralizirajo nepravilno mobilizirane fibroblastne rastne faktorje, med katere kot močan inhibitor spada GA (24).

Koncentracijsko odvisno inhibira oksidacijo LDL. V plazmi značilno inhibira nastanek holesterolnega estra hidroperoksida ter ima močno antioksidativno aktivnost. K močnemu antioksidativnemu učinku delno prispeva tudi anti-trombotični učinek acetilsalicilne kisline (23). V *in vitro* študiji na podganjih možganih so prišli do spoznanja, da GA inhibira možgansko glikolizo. V visokih koncentracijah v možganih inhibira aerobno mitohondrijsko dihanje (24).



**Slika 9:** Molekulska struktura gentizinske kisline

## **2 NAMEN DELA**

Namen diplomske naloge bo določiti učinke in mehanizem delovanja izbranih naravnih spojin (maltol, kavna kislina, gentizinska kislina in klorogenska kislina), ki se nahajajo v izvlečku lubja bele jelke, na izoliranih humanih možganskih žilah in jih primerjati z učinki teh snovi na podganjih aortah. Humane možganske arterije bomo pridobili med obdukcijo, 24 ur *post mortem*. S pomočjo naprave za delo z izoliranimi žilami bomo merili izometrično silo krčenja žilnih obročkov in preučevali akutni učinek spojin na s Phe predhodno skrčene žilne obročke (Protokol 1), akutne učinke Ach po inkubaciji z eno od izbranih spojin (Protokol 2) in akutni učinek naraščajočih koncentracij spojin na predhodno skrčene žilne obročke po inkubaciji z L-NNA (Protokol 3). Rezultate bomo statistično obdelali z dvofaktorsko analizo variance (dvosmerna ANOVA).

Predvidevali bomo, da je njihov učinek povezan z delovanjem v žilnem endoteliju z zaviranjem nastajanja kisikovih radikalov in zaviranjem sinteze vazokonstriktorjev ter z aktivacijo NO sintaze.

## **3 METODE**

Reagenti in raztopine, ki smo jih uporabili pri poskusih na izoliranih žilnih obročkih:

- Modificirana raztopina po Krebs-Henseleitu (K-H raztopina), ki je sestavljena iz;
  - 118 mM NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA),
  - 4,7 mM KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija),
  - 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija),
  - 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
  - 25 mM NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija),
  - 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška) in

- 11 mM glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška).
- Raztopina za delo na mikrožilah, ki vsebuje:
  - 119 mM NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA),
  - 4,7 mM KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija),
  - 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija),
  - 25 mM NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija),
  - 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
  - 5,5 mM glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
  - 0,027 mM etilendiamintetraoetne kisline (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA),
  - 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška ).
- Acetilholin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA; M=181,7 g/mol); vazorelaksant s koncentracijo matične raztopine 10mM .
- Fenilefrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA; M=167,2 g/mol); vazokonstriktor s koncentracijo matične raztopine 10mM .
- Kalijev klorid (KCl) (Merck, Darmstadt, Nemčija; M=74,56 g/mol); vazokonstriktor s koncentracijo matične raztopine 3 M.
- Karbogen (plinska mešanica sestavljena iz 95 % O<sub>2</sub> in 5 % CO<sub>2</sub>; Messer Slovenija d.o.o, Ruše, Slovenija)
- N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginin (L-NNA) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija); selektivni inhibitor sintaze dušikovega oksida (NOS), s koncentracijo matične raztopine 0,012 M.
- Ogljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) (Messer, Ruše, Slovenija); plinska mešanica, sestavljena iz 75 % CO<sub>2</sub> in 25 % N<sub>2</sub>, ki smo jo uporabili za evtanazijo podgan.

Matične raztopine sem pripravila v prečiščeni deionizirani vodi in jih redčila do ustreznih koncentracij.

Aparature, oprema in pribor:

Reagente in preiskovane vzorce sem shranjevala v:

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

- zamrzovalnik, -20 °C Gorenje (Velenje, Slovenija)

Za tehtanje in raztapljanje sem uporabila;

- analizna tehtnica KERN ALS 120-4, Kern&Sohn GmbH (Balingen, Nemčija)
- analizna tehtnica Sartorius BL210S, Sartorius AG (Goettingen, Nemčija)
- naprava za očiščeno deionizirano vodo USF Maxima (ELGA, Durham, Velika Britanija),
- polavtomatske pipete Eppendorf Research 200  $\mu$ l in Eppendorf Reference 2500  $\mu$ l (Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija),
- ultrazvočna kadička SONIS 2 GT (Iskra PIO, d.o.o., Šentjernej, Slovenija),
- merilne valje, čaše, bučke ( velikosti od 5 mL-100 mL) in steklene palčke.

Za izolacijo podganjih torakalnih žil sem uporabila:

- petrijevko,
- 20 mL čašo,
- škarje,
- pinceto,
- skalpel,
- povečevalno steklo.

### 3.1 PRIPRAVA MATIČNIH RAZTOPIN IZBRANIH SPOJIN

Vse spojine smo pripravili v matični raztopini koncentracije 10 mM. Ostale koncentracije spojin (0,001  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) smo dobili z redčenjem matične spojine s prečiščeno deionizirano vodo.

Uporabili smo:

- maltol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; M=126,11 g/mol),
- klorogensko kislino (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; M=354,31 g/mol),
- kavno kislino (Merck-Schuchardt, München, Nemčija; M=180,16 g/mol),

- gentizinsko kislino (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; M=154,12 g/mol)

CGA in kavna kislina sta topni v dimetilsulfoksidu (DMSO). Spojine smo zatehtali, jih raztopili v minimalni količini topila in nato dodali prečiščeno deionizirano vodo do koncentracije matične spojine.

GA je topna v vodi. Spojino smo zatehtali in raztopili v prečiščeni deionizirani vodi.

Maltol je topen v DMSO in etanolu. Po zatehtanju smo ga raztopili v minimalni količini DMSO-ja in ga nato do koncentracije matične spojine redčili s prečiščeno deionizirano vodo.

Pripravili smo tudi razredčitve vseh devetih preiskovanih spojin, in sicer koncentracije 1 mmol/l, 0,1 mmol/l, 10  $\mu$ mol/l, 1  $\mu$ mol/l in 0,1  $\mu$ mol/l.

Pri pripravi redčitev smo za raztapljanje uporabili 70 % etanol (Pharmachem d.o.o., Ljubljana, Slovenija), DMSO (Merck, Darmstadt, Nemčija) in deionizirano očiščeno vodo.

### 3.2 POSTOPEK IZOLACIJE ŽIL

#### 3.2.1 Postopek izolacije podganjih torakalnih aort

Za poskuse na živalih smo pridobili dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije št. 34401-14/2011/12 s prigrasitvijo evtanazije z dne 21. 02. 2012. Za poskuse smo uporabili podgane linije Wistar, vzrejene na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Tehtale so 190–340 g, stare so bile 3–6 mesecev. Uporabili smo 13 samčkov in 5 samičk. Živali so bile hranjene s standardnimi briketi za podgane (Altromin 1324, Lage, Nemčija). Vseskozi so imele na razpolago vodo, dnevno nočni ritem je bil ustvarjen z menjavanjem svetlobe in teme vsakih 12 ur. Temperatura okolja, v katerem so bivale, je bila stalna ( $24 \pm 1$  °C). Poskuse smo opravljali med 8.00 in 20.00 od 20. junija do 15. avgusta 2013. Vsako spojino smo pri vsakem protokolu preizkusili na 5–6 žilnih obročkih (ŽO) 2–3 podgan.



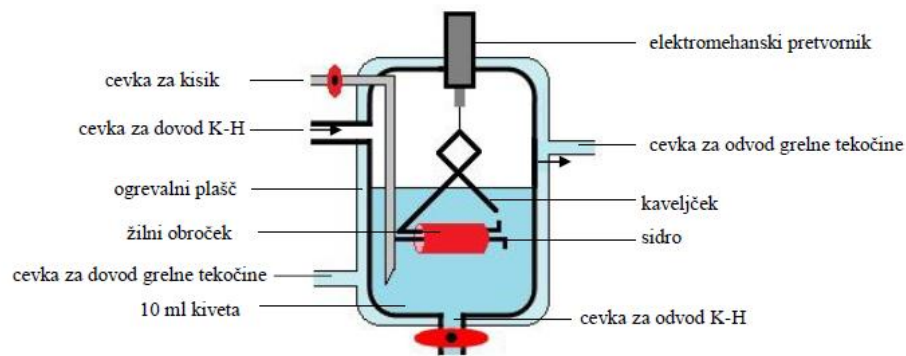
Živali smo evtanazirali s CO<sub>2</sub> tako, da smo jih zaprli v komoro s stalnim dotokom CO<sub>2</sub>. Najprej je žival izgubila zavest, nato je nastopila smrt. Po nastopu smrti smo žival pustili v komori še nekaj minut, nato smo pričeli z izolacijo žil. Trebušno steno smo odprli 2 cm pod ksifoidnim izrastkom spodnjega dela prsnice. Z odstranitvijo trebušne prepone smo si prikazali srce in velike žile v prsnem košu in trebušni votlini podgane. Od torakalne aorte smo ločili sosednje vezivno tkivo in maščevje ter izrezali aorto iz živali. Zgoraj smo aorto prekinili pod izstopiščem leve arterije subklavije, spodaj nad trebušno prepono. Žilo smo pod lupo očistili preostalega veziva in nato iz torakalne aorte pripravili 8 ŽO, dolgih 3–4 mm. ŽO smo namestili v kivete naprave za poskuse na izoliranih žilah, ki so bile napolnjene s K-H. Od evtanazije živali do namestitve ŽO je preteklo v povprečju 20–30 minut.

### **3.2.2 Postopek izolacije človeških možganskih arterij**

Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 84/03/13). Izolirane človeške možganske arterije smo pridobili med obdukcijo, uporabili smo žile na možganski bazi (sprednja možganska arterija, zadnja možganska arterija, bazilarna in vertebralna arterija). Žile za poskus smo odvzeli povprečno 24 ur post mortem. Kadavri so bili različnih starosti in spolov (7 žensk, 16 moških, starost 38–88 let). Izločili smo kadavre, ki so umrli po/med operacijo zaradi možnega vpliva anestetikov in zdravil na delovanje žil. Takoj po odvzemu vzorcev smo žile shranili v raztopini za mikrožile, nato smo jih narezali na 8–16 ŽO, dolgih 3–4 mm, in jih vpeli v napravo za poskuse na izoliranih žilah. Odvzeli smo žile brez aterosklerotičnih sprememb oz. z minimalnimi spremembami. Za vsako spojino smo pri vsakem protokolu uporabili 5–7 ŽO treh različnih kadavrov.

### **3.2.3 Naprava za poskuse na izoliranih žilah**

Naprava za poskuse na izoliranih žilah je sestavljena iz vodne kopeli, v kateri je med seboj povezanih 8 kivet s prostornino 10 ml. Kivete imajo ločen dovodni in odvodni sistem za izmenjavo medija (K-H) ter dovod plina .



**Slika 10:** Slika naprave za poskuse na izoliranih žilah

K-H smo prepihovali s plinsko mešanico 95 % O<sub>2</sub> in 5 % CO<sub>2</sub>. Temperaturo vodne kopeli smo vzdrževali s pomočjo termostatsko nadzorovane vodne črpalke pri  $37,0 \pm 0,5$  °C. Ostale spojine smo dodajali v kivete skozi zgornjo odprtino s polavtomatskimi pipetami. ŽO smo vpeli med dve vzporedni nerjaveči kovinski žici. Prva (sidro) je bila pritrjena na držalo znotraj kivete, druga (kaveljček) pa je bila povezana z elektromehanskim pretvornikom (ITIS, Ljubljana, Slovenija). Elektromehanski pretvornik je spremembo sile izometričnega krčenja ŽO pretvarjal v spremembo električne napetosti, ki se je preko ojačevalca (DEWETRON Ges.m.b.H, Gradec, Avstrija) in A/D pretvornika (National Instruments NI PCI-6013, ZDA) zapisovala na trdi disk osebnega računalnika. Podatke, ki smo jih dobili, smo obdelali s programsko opremo DEWESoft 6.5 (DEWESoft d.o.o., Trbovlje, Slovenija).

### 3.3 POTEK DELA

Vse poskuse tako na podganjih kot na humanih žilnih obročkih smo začeli enako, in sicer z napenjanjem vpetih žilnih obročkov z določeno silo na začetno napetost, odvisno od premera žile. Nato smo čakali, da se žile umirijo in se vrednosti krčitve obdržijo na mirovnem potencialu (MP).

Ko se je žilna napetost ustalila, smo preverili odzivnost obročkov s 60 mmol/l KCl (pri podganjih obročkih) ali 50 mmol/l KCl (pri humanih obročkih) (slika 4.2a, slika 4.3a, slika 4.4a). Po dosegu konstantne skrčitve (dosega platoja), smo obročke nekajkrat izprali z

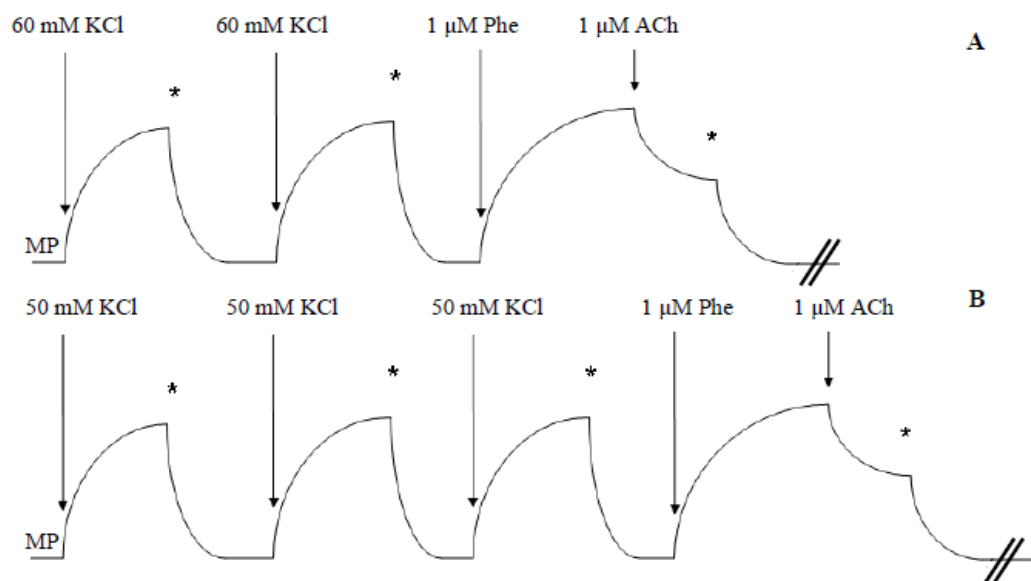
raztopino K-H. Postopek smo ponovili dvakrat pri podganjih obročkih in trikrat pri humanih, nekako do enakomernosti odziva.

Nato smo obročke skrčili z 1  $\mu\text{mol/l}$  Phe (slika 4.2b, slika 4.3b, slika 4.4b). Ko je skrčitev dosegla plato, smo z 1  $\mu\text{mol/l}$  ACh izzvali od endotelija odvisno sprostitvev žilnih obročkov. Po 5 minutah smo žilne obročke sprali s K-H raztopino. Zatem smo izvedli tri različne poskuse s pripadajočimi protokoli.

### **3.3.1 Protokoli poskusov**

Poskuse smo izvedli po treh protokolih: protokol 1 (akutni učinek spojine na predhodno skrčene ŽO), protokol 2 (akutni učinek ACh na predhodno skrčene ŽO po inkubaciji s spojino) in protokol 3 (akutni učinek spojine na predhodno skrčene ŽO po inkubaciji z L-NNA).

Začetek vseh protokolov je bil vedno enak (slika 4.2): ŽO smo vpeli med sidro in kaveljček ter jih potopili v kiveto s K-H. Pred poskusom smo jih 90 minut uravnavali na mirovni potencial (MP) 20 mN. V tem času smo vsakih nekaj minut kivete sprali s K-H, da smo odstranili ostanke krvi in zagotovili zadostno prehranjenost ŽO s kisikom. Ko se je vzpostavil MP, smo preverili odzivnost ŽO. V kiveto smo dodali KCl do končne koncentracije 60 mM (pri človeških žilah do 50 mM). Ko je bila od endotelija neodvisna skrčitev konstantna, smo ŽO sprali s K-H in počakali na vzpostavitev MP. Pri podganjih žilah smo KCl dodali dvakrat, pri človeških tako, da se je odziv žil ustalil. ŽO smo ponovno sprali in počakali na vzpostavitev MP. Nato smo ŽO skrčili z agonistom  $\alpha 1$  adrenoreceptorjev Phe v koncentraciji v kivetu 1  $\mu\text{M}$ . Ko je skrčitev dosegla plato, smo z ACh (koncentracija v kivetu je bila 1  $\mu\text{M}$ ) izzvali od endotelija odvisno sprostitvev ŽO, da smo preverili, če je endotelij ohranjen. ŽO smo nato sprali s K-H in počakali na vzpostavitev MP; ko je bil le-ta dosežen, smo začeli s protokolom 1, 2 ali 3.

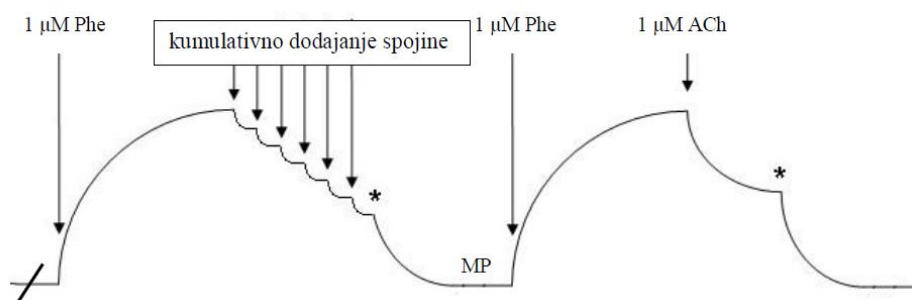


**Slika 11:** Grafični prikaz začetnega dela poskusa na izoliranih podganjih torakalnih aortah (A) in na izoliranih človeških možganskih arterijah (B).

\*- začetek spiranja s K-H, //- nadaljevanje poskusa po protokolu, Phe - fenilefrin, ACh - acetilholin, KCl - kalijev klorid, MP - mirovni potencial.

#### **Protokol 1 - akutni učinek spojine na predhodno skrčene žilne obročke**

V kiveto smo dodali Phe v končni koncentraciji 1  $\mu\text{M}$ . Ko je skrčitev ŽO dosegla plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem preiskovanih spojin do koncentracij v kiveti 0,001  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  (slika 4.3). Po končanem poskusu smo ŽO izprali s K-H, počakali na vzpostavitev MP, jih skrčili s Phe (koncentracija v kiveti je bila 1  $\mu\text{M}$ ) in sprostili z ACh (koncentracija v kiveti je bila 1  $\mu\text{M}$ ). Tako smo preverili odziv endotelija. Po končanem poskusu smo ŽO shranili za uničenje v pooblaščenem zavodu.

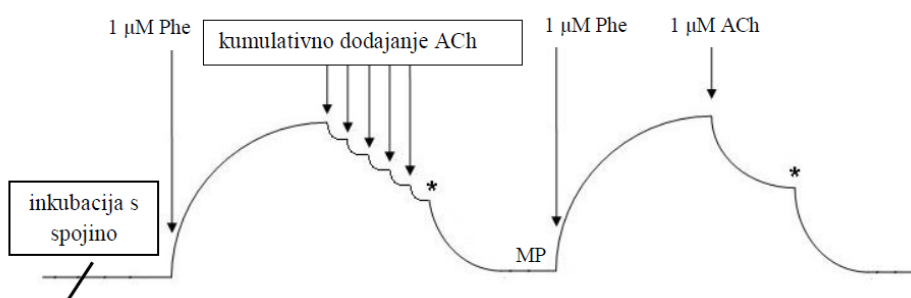


**Slika 12: Protokol 1**

\*- začetek spiranja s K-H, /- poskus sledi začetnem delu, Phe - fenilefrin, ACh - acetilholin, MP - mirovni potencial.

### **Protokol 2 - akutni učinek ACh na predhodno skrčene žilne obročke po inkubaciji s spojino**

Po začetnem delu protokolov smo v kiveto dodali preiskovano spojino v končni koncentraciji  $10\ \mu\text{M}$  v kiveti in ŽO inkubirali 20 min. Nato smo izzvali skrčitev ŽO s Phe (koncentracija v kiveti je bila  $1\ \mu\text{M}$ ). Ko je skrčitev dosegla plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem ACh do koncentracij v kiveti  $0,01\ \mu\text{M}$ ,  $0,1\ \mu\text{M}$ ,  $1\ \mu\text{M}$ ,  $10\ \mu\text{M}$ ,  $100\ \mu\text{M}$  (slika 4.4). Po končanem poskusu smo ŽO sprali s K-H, počakali na vzpostavitev MP, jih skrčili s Phe (koncentracija  $1\ \mu\text{M}$  v kiveti) in sprostili z  $1\ \mu\text{M}$  ACh, (koncentracija v kiveti je bila  $1\ \mu\text{M}$ ). ŽO smo po končanem delu zavrgli.

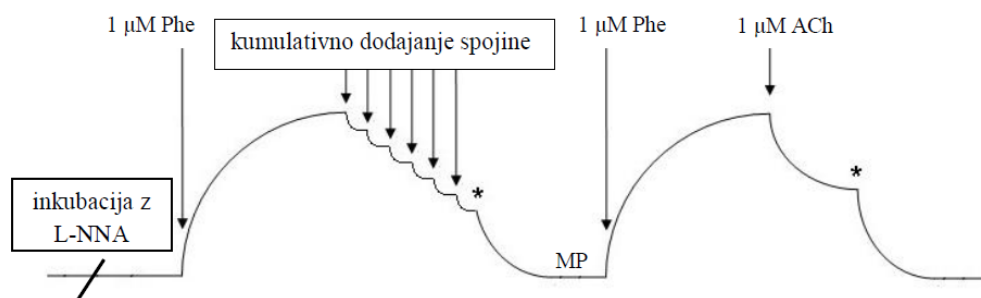


**Slika 13: Protokol 2**

\*- začetek spiranja s K-H, /- poskus sledi začetnemu delu, Phe - fenilefrin, Ach - acetilholin, MP - mirovni potencial.

### Protokol 3 - akutni učinek spojine na predhodno skrčene žilne obročke po inkubaciji z L-NNA

Po začetnem delu protokolov smo v kiveto dodali L-NNA, ki zavira delovanje NOS, v končni koncentraciji v kiveti 360  $\mu\text{M}$  in ŽO inkubirali 30 min. Nato smo izzvali skrčitev ŽO s Phe (koncentracija v kiveti je bila 1  $\mu\text{M}$ ). Ko je skrčitev dosegla plato, smo začeli s kumulativnim dodajanjem preiskovanih spojin do koncentracij v kiveti 0,001  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  (slika 4.5). Po končanem poskusu smo ŽO sprali s K-H, počakali na vzpostavitev MP, jih skrčili s Phe (koncentracija 1  $\mu\text{M}$  v kiveti) in sprostili z ACh, ki je dosegel koncentracijo 1  $\mu\text{M}$  v kiveti. ŽO smo po končanem delu zavrgli.



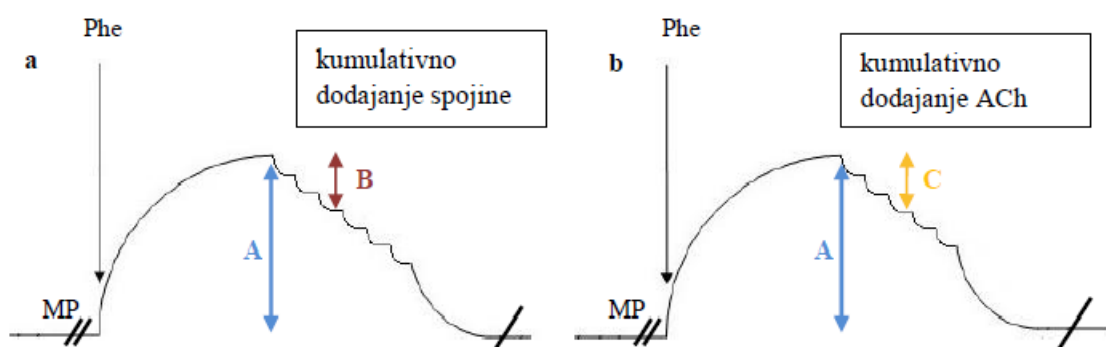
Slika 14: Protokol 3

\*- začetek spiranja s K-H, /- poskus sledi začetnemu delu, Phe - fenilefrin, ACh - acetilholin, MP - mirovni potencial, L-NNA - N $\omega$ -nitro-L-arginin.

#### 3.3.2. Obdelava podatkov

S pomočjo računalniškega programa DeweSoft 6.1 (DEWESoft d.o.o., Trbovlje, Slovenija) smo določili višino platojev (silo izometrične kontrakcije) pri posameznih poskusih. Dobljene podatke smo nato statistično in grafično obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism 5.01 (GraphPad, ZDA). Rezultate meritev pri posameznih koncentracijah smo povprečili in izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM). Število ŽO v posameznem protokolu smo prikazali v rezultatih. Vse vrednosti, ki smo jih uporabili za izračune, prikazuje slika 4.6. Pri protokolih 1 in 3

smo izračunali odstotek sprostitve predhodno skrčenih ŽO po dodatku spojine (razlika med platojem po dodatku Phe in platojem po dodatku spojine določene koncentracije (x %, B na sliki 4.6a), tako da smo za 100 % vzeli razliko med platojem po dodatku Phe in MP neposredno pred dodatkom Phe (A na sliki 4.6a). Pri protokolu 2 smo za vsako koncentracijo ACh po inkubaciji izračunali odstotek sprostitve ŽO, predhodno skrčenih s Phe, tako da smo primerjali razliko med platojem Phe in platojem ACh določene razredčitve po inkubaciji (x %, C na sliki 4.6b) z razliko med platojem po dodatku Phe in MP neposredno pred dodatkom Phe (100 %, A na sliki 4.6b).



Slika 15: Shematski prikaz vrednosti, ki smo jih uporabili za računanje po protokolih 1 in 3 (a) in po protokolu 2 (b).

// – poskus sledi začetnemu delu, / – nadaljevanje poskusa, ACh – acetilholin, Phe – fenilefrin, MP – mirovni potencial, A – razlika napetosti med platojem Phe in MP neposredno pred dodatkom Phe, B – razlika napetosti med platojem Phe in platojem spojine določene koncentracije, C – razlika med platojem Phe in platojem ACh določene koncentracije.

Z dvofaktorsko analizo variance (dvosmerna ANOVA) z Bonferronijevim popravkom smo primerjali:

- odzive izoliranih ŽO človeka in podganjih ŽO po protokolu 1,
- odzive izoliranih ŽO človeka in podganjih ŽO po protokolu 2,
- učinek ACh pri koncentraciji 1  $\mu\text{M}$  na predhodno skrčene ŽO po inkubaciji in pred inkubacijo s spojino (protokol 2) in

- odstotek sproščanja predhodno skrčenih ŽO po dodatku spojine po protokolu 1 in 3.

Statistično pomembno razliko pri primerjavi rezultatov je predstavljala vrednost  $p < 0,05$ , ki je označena na grafu (\*) in prikazana v opisu pod grafom. Na grafu smo prikazali odvisnost učinka na ŽO od logaritma koncentracije ( $\log c$ ) in stolpični diagram, ki prikazuje akutni učinek ACh koncentracije  $1 \mu\text{M}$  v odvisnosti od inkubacije s spojino.

## 4 REZULTATI

Med raziskavo pridobljene rezultate smo analizirali z dvofaktorsko analizo variance (dvosmerna ANOVA) s popravkom po Bonferroniju. Za prikaz podatkov smo uporabili graf učinka spojine na ŽO v odvisnosti od logaritma koncentracije in stolpični diagram, ki prikazuje učinek ACh koncentracije  $1 \mu\text{M}$  v odvisnosti od inkubacije s spojino. Vrednost sprostitve ŽO, prikazane na y-osi, so podane kot odstotek sprostitve. Točke na grafu in višine stolpcev na diagramu predstavljajo aritmetične sredine učinka, ki smo jih dobili s povprečjem rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah. Točkam smo prilagodili sigmoidno krivuljo odziva. SEM smo prikazali s črtami, ki potekajo skozi točke aritmetičnih sredin učinka na prvem grafu in skozi najvišji del stolpca na drugem grafu ter so vzporedne z y-osjo.

Statistično značilne p vrednosti so označene na grafih (\*). Njihova vrednost je podana v opisu pod grafom.

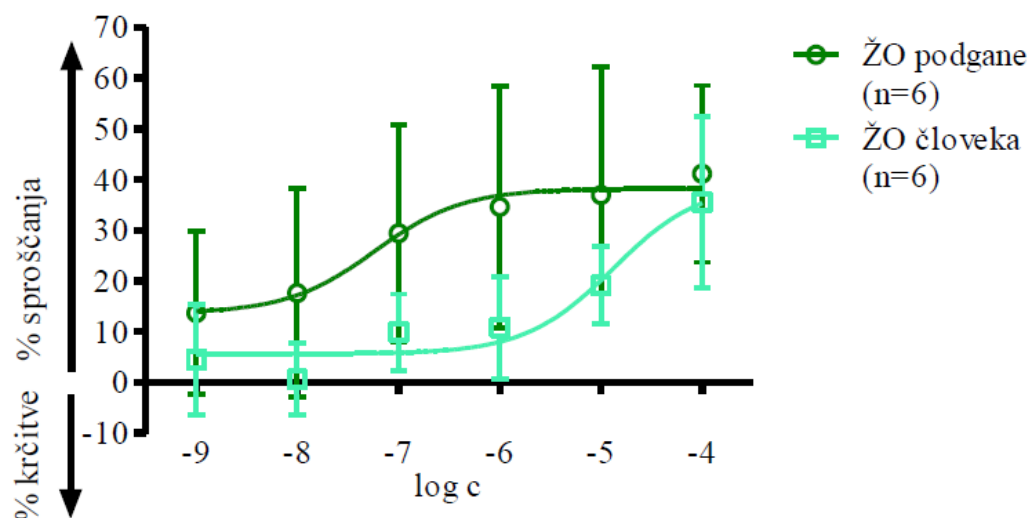
### 4.1 KAVNA KISLINA

Na predhodno skrčene ŽO smo ugotavljali akutni učinek kavne kisline in akutni učinek ACh na predhodno skrčene ŽO po inkubaciji s kavno kislino.

Akutni učinek kavne kisline na predhodno skrčene žilne obročke

Na predhodno skrčenih ŽO podgan in človeka smo ugotavljali odziv na kumulativno dodajanje kavne kisline in jih med seboj primerjali. Končna koncentracija kavne kisline v kivetu je znašala  $100 \mu\text{M}$  (oznaka -4 na grafu).

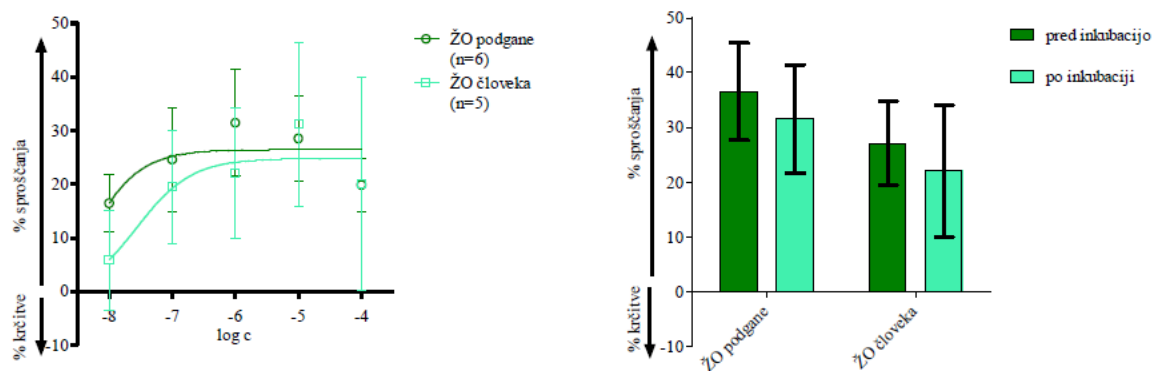




**Slika 16:** Grafični prikaz odziva podganjih in človeških ŽO, predhodno skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje kavne kisline .  
(n – število ŽO).

#### Akutni učinek ACh na predhodno skrčene žilne obročke po inkubaciji s kavno kislino

Na predhodno skrčenih ŽO podgan in človeka smo ugotavljali odziv na kumulativno dodajanje ACh po inkubaciji z 10  $\mu$ M kavno kislino in jih med seboj primerjali. Končna koncentracija ACh v kivetu je znašala 100  $\mu$ M (oznaka -4 na grafu).



**Slika 17:** Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih s kavno kislino in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh.

Levi graf predstavlja odziv podganjih in človeških ŽO, predhodno inkubiranih s kavno kislino in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh. Desni graf prikazuje odziv podganjih in človeških ŽO predhodno skrčenih s Phe, na dodajanje 1  $\mu$ M ACh pred in po inkubaciji s kavno kislino (n – število ŽO, SEM - prikazan s črtami, ki potekajo skozi

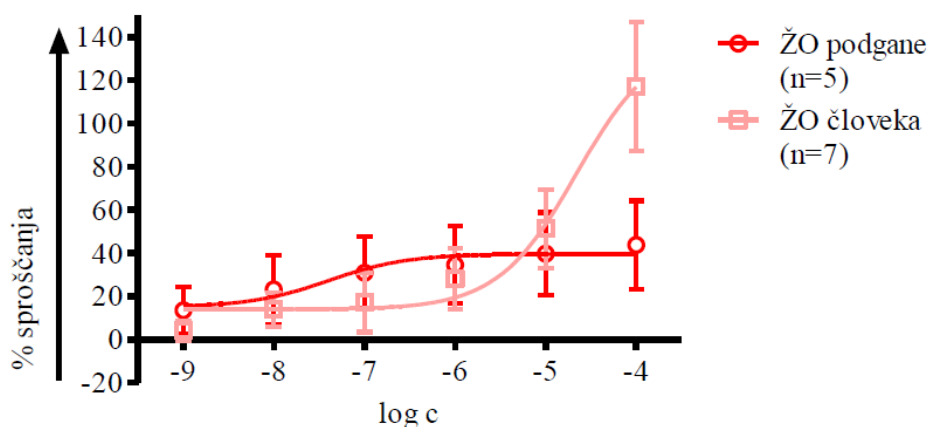
točke aritmetičnih sredin učinka na levem grafu in skozi najvišji del stolpca na desnem grafu ter so vzporedne z y-osjo).

#### 4.2 MALTOL

Akutni učinek maltola smo preverili na predhodno skrčene ŽO brez (slika 5.1) in z (slika 5.3) inkubacijo z L-NNA. Nato smo še preverili učinek ACh na predhodno skrčene ŽO po inkubaciji z maltolom (slika 5.2).

Akutni učinek maltola na predhodno skrčene žilne obročke

Na predhodno skrčenih ŽO podgan in človeka smo ugotavljali odziv na kumulativno dodajanje maltola in ju med seboj primerjali (slika 5.1). Končna koncentracija maltola v kiveti je znašala 100 $\mu$ M (oznaka -4 na grafu).



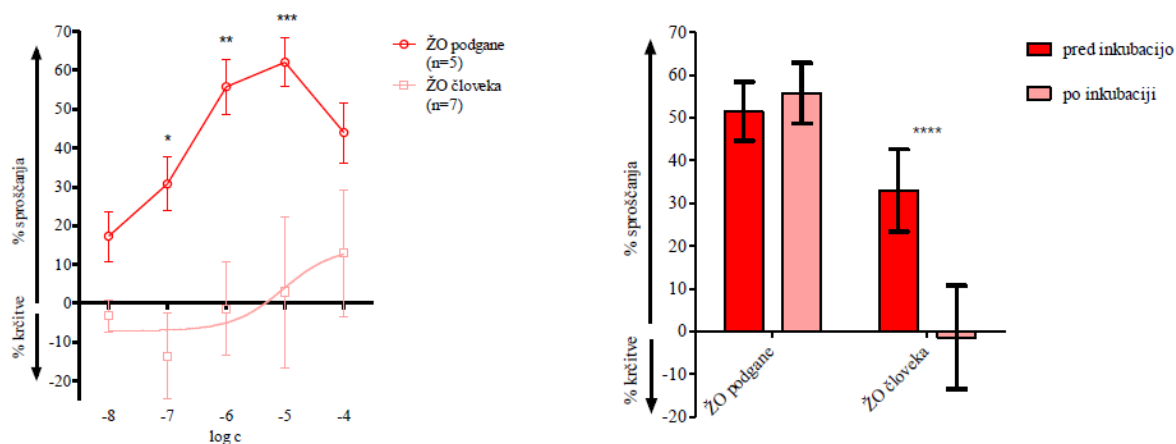
**Slika 18:** Grafični prikaz akutnega odziva predhodno skrčenih podganjih in človeških ŽO na kumulativno dodajanje maltola.

(n - število ŽO).

Akutni učinek ACh na predhodno skrčene žilne obročke po inkubaciji z maltolom

Po inkubaciji z 10 $\mu$ M maltola smo ugotavljali odziv na predhodno skrčenih podganjih in človeških ŽO na kumulativno dodajanje ACh in jih primerjali med seboj.

Končna koncentracija ACh v kiveti je dosegla 100  $\mu$ M (oznaka -4 na grafu).

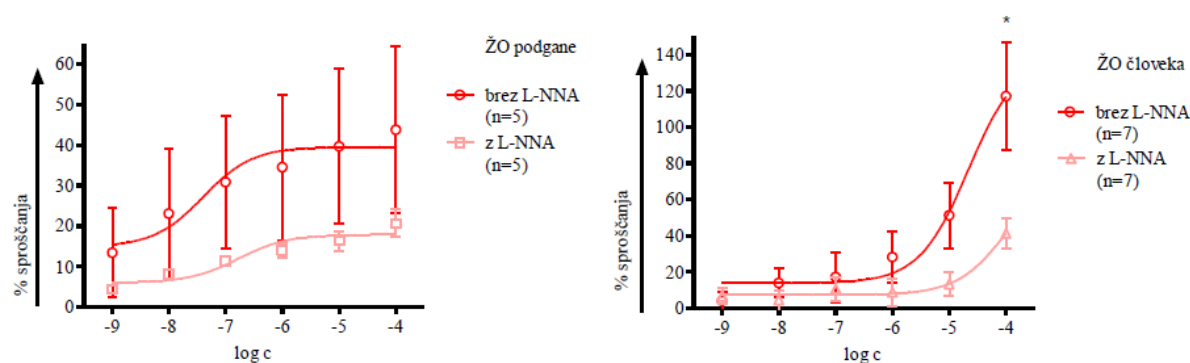


**Slika 19:** Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih z maltolom in nato skrčenih s Phe.

Levi graf prikazuje vpliv različnih koncentracij ACh na odziv žilnih obročkov podganje torakalne aorte in človeških možganskih arterij, predhodno inkubiranih z maltolom in nato skrčenih s Phe. Na grafu \* predstavlja statistično značilno razliko ( $p=0,0267$ ) med ŽO podgane in človeka; \*\* predstavlja statistično značilno razliko ( $p=0,0071$ ) med ŽO podgane in človeka; \*\*\* predstavlja statistično značilno razliko ( $p=0,0058$ ) med ŽO podgane in človeka. Desni graf prikazuje odziv žilnih obročkov podganje torakalne aorte in človeških možganskih arterij, predhodno skrčenih s Phe na dodajanje  $1\mu\text{M}$  ACh pred in po inkubaciji z maltolom. \*\*\*\* predstavlja statistično značilno razliko ( $p=0,0211$ ) med odzivom ŽO človeka pred in po inkubaciji z maltolom.

### 5.1.3 Akutni učinek maltola na predhodno skrčene žilne obročke po inkubaciji z L-NNA

Na predhodno skrčenih ŽO podgan in človeka smo ugotavljali odziv na kumulativno dodajanje maltola po inkubaciji s  $360\mu\text{M}$  L-NNA in jih primerjali z akutnim učinkom maltola na predhodno skrčene ŽO brez inkubacije z L-NNA. Končna koncentracija maltola v kiveti je dosegla  $100\mu\text{M}$  (oznaka -4 na grafu).

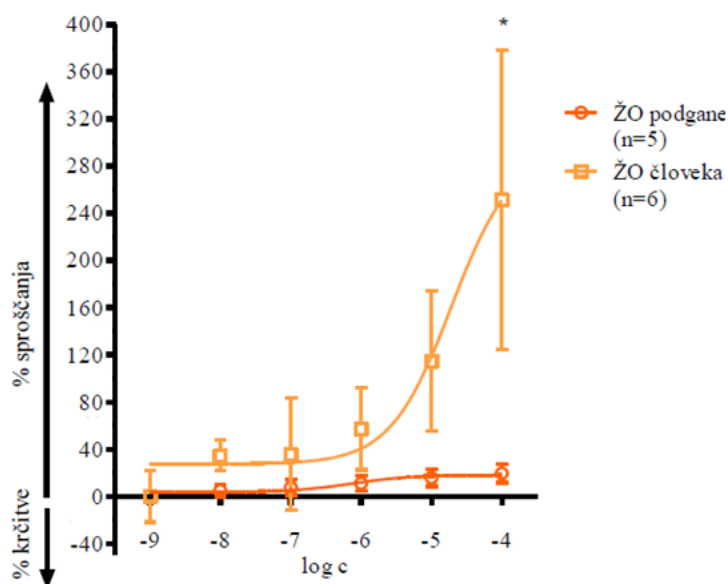


**Slika 20:** Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih ali neinkubiranih z L-NNA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje maltola.

Levi graf predstavlja odziv žilnih obročkov izolirane podganje torakalne aorte, predhodno inkubiranih ali neinkubiranih z L-NNA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje maltola. Desni graf predstavlja odziv žilnih obročkov, izoliranih iz človeških možganskih arterij, predhodno inkubiranih ali neinkubiranih z L-NNA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje maltola. \* predstavlja statistično značilno razliko ( $p=0,0011$ ) med odzivom ŽO človeka z in brez inkubacije z L-NNA.

#### 4.3 KLOROGENSKA KISLINA

Ugotavljali smo akutni učinek CGA na predhodno skrčene ŽO, nato pa še akutni učinek ACh na predhodno skrčene ŽO po inkubaciji s CGA. Na predhodno skrčenih podganjih in človeških ŽO smo ugotavljali odzive na kumulativno dodajanje CGA in jih med seboj primerjali. Končna koncentracija CGA v kivetu je dosegla  $100 \mu\text{M}$  (oznaka -4 na grafu).

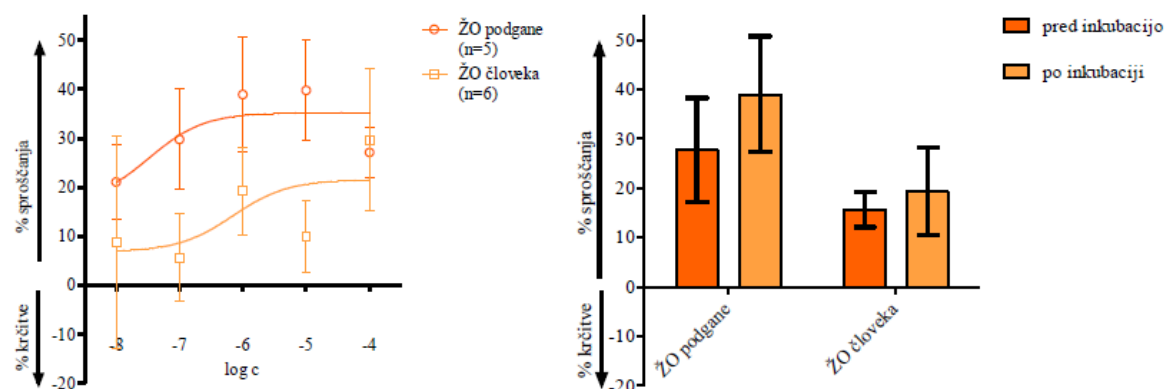


**Slika 21:** Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje CGA.

\* predstavlja statistično značilno razliko ( $p=0,0078$ ) med podganjimi in človeškimi ŽO (n – število ŽO).

### Akutni učinek ACh na predhodno skrčene žilne obročke po inkubaciji s klorogensko kislino

Na predhodno skrčenih podganjih in človeških ŽO smo ugotavljali odzive na komulativno dodajanje ACh po inkubaciji s 10  $\mu$ M CGA in jih med seboj primerjali. Končna koncentracija CGA v kiveti je dosegla 100  $\mu$ M (oznaka -4 na grafu).



**Slika 22:** Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih s CGA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh.

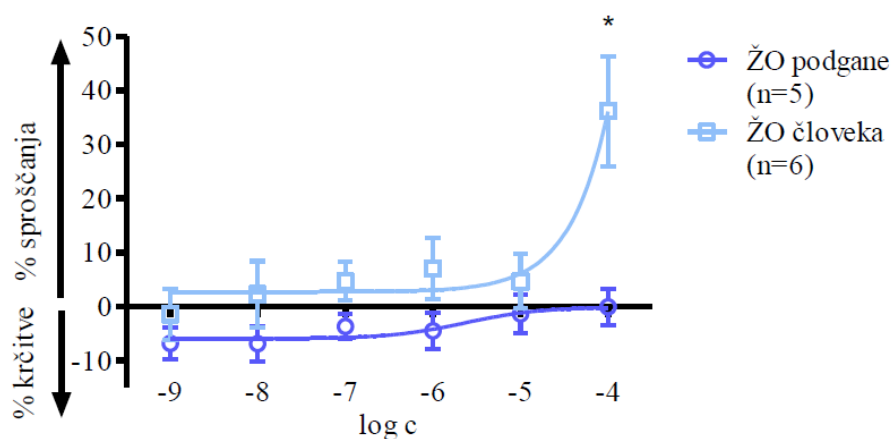
Levi graf predstavlja odziv podganjih in človeških ŽO, predhodno inkubiranih s CGA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh. Desni graf prikazuje odziv podganjih in človeških ŽO, predhodno skrčenih s Phe, na dodajanje 1  $\mu$ M ACh pred in po inkubaciji s CGA (n – število ŽO).

#### 4.4 GENTIZINSKA KISLINA

Na predhodno skrčenih ŽO smo ugotavljali akutni učinek GA in akutni učinek ACh po inkubaciji z GA.

##### **Akutni učinek gentizinske kisline na predhodno skrčene žilne obročke**

Na predhodno skrčenih ŽO človeka in podgane smo preverjali odzive na kumulativno dodajanje GA in jih med seboj primerjali. Končna koncentracija GA v kiveti je znašala 100  $\mu$ M (oznaka -4 na grafu).

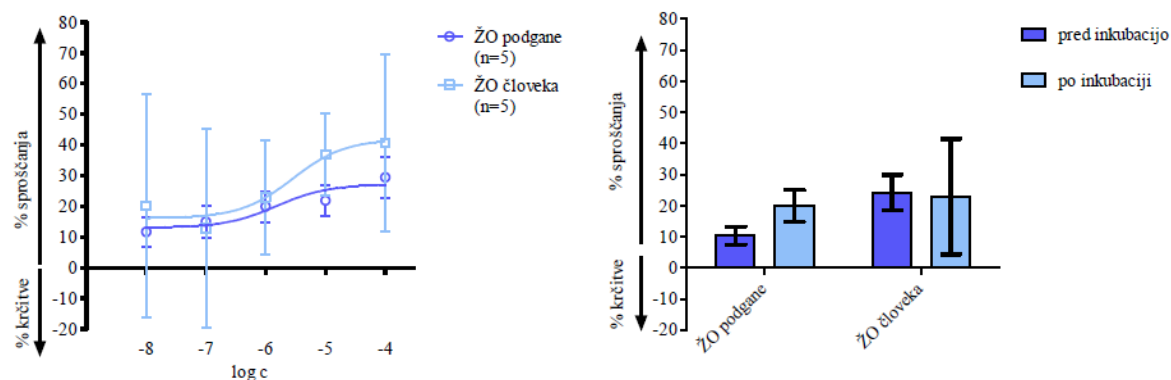


**Slika 23:** Grafični prikaz odziva podganjih in človeških ŽO, predhodno skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje GA.

\* predstavlja statistično značilno razliko ( $p=0,0007$ ) med podganjimi in človeškimi ŽO (n – število ŽO).

##### **Akutni učinek ACh na predhodno skrčene ŽO po inkubaciji z gentizinsko kislino.**

Na predhodno skrčenih podganjih in človeških ŽO smo ugotavljali odzive na kumulativno dodajanje ACh po inkubaciji z 10  $\mu$ M GA in jih med seboj primerjali. Končna koncentracija ACh v kiveti je znašala 100  $\mu$ M (oznaka -4 na grafu).



**Slika 24:** Grafični prikaz odziva človeških in podganjih ŽO, predhodno inkubiranih z GA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh.

Levi graf prikazuje odziv podganjih in človeških ŽO, predhodno inkubiranih z GA in nato skrčenih s Phe, na kumulativno dodajanje ACh. Desni graf prikazuje odziv podganjih in človeških ŽO, predhodno skrčenih s Phe, na dodajanje 1  $\mu$ M ACh pred in po inkubaciji z GA. Na y osi so podane vrednosti sprostitve žilnih obročkov, ki so prikazane kot odstotek glede na največjo skrčitev s Phe. Stolpci predstavljajo aritmetične sredine odstotkov sprostitve ( $n$  – število ŽO).

## 5 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil preveriti odziv podganjih in človeških žilnih obročkov na in vitro uporabo izbranih polifenolnih spojin, ki se nahajajo tudi v lubju kočevske bele jelke. Za primerjavo smo izbrali živalski model podganje torakalne aorte, ker je ta pogost, dostopen in do neke mere primerljiv s humanim tkivom. Učinke naših izbranih spojin na žilnih obročkih humanih možganskih arterij smo primerjali z učinki na podganjih torakalnih aortah.

Raziskava je potekala po treh različnih protokolih. V prvem smo preverili akutne učinke spojin na podganje in človeške žilne obročke. Glede na dosedanje študije smo pričakovali, da se bodo žilni obročki po dodatku spojin sprostili. V drugem protokolu smo žilne obročke predhodno inkubirali s spojinami in na ta način posnemali njihovo kronično uživanje. Dodajali smo ACh in ugotavljali, ali predhodna inkubacija vpliva na endotelijsko posredovano sprostitvev preko ACh. Pričakovali smo izrazitejši sprostitveni učinek ACh, saj polifenolne spojine okrepijo vazorelaksacijo. S tretjim protokolom pa smo poskušali potrditi ali ovreči vpliv spojine na endotelijsko posredovano sprostitvev žil z vplivom na eNOS in NO, tako da smo žilne obročke inkubirali z L-NNA, ki zavre delovanje eNOS.

### 5.1 KAVNA KISLINA

Akutni učinek kavne kisline na predhodno skrčene ŽO človeka in podgane se je pokazal kot sproščanje ŽO. Sprostitveni učinek se je pri podgani pokazal pri koncentracijah, višjih od 0,1  $\mu$ M, pri človeku pa pri koncentracijah, višjih od 10  $\mu$ M. Akutni učinek kavne kisline je bil pri vseh koncentracijah večji na podganjih ŽO, vendar ni bil statistično značilen. Za raziskavo vpliva kavne kisline na podganje ŽO so kavno kislino izolirali iz izvlečkov listov drevesa *Phyllanthus acidus*, katere v tajski tradicionalni medicini uporabljajo za zdravljenje arterijske hipertenzije. Raziskavo so izvedli na podganah linije Wistar, ki so jim intravensko vbrizgali ekstrat *Phyllanthus acidus* 0,3-100 mg/kg (vseboval je 1-10 mg/kg kavne kisline) in merili krvni tlak v karotidni arteriji, sledila je evtanazija in priprava ŽO torakalne aorte. Pri *in vivo* poskusih je kavna kislina v najvišji koncentraciji (10 mg/kg TT) znižala vrednosti srednjega arterijskega tlaka in zmanjšala frekvenco bitja srca, pri *ex vivo* poskusih pa je predhodno skrčene žile s Phe sprostila. Ugotovili so, da kavna kislina deluje sproščujoče preko endotelija in tudi preko drugih mehanizmov. Izključili so delovanje na GMC preko odprtja kalijevih kanalov in delovanja gvanilat ciklaze (36).



Inkubacija s kavno kislino pri naših poskusih ni statistično značilno spremenila odziva ŽO na ACh, tako pri človeških kot pri podganjih ŽO. Iz tega lahko sklepamo, da učinki kavne kisline ob kroničnem vnosu niso povezani z učinki ACh.

## 5.2 MALTOL

Sprostitutveni akutni učinek maltola se na humanih ŽO pokaže pri koncentracijah, višjih od 0,1  $\mu\text{M}$ , na podganjih ŽO pa pri koncentracijah, višjih od 0,001  $\mu\text{M}$ .

Pri humanih, predhodno inkubiranih ŽO je maltol značilno inhibiral delovanje ACh, medtem ko se na podganjem modelu učinek ACh pred in po inkubaciji ni razlikoval. Glede na to, da ACh deluje preko spodbujanja izločanja NO, lahko sklepamo, da maltol pri človeku zavira tvorbo NO in deluje relaksacijsko na endotelij preko drugih mehanizmov. To je bilo dokazano v raziskavi Schmitta in sodelavcev na spojini, podobni maltolu (50). Ob primerjavi odzivov podganjih in človeških ŽO na ACh po inkubaciji z maltolom smo dokazali (statistično) značilno zmanjšanje učinka pri koncentracijah 0,1-10  $\mu\text{M/L}$  na človeških ŽO. Razliko v delovanju ACh na ŽO obeh vrst žil bi lahko pripisali različni zgradbi človeških in podganjih žilnih sten. Podganje torakalne arterije imajo več GMC in na ta način bolje kompenzirajo zmanjšan učinek ACh na endotelijske celice kljub zavrti tvorbi NO.

Pri inkubaciji humanih ŽO z L-NNA je prišlo do statistično značilno zmanjšanega odziva na maltol pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ . Sprostitutev človeških ŽO po inkubaciji z L-NNA se je pojavila šele pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ , zato sklepamo, da je akutni učinek maltola posredovan preko NOS. Občutno razliko med akutnimi in kroničnimi učinki bi lahko pripisali tudi majhnemu številu vzorcev oz. števila živali. Med akutnimi učinki maltola z in brez inkubacije z L-NNA pri podganjih ŽO ni bilo statistično značilne razlike. Po inkubaciji podganjih ŽO z L-NNA je bil odziv pri nižjih koncentracijah manjši najmanj za 9 %, pri višjih pa do 23 %. Razlog, da statistično značilne razlike nismo dokazali, bi lahko pripisali preveliki variabilnosti v odzivu ŽO in majhnemu številu vzorcev ( $n=5$ ). Iz rezultatov bi lahko sklepali, da je relaksacijski učinek maltola na podganji endotelij le delno posredovan preko eNOS, delno pa preko endotelijskih dejavnikov (npr. PGI, EDHF...). Razlike v delovanju maltola med človeškimi in podganjimi ŽO bi lahko pripisali razlikam v zgradbi žilne stene, zaradi različnega organa, v katerem je bila žila odvzeta, in drugim medvrstnim razlikam. Človeške možganske žile v primerjavi s

sistemskimi arterijami nimajo zunanje elastične lamine in je zaradi tega njihova žilna stena tanjša, mišic manj in tudi manjši odziv.

### 5.3 KLOROGENSKA KISLINA

Vazodilatacijski učinek CGA na predhodno skrčene ŽO človeka in podgane se je pokazal pri koncentracijah, višjih od 1  $\mu\text{M}$ . Večji sprostivni učinek se je pri vseh koncentracijah spojine pokazal na ŽO človeka v primerjavi s podganimi ŽO. Statistično značilno razliko je opaziti pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ . Inkubacija s spojino ni statistično značilno spremenila odziva ŽO na ACh. Predvidevamo lahko, da kronično uživanje spojine nima učinka na delovanje ACh. *In vivo* študija, ki je bila opravljena na spontano hipertenzivnih podganah je pokazala, da CGA posreduje od endotelija odvisen padec krvnega tlaka ob akutnem in kroničnem jemanju spojine in izboljša od ACh odvisno delovanje endotelija (38). V primerjavi z našo raziskavo je bila ta opravljena na drugi liniji podgan in na *in vivo* modelu, rezultati pa so bili podobni, saj CGA na delovanje ACh ni vplivala značilno.

Leta 2012 so Mubarak in sodelavci opravili raziskavo na zdravih prostovoljcih. V rednih intervalih so jim merili krvni tlak 60-150 min po zaužitju 400 mg CGA, ki je povzročila padec krvnega tlaka (39). Aktivnost eNOS in NO ni bila spremenjena, zato so zaključili, da učinek CGA na padec krvnega tlaka ni povezan z aktivnostjo eNOS. Naša raziskava je težje primerljiva z raziskavo Mubaraka in sodelavcev, saj je bila opravljena na možganskih žilah, kjer se mehanizmi uravnavanja tlaka razlikujejo od ostalih mehanizmov v telesu, in opravljena je bila na *in vitro* modelu, katerega rezultate je težko prenesti na *in vivo* model (40).

### 5.4 GENTIZINSKA KISLINA

Sproščujoč učinek GA se je na predhodno skrčenih človeških ŽO kazal pri koncentracijah, višjih od 100  $\mu\text{M}$ , medtem ko na podganje ŽO ni imela učinka. Odziv podganih ŽO pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  je bil statistično nepomemben.

Pri inkubaciji z GA ni bilo statistično značilnih sprememb pri odzivu podganih in človeških ŽO na ACh.

Iz tega je razvidno, da tako kroničen kot akuten vnos GA nima pomembnega učinka na žilni tonus. Človeške žilne obročke je sproščala šele pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ . V naši raziskavi nismo potrdili, da GA povzroča od endotelija odvisno sproščanje GMC, vendar bi lahko spojina vseeno delovala zaščitno na človeške žile v napredovani fazi okrnjenega

delovanja endotelija, ki se klinično kaže z aterosklerotičnimi spremembami. Zmanjšano oksidacijo LDL in močan antioksidativen učinek spojine so dokazali v raziskavi, opravljeni na človeški plazmi (37).

## 6 SKLEP

Na podlagi raziskave smo prišli do več ugotovitev:

- Vse raziskovane spojine imajo sproščujoč učinek na človeških in podganjih žilnih obročkih, predhodno skrčenih s Phe.
- Učinki spojin na človeške možganske arterije se razlikujejo od učinkov na podganjih torakalnih aortah. Klorogenska kislina ( $p=0,0078$ ) in gentizinska kislina ( $p=0,0007$ ) sta pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  statistično značilno bolj sprostili človeške arterije kot podganje aorte.
- Po predhodnem skrčenju žilnih obročkov s Phe je inkubacija s spojinami preko povečane tvorbe NO povzročila močnejši odziv žil na ACh. Med akutnim učinkom ACh na predhodno skrčene žilne obročke človeka in podgan pred in po inkubaciji s spojinami ni bilo statistično značilnih razlik.
- Relaksacijski učinek spojin na žilne obročke je posredovan preko endotelijsko odvisnih mehanizmov s povečanim sproščanjem NO prek povišane aktivnosti endotelijske NOS. Inkubacija človeških žilnih obročkov z zaviralcem NOS je statistično značilno zmanjšala akutni učinek maltola ( $p=0,0011$ ) za 75,8 % pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ . Inkubacija podganjih žilnih obročkov z zaviralcem NOS je neznačilno zmanjšala akutni učinek maltola za največ 23,1 %.

Ugotovili smo, da so vse spojine imele relaksacijski učinek na možgansko žilje, in zaradi tega predstavljajo velik potencial pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni.

## 7 LITERATURA

1. Kovačič U, Šok V, Ribarič S. Temelji patološke fiziologije, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2009: 57-213.
2. Lindsay, K.in Bone, I.Neurology and neurosurgery illustrated, Fourth edition,Churchill Livingstone, London 2004, 360-365.
3. [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_what\\_is\\_alzheimers.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp), dostopno: junij 2015.
4. Webb Clinton R: Smooth muscle contraction and relaxation. Advances in Physiology Education 2003;27.
5. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar R.K: Cyclodextrins in Drug Delivery: An Update Review. AAPS PharmSciTech 2005.
6. Rasheed A, Ashok Kumar C.K., Sravanthi V.V.N.S.S.: Cyclodextrins as drug carrier molecule: A review. Scientia Pharmaceutica 2008;76: 567-598.
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0001747/>, dostopno: julij 2015.
8. [http://pubs.acs.org/subscribe/archive/mdd/v07/i01/pdf/104feature\\_jamil.pdf](http://pubs.acs.org/subscribe/archive/mdd/v07/i01/pdf/104feature_jamil.pdf), dostopno: avgust 2015.
9. Qin J,Chen D, Hu H, Qiao M, Zhao X, Chen B: Body distribution of RGD-mediated Liposome in Brain-targeting Drug Delivery. The pharmaceutical Society of Japan 2007; 9: 1497-1501.
10. Obermajer N, Kos J, Kristl J: Nanoparticles: advanced delivery system for drugs and antigens to the cells of the immune system. Pharmaceutical journal of Slovenia 2007; 58: 39-44.
11. Bošnjak D: Nanotehnologija v farmaciji: razburljivo desetletje očem nevidnih izboljšav zdravil. Znanost 2012
12. Koffie R., Farrar C, Saidi L,William C, Hyman B, Spires-Jones T: Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier impermeable probes for in in vivo optical and magnetic resonance imaging. PNAS 2011; 108: 18837-18842.
13. Masserini M: Nanoparticles for Brain Drug Delivery. International Scholarly Research Notices 2013; 1-18.
14. Jezernik K, Kreft M: Tight junctions barriers in our body .Medicinski razgledi 2010; 51-62.

15. <http://www.wellneo.si/clanki-wellneo/eko-in-bio-zivljenjski-slog/uporaba-oljcnega-olja.htm>, dostopno: julij 2015.
16. Kutina, T.(2008). Protimikrobna učinkovitost rastlinskih ekstraktov iz Navadnega rička (*Camelina sativa*). Diplomsko delo, Ljubljana: Biotehniška fakulteta.
17. Mushfiquddin K,Chinnasamy E,Mubeen A A,Inderjit S,Avtar K. S: Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia.Journal of Neurochemistry 2007;102: 365-377.
18. Van Ginkel MF, Van der Voet GB, D Haese PC, De Broe ME,De Wolff FA : Effect of citric acid and maltol on the accumulation of aluminum in rat brain and bone. J Lab Clin Med 1993; 121: 453-60.
19. Shen W,Qi R,Zhang J, Wang Z, Wang H, Hu C, Zhao Y, Bie M,Wang Y,Fu Y,Chen M, Lu D: Chlorogenic acid inhibits LPS- induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. Brain Res Bull 2012: 88;487-94.
20. <http://www.hmdb.ca/metabolites/hmdb00152>, dostopno: september 2015.
21. Fernandez I, Cuevas P,Angulo J, Lopez-Navajas P,Canales-Mayordomo A,Gonzalez-Corrochano R, Lozano R, Valverde S, Jimenez-Barbero J, Romero A,Gallego G: Gentisic acid, a compound associated with plant defense and a metabolite of Aspirin, heads a new class of in vivo fibroblast growth factor inhibitors. The journal of biological chemistry 2010: 285; 11714-11729.
22. <http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/2,5-DIHYDROXYBENZOIC%20ACID>, dostopno: september 2015.
23. Ashidate K, Kawamura M, Mimura D, Tohda H, Miyazaki S, Teramoto T, Yamamoto Y: Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. European journal of pharmacology 2005: 513; 173-179.
24. Penniall R, Kalnitsky G, Routh J: *The effects of salicylic acid and related compounds on in vitro rat brain respiration*. Archives of biochemistry and biophysics 1956: 64; 390-400.
25. [http://www.stat.si/novica\\_prikazi.aspx?id=6513](http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=6513), dostopno: september 2015.
26. <http://www.dnevnik.si/ljudje/1042381979>, dostopno: oktober 2015.
27. Konishi Y, Hitomi Y,Yoshida M, Yoshioka E: Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. J Agric Food Chem 2005: 53; 4740-6.

28. Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J: Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 2004;48: 5496-500.
29. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability<sup>1,2</sup>. *The American journal of clinical nutrition* 2004;79: 727-747.
30. <http://www.strokecenter.org/professionals/brain-anatomy/blood-vessels-of-the-brain/>, dostopno: oktober 2015.
31. Li WX, Deng YY, Li F, Liu B, Liu HY, Shi JS, Gong QH; Icariin, a major constituent of flavonoids from *Epimedium brevicornum*, protects against cognitive deficits induced by chronic brain hypoperfusion via its anti-amyloidogenic effect in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2015: 138; 40-8.
32. Kao TK, Ou YC, Lin SY, Pan HC, Song PJ, Raung SL, Ali CY, Liao SL, Lu HC, Chen CJ: Luteolin inhibits cytokine expression in endotoxin/ cytokine-stimulated microglia. *J Nutr Biochem* 2011; 22; 612-24.
33. Kogoj P, Hawlina S, Bunc M. Od endotelija odvisno uravnavanje žilnega napona. *Medicinski Razgledi* 2008; 47 (1): 31–42.
34. Trybus KM. Regulation of smooth muscle myosin. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1991; 18: 81–5.
35. Hirano K, Hirano M, Kanaide H. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in vascular smooth muscle. *J Smooth Muscle Res*. 2004; 40 (6): 219–36.
36. Leeya Y, Mulvany MJ, Queiroz EF, et al. Hypotensive activity of an n-butanol extract and their purified compounds from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels in rats. *Eur J Pharmacol*. 2010; 649 (1–3): 301–13.
37. Ashidate K, Kawamura M, Mimura D, et al. Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. *Eur J Pharmacol*. 2005; 513 (3): 173–9.
38. Suzuki A, Yamamoto N, Jokura H, et al. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2006; 24 (6): 1065–73.
39. Mubarak A, Bondonno CP, Liu AH, et al. Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a randomized trial. *J Agric Food Chem*. 2012; 60 (36): 9130–6.

40. Bor-Seng-Shu E, Kita WS, Figueiredo EG, et al. Cerebral hemodynamics: concepts of clinical importance. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012; 70 (5): 352–6.
41. Lunder M, Janić M, Skarlovnik M, et al. Staranje arterijskega sistema. *Zdrav Vestn.* 2012; 81: 653–63.