

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARIJA ŽIBERT

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARIJA ŽIBERT

AKUTNI UČINKI IZVLEČKA NAVADNE JELKE (*Abies alba*
Mill.) NA ISHEMIČNO/REPERFUZIJSKE OKVARE SRCA IN
SPOSOBNOST RAZŠIRITVE TORAKALNE AORTE PRI
PODGANAH

ACUTE EFFECTS OF SILVER FIR (*Abies alba* Mill.) EXTRACT
ON ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN ISOLATED RAT
HEART AND VASORELAXANT EFFECTS IN RAT THORACIC
AORTA

Diplomska naloga

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala v laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom viš. znan. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol..

ZAHVALE

Zahvaljujem se prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in viš. znan. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, univ. dipl. biol. za mentorstvo, usmerjanju pri nastajanju naloge in nasvete.

Zahvaljujem se dr. Mojci Lunder, dr. med., za pomoč in potrpežljivost pri delu v laboratoriju ter za pomoč pri izdelavi naloge.

Posebna zahvala gre mojima staršema, ki sta mi študij omogočila, sestri in teti, ki sta me vzpodbujali, starima staršema, ki sta vedno držala pesti ter prijateljem, ki so skrbeli za lepe trenutke v času študija.

IZJAVA

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

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner

Članica komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik

Ljubljana, 2013

Marija Žibert

VSEBINA

VSEBINA.....	II
POVZETEK	IV
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD	1
1.1 Srčno-žilni sistem	1
1.1.1 Srce.....	1
1.1.2 Žile	6
1.2 Polifenolne spojine	13
1.2.1 Polifenoli	13
1.2.2 Zaščitni učinki polifenolnih spojin na srčno-žilni sistem.....	16
1.2.3 Piknogenol®.....	16
1.3 Navadna jelka (Abies alba, bela jelka, hoja)	18
1.4 Izvleček iz lubja navadne jelke.....	18
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	20
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 Materiali.....	22
3.1.1 Izvleček iz lubja navadne jelke	22
3.1.2 Poskusne živali	22
3.1.3 Reagenti in pribor, ki so bili uporabljeni pri izolaciji podganje aorte.....	23
3.1.4 Reagenti in pribor, ki so bili uporabljeni pri izolaciji podganjega srca	23
3.1.5 Reagenti in raztopine, ki so bili uporabljeni pri poskusih na žilnih obročkih....	23
3.1.6 Reagenti in raztopine, ki so bili uporabljeni pri poskusih na izoliranih srcih	24
3.1.7 Uporabljen pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na žilnih obročkih.....	25
3.1.8 Uporabljen pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na izoliranih srcih	25
3.2 Metode pri poskusih z izolirano podganjo aorto	27
3.2.1 Žrtvovanje živali in priprava žilnih obročkov	27
3.2.2 Nameščanje žilnih obročkov na napravo za poskuse na izoliranih žilah	27
3.2.3 Stabilizacija žilnih obročkov	28
3.2.4 Preverjanje intaktnosti endotelija	28
3.2.5 Ugotavljanje delovanja izvlečka iz lubja navadne jelke na odzivnost žilnih obročkov – protokol poskusov	29
3.2.6 Obdelava podatkov	32
3.3 Metode pri poskusih z izoliranim podganjim srcem	33
3.3.1 Žrtvovanje živali in priprava izoliranega podganjega srca	33
3.3.2 Nameščanje src na aparat po Langendorffu	33
3.3.3 Potek poskusov	33
3.3.4 Merjene spremenljivke	34
3.3.5 Obdelava podatkov	35
4 REZULTATI.....	36
4.1 Poskusi na izolirani podganji aorti	36

4.2	Poskusi na podganjem srcu.....	38
4.2.1	Hitrost sproščanja LDH.....	38
4.2.2	Koronarni pretok	40
4.2.3	Frekvenca	42
4.2.4	Tlak v levem prekatu.....	44
4.2.5	Trajanje aritmij.....	45
5	RAZPRAVA	48
5.1	Razprava o materialih in metodah	48
5.1.1	Izvleček iz lubja bele jelke	48
5.2	Poskusne živali	49
5.2.1	Izolirani žilni obročki podganje aorte	50
5.2.2	Model izoliranega podganjega srca.....	50
5.3	Razprava o rezultatih	51
5.3.1	Poskusi na izoliranih žilnih obročkih.....	51
5.3.2	Poskusi na izoliranih podganjih srcih.....	52
6	ZAKLJUČEK.....	56
7	LITERATURA.....	57

POVZETEK

Izhodišče: Za srčno žilne bolezni je značilna oslABLJena endotelijska funkcija, ki prizadene zmožnost vazodilatacije in je eden najzgodnejših patoloških pojavov v žilju. Raziskave so pokazale, da vnos polifenolnih spojin zmanjša verjetnost nastanka srčno-žilnih bolezni. Polifenolne spojine so tudi glavne sestavine izvlečka iz lubja navadne jelke, zato nas je zanimalo, ali se bodo pokazali ugodni vplivi ob inducirani srčni okvari in ali izvleček vpliva na širitev žil.

Namen: Namen naše raziskave je ovrednotiti akuten vpliv izvlečka lubja navadne jelke na odzivnost žilnih obročkov izolirane podganje torakalne aorte ter proučiti njegov morebiten zaščitni učinek pred ishemično/reperfuzijskimi okvarami izoliranega podganjega srca.

Metode: Poskuse smo izvedli na izoliranih aortah podgan. Sposobnost relaksacije smo preučevali tako, da smo obročke najprej skrčili z 0,1 mmol/L fenilefrinom, nato pa smo izzvali relaksacijo s kumulativnim dodajanjem izvlečka. Pri delu poskusov smo obročke najprej inkubirali v N ω -nitro-L-argininu in tako zavrli tvorbo dušikovega oksida. Izolirana podganja srca smo perfundirali z oksigenirano raztopino, ji dodali izvleček lubja jelke in nato srca izpostavili 40 minutni globalni ishemiji, čemur je sledila 50 minutna reperfuzija. Za oceno stopnje okvare srčne mišice, povzročene z ishemijo/reperfuzijo, smo merili naslednje spremenljivke: stopnjo sproščanja laktatne dehidrogenaze, pretok skozi koronarne arterije, moč kontrakcij levega prekata, frekvenco utripov srca in pogostost pojavljanja aritmij v reperfuziji.

Rezultati: Poskusi na podganji aorti kažejo, da ima izvleček lubja jelke sposobnost razširitve žile in deluje koncentracijsko odvisno. Inkubacija obročkov v N ω -nitro-L-argininu je relaksacijo z izvlečkom zavrila. Poskusi na podganjih srcih so pokazali, da je izvleček značilno znižal sproščanje laktatne dehidrogenaze in povišal koronarni pretok. Izvleček je značilno znižal trajanje v reperfuziji sprožene aritmije (prekatna fibrilacija, prekatna tahikardija, ekstrasistola).

Zaključki: V raziskavi smo potrdili, da ima akutno dodani izvleček lubja jelke sposobnost razširitve žil, deluje koncentracijsko odvisno in aktivira encim sintazo dušikovega oksida. Akutno dodani izvleček je značilno zmanjšal ishemično/reperfuzijsko poškodbo srca, kar se je

pokazalo kot znižanje encimov, ki nakazujejo odmrtnje srčne mišice, zvišanje koronarnega pretoka in skrajšanje trajanja srčnih aritmij.

ABSTRACT

Background: Cardiovascular disease is characterized by endothelial dysfunction, which affects the ability of vasodilatation and is one of the earliest pathological events in the vasculature. Various studies have indicated that the intake of polyphenolic compounds is associated with a reduced incidence of cardiovascular disease. Polyphenol compounds are also the main constituents of silver fir extract so we wanted to find out favourable effects on induced heart failure and or if the extract affects blood vessel dilatation.

Aim: The aim of our study is to assess the acute influence of silver fir extract on the responsiveness of the rat aortic rings and to study the effect of silver fir extract on the development of myocardial injuries caused by ischemia/reperfusion on isolated rat hearts.

Methods: The experiments were carried out on the isolated thoracic rat aortas and rat hearts. Aortic rings were pre-contracted with 0.1 mmol/L phenylephrine. After that we induced relaxation with the cumulative addition of the extract. In order to characterize the involvement of NO, some aortic rings were exposed to the N ω -nitro-L-arginine. The isolated rat hearts were perfused with oxygenated solution and then subjected to 40 min zero-flow ischemia, followed by 50 min reperfusion. The severity of myocardial damage caused by ischemia/reperfusion was assessed by post ischemic changes in the following registered parameters: lactate dehydrogenase release rate, coronary flow, left ventricular pressure, heart rate and duration of arrhythmias during reperfusion.

Results: The experiments on rat aorta suggest that the silver fir extract has the ability to cause vasorelaxation and acts concentration dependently. Incubation of the rings in N ω -nitro-L-arginine inhibited vasorelaxation. The experiments on rat hearts showed that the extract significantly reduced the release of lactate dehydrogenase and increased coronary flow. The extract significantly reduced the duration of reperfusion-induced arrhythmias (ventricular fibrillation, ventricular tachycardia, extrasystoles).

Conclusions: In this study we confirmed that the acute application of silver fir extract causes vasorelaxation, acts concentration dependently and activates the enzyme nitric oxide synthase. The acute application of the extract significantly reduced ischemic/reperfusion injury of the

heart which reflected as a reduction of enzymes that indicate death of the heart muscle, increased coronary flow and as a decrease of arrhythmia duration.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat
Ang II	angiotenzin II
ATP	adenozin trifosfata
A-V	atrioventrikularni vozal
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
CK	kreatinska kinaza
EDHF	hiperpolarizacijski dejavniki endotelijskega izvora
EDRF	sprostitutveni faktor endotelijskega izvora
EKG	elektrokardiogram
eNOS	endotelijska NOS
ET	endotelin
ET-1	endotelin-1
iNOS	inducibilna iNOS
I/R okvara	ishemično/reperfuzijska okvara
K-H raztopina	Krebs-Henseleit raztopina
L [•]	lipidni radikal
LDH	laktatna dehidrogenaza
LDL	lipoproteini z nizko gostoto
L-NNA	N ω -nitro-L-arginin
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF- κ B	jedrni faktor-kapa B
nNOS	nevronska NOS
NOS	sintaza dušikovega oksida
oxLDL	oksidirani LDL
PF	prekatna fibrilacija
PPU	prekatni prezgodnji utripi
PT	prekatna tahikardija
ROS	reaktivne kisikove spojine
S-A	sinoatrialni vozal
SOD	superoksid dismutaza

1 UVOD

1.1 Srčno-žilni sistem

Srčno-žilni sistem sestavljajo srce, sistemski krvni obtok (arterijski in venski) ter pljučni krvni obtok (1). Je transportni sistem, ki prenaša kri in limfo do in iz tkiv v telesu. Sestavni elementi krvi vključujejo celice, hranila, odpadne produkte, hormone in protitelesa (2).

Krvne žile ustvarjajo pot, po kateri kri kroži do in iz vseh delov telesa. Srce črpa kri skozi arterijski sistem pod visokim tlakom. Kri se vrača v srce pod nizkim tlakom skozi venski sistem s pomočjo negativnega tlaka v prsni votlini med vdihom in mišične sile v nogah, ki stisne vene in iztisne kri proti srcu. Krvne žile so urejene tako, da lahko kri iz srca hitro doseže mrežo ozkih, tankih kapilar v tkivih ali bližini tkiv v vsakem delu telesa (2).

1.1.1 Srce

Srce je črpalka srčno-žilnega sistema, ki je sestavljeno iz štirih prostorov, desnega in levega preddvora (atrija), ter desnega in levega prekata (ventrikla), skozi katere črpa kri. Med preddvoroma in prekatoma so zaklopke, ki preprečujejo vračanje krvi. Septuma ločujeta desno in levo polovico srca. Desni preddvor prejme kri, ki se vrača iz telesa po spodnji in zgornji votli veni, ki sta največji veni v telesu. Iz desnega preddvora potuje kri v desni prekat, od koder jo srce črpa v pljuča po pljučnih arterijah, kjer kri oksigenira. Levi preddvor prejme oksigenirano kri, ki se vrača iz pljuč po štirih pljučnih venah. Levi prekat prejme kri iz levega preddvora in jo črpa v aorto, od koder kri potuje po celotnem telesu (2).

Histološka zgradba srca je podobna zgradbi žil (3). Steno srca gradijo srčno-mišične celice, ki skrbijo za kontrakcijo in omogočajo poganjanje krvi, vlaknasto ogrodje in prevodni sistem, ki skrbi za začetek in širitev električnega impulza, ki omogoča kontrakcijo srčne mišice (2). Srčno steno sestavlja notranja plast – endokard, srednja plast – miokard in zunanja plast – epikard. Osrednji del srca predstavlja fibrozni skelet, ki služi kot nasadišče srčnih mišičnih celic in zaklopk. Endokard ima podobno zgradbo kot tunika intima arterij mišičnega tipa. Na meji med endokardom in miokardom je subendokard, ki je sestavljen iz tanke plasti veziva. Vezivo v steni prekatov vsebuje tudi majhne krvne žile in živce ter veje prevodnega sistema

srca. Srčne zaklopke so sestavljene iz dvojne plasti endokarda. Endotelij srca se nadaljuje v endotelij krvnih žil, ki vstopajo in zapuščajo srce (3).

Miokard je sestavljen iz dveh ločenih sistemov – delovne mišičnine in prevodnega sistema srca. Srčne mišične celice (kardiomiociti) so urejene v tri krožno potekajoče plasti, ki se pripenjajo na fibrozni skelet srca. Srčno aktivnost uravnava dva nadzorna sistema. Prvi je notranji prevodni sistem srca, drugi je sistem živčnih vlaken avtonomnega živčnega sistema (3).

Epikard prekriva srce z zunanje strani. Je z mezotelijem pokrita plast veziva, bogata z maščobo. V epikardu potekajo glavne žile, ki srce oskrbujejo. Med mišičnimi vlakni miokarda so številni aferentni živčni končiči (3).

Intrinzična regulacija srčnega ritma

Srce se ritmično krči neodvisno od živčnih dražljajev s pomočjo prevodnega sistema srca, kjer imata glavno vlogo sinoatrialni vozle (S-A) in atrioventrikularni vozle (A-V). S-A je znan kot ritmovnik, zgrajen iz specializiranih mišičnih celic in leži ob vstopu zgornje votle vene v desni preddvor. S-A vozle sproži impulz, ki se širi vzdolž srčno mišičnih vlaken preddvora na A-V vozle, od koder se prevede do prekatov po vlaknastem ogrodju preko Hisovega snopa. Slednji se razdeli na dve manjši veji in nato še na subendotelijske veje, imenovane Purkinjeva vlakna. Prevodni sistem tudi koordinira krčenje preddvorov in prekatov (3).

Sistemska regulacija delovanja srca

Srce je oživčeno z obema vejama avtonomnega živčnega sistema. Avtonomni živci regulirajo srčni ritem glede na trenutne potrebe srca. Parasimpatična vlakna se končajo v S-A in A-V vozlih in segajo v miokard. Simpatična vlakna oživčujejo S-A in A-V vozla ter segajo v miokard in preko epikarda dosega koronarne arterije. Avtonomna vlakna regulirajo moč impulzov, ki izhajajo iz S-A vozla. Simpatični del povzroči povečanje kontrakcije, parasimpatični del pa povzroči zmanjšanje kontrakcije. Specializirani senzorični živčni receptorji za refleksni odziv se nahajajo v steni velikih krvnih žil blizu srca. Delujejo kot:

- Baroreceptorji – zaznavajo krvni tlak. Nahajajo se v karotidnem sinus, aortnem loku in levem srčnem prekatu.

- Kemoreceptorji – zaznavajo spremembe v koncentraciji kisika, ogljikovega dioksida in pH. Nahajajo se v karotidnem sinusu in aortnem loku (3).

Elektrokardiogram (EKG)

EKG je grafični zapis električne aktivnosti srca. Normalni elektrokardiogram je sestavljen iz P vala, QRS kompleksa in T vala. P val predstavlja električni potencial, ki ga ustvari depolarizacija preddvorov preden se prične kontrakcija preddvorov. QRS kompleks predstavlja depolarizacijo prekatov, T val pa predstavlja repolarizacijo prekatov. Val repolarizacije preddvorov v EKG ni viden, saj je ponavadi skrit v QRS kompleksu, ki ima veliko večjo amplitudo (4).

Iz EKG zapisa lahko razberemo različne vrste aritmij, ki predstavljajo vse spremembe srčnega ritma razen normalnega sinusnega ritma. Poznamo naslednje vrste aritmij: asistolija, prekatna fibrilacija (PF), prekatna tahikardija (PT) in prekatni prezgodnji utripi (PPU). Terminologija aritmij v diplomskem delu je navedena v skladu z Lambethovo konvencijo (5). Asistolija se kaže kot raven EKG signal, zato je srčna frekvenca nič. Prekatna tahikardija predstavlja sklop štirih ali več zaporednih prekatnih prezgodnjih utripov. Ritem je nenormalno hiter, pri človeku običajno več kot 150 utripov/min, s širokimi QRS kompleksi. Pri podganjem srcu prekatna tahikardija doseže frekvenco 500-600 utripov/min. Generira se v prekatu, pod Hisovim snopom. Prekatna fibrilacija je signal, pri katerem ne moremo več ločiti posameznih QRS kompleksov, zato tudi ne moremo določiti frekvence. Prekatni prezgodnji utripi ali ekstrasistole so prezgodnje kontrakcije prekata, ki jih prepoznamo po prezgodnjih QRS kompleksih glede na P val (5).

Ishemično/reperfuzijska poškodba srca

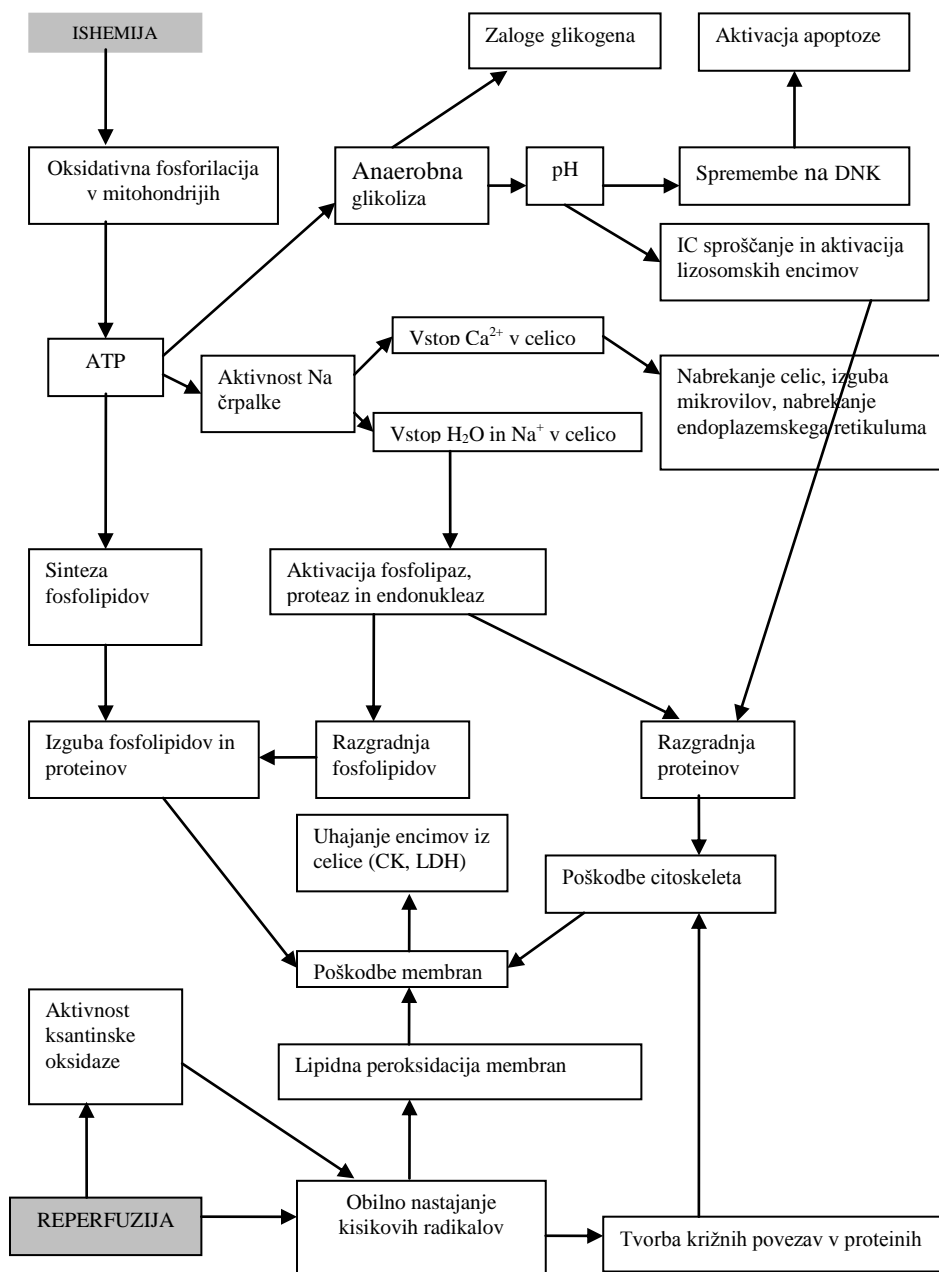
Najpogostejši vzrok smrtnosti v razvitih deželah sveta je še vedno ishemična bolezen srca, bodisi kot posledica akutnega dogodka (akutni miokardni infarkt, nenadna srčna smrt zaradi motenj ritma) ali pa dalj časa napredujočega srčnega popuščanja (4).

Ishemija srčne mišice se pojavi, ko pride do porušanja ravnotežja med dotokom krvi in potrebami po kisiku in drugih esencialnih hranilih. Do tega najpogosteje privedejo mehanske spremembe, ki povzročijo bodisi zoženje ali pa celo zaprtje koronarne arterije, kar je lahko

posledica ateroma, tromboze, spazma, embolusa ali koronarnega vnetja, ipd. Zmanjšana oskrba s kisikom je lahko tudi posledica anemije, karboksihemoglobinemije ali hipotenzije, ki zmanjša koronarni perfuzijski tlak. Ishemija srčne mišice se najpogosteje pojavi kot rezultat obstruktivne koronarne arterijske bolezni v obliki ateroskleroze (6).

Na celičnem nivoju ishemija spremeni zgradbo celičnih membran, zavre celično dihanje, zavre sintezo proteinov in poškoduje genetski aparat. Povzroči tudi porabo zalog adenozin trifosfata (ATP), posledično pride do porušanja delovanja ionskih črpalk, zviša se stopnja anaerobne glikolize, pH v celici se zniža. V citosol vdre večja količina kalcijevih (Ca^{2+}) ionov. Celice začnejo nabrekati zaradi porušenega ravnotežja natrijevih (Na^+) in kalijevih (K^+) ionov. Ob dolgo trajajoči ishemiji pride do nepovratnih sprememb, kot so vakuolizacija mitohondrijev, kopičenje Ca^{2+} v celici, uhajanje lizosomskih encimov v citoplazmo, izguba membranskih fosfolipidov in uhajanje encimov (kreatinska kinaza - CK, laktatna dehidrogenaza - LDH) iz celic (7, Slika 1).

Obseg preživetja mišičnih celic in obnovitev delovanja miokarda po ishemiji je odvisno od reperfuzije, ki ponovno vzpostavi dotok krvi in tako pomaga odpraviti okvare, ki so nastale med ishemijo (8). Pojavi pa se specifična okvara zaradi same reperfuzije (9). Celotni okvari pravimo ishemično/reperfuzijska (I/R) okvara miokarda, ki se kaže v obliki kontraktilne oslabelosti ali otrplosti miokarda, reperfuzijskih aritmij, odsotnosti koronarnega pretoka, sproščanja znotrajceličnih encimov ter pospešitve nekroze okvarjenih celic (8). Ob ishemiji in reperfuziji nastajajo tudi večje količine radikalov. Nastajajo lahko znotraj celice, v intersticijskem prostoru ali v znotrajžilnem prostoru. Glavni predstavniki radikalov in reaktivnih kisikovih spojin so superoksidni anion, vodikov peroksid in hidroksilni radikal. Radikali v celicah povzročajo lipidno peroksidacijo membran, poškodbe v molekulah deoksiribonukleinskih kislin (DNK) in tvorbo križnih povezav v proteinih in posledično izgubo njihove funkcije (7,10). V normalnih razmerah količina antioksidantov, ki je normalno prisotna v celicah, zadostuje za zaščito srca pred normalnim nastajanjem radikalov. Ob ishemično/reperfuzijski poškodbi pa so zaloge antioksidantov nezadostne. To lahko vodi v nastanek oksidacijske okvare, pri kateri srce ni več sposobno zagotoviti ustreznega iztisnega volumna (11).



Slika 1: Prikaz dogajanj pri ishemično/reperfuzijski poškodbi srca. ATP- adenzin trifosfat, CK- kreatinin kinaza, LDH- laktatna dehidrogenaza, IC – znotraj celični. Prirejeno po (12).

Ateroskleroza

Najpogostejši vzrok za zmanjšan koronarni krvni pretok so aterosklerotične spremembe koronarnih arterij, kjer se v notranjo žilno plast pričnejo nalagati večje količine holesterola in celic iz krvi. Zaradi intenzivnega procesa vnetja in oksidativnega stresa proces ateroskleroze postopoma napreduje, nastanejo aterosklerotični plaki, ki se postopoma večajo in bočijo v lumen žile ter tako zmanjšajo ali celo ustavijo krvni pretok (4).

Ateroskleroza je kronična bolezen, ki poteka in napreduje počasi. Prva stopnja v razvoju ateroskleroze je poškodba endotelijske celice - endotelna disfunkcija oz. okrnjeno delovanje endotelija. Poškodbo lahko povzročijo dejavniki znotraj žilne stene (velike strižne sile in tlak v steni žile, imunske poškodbe, presnovne poškodbe, okužbe, reaktivne kisikove spojine in drugi radikali) kot tudi dejavniki zunaj žilne stene (sestava in koncentracija lipidov v plazmi, koagulabilnost krvi). Pomembno vlogo v razvoju ateroskleroze imajo poleg endotelijskih celic še levkociti in gladkomišične celice žilne stene, kjer naj bi potekala ena najpomembnejših metabolnih sprememb v razvoju ateroskleroze: oksidacija lipoproteinov z nizko gostoto (LDL) v oksidirane LDL (oxLDL) (13).

Miokardni infarkt

Ob akutni koronarni zavori pride do prekinitve krvnega pretoka, ostane le nekaj kolateralnega pretoka iz okoliških žil. To v kombinaciji s postopno razširitvijo lokalnih žil povzroči, da postane območje prenapolnjeno s stoječo krvjo. V kasnejših stopnjah se poveča prepustnost žilnih sten, nastane tkivni edem, srčne mišične celice začnejo nabrekati zaradi zmanjšanega celičnega metabolizma. Če srčna mišica nekaj ur ne dobi dotoka krvi, odmre (4).

Model izoliranega podganjega srca

Model izoliranega podganjega srca uporabljamo za ugotavljanje vplivov učinkovin na izolirano srce ali na ishemično/reperfuzijsko okvaro srčne mišice. Model je uporaben zlasti za preučevanje direktnih učinkov preiskovanih snovi na srčno funkcijo ter za preučevanje antiaritmogenih lastnosti zdravil in drugih učinkovin (14).

1.1.2 Žile

Ožilje je sestavljeno iz arterij elastičnega tipa, arterij mišičnega tipa, arteriol, kapilar, venul in ven. Različni tipi žil se med seboj razlikujejo v zgradbi žilne stene (2).

Normalna arterijska stena

Glavna funkcija arterij je dovajanje krvi mikrocirkulaciji, kar jim omogočajo njihove stene s svojo neprepustnostjo za sestavine krvi in spremenljivim mišičnim tonusom. Arterijsko steno

od znotraj navzven sestavljajo intima, medija in adventicija. Intimo sestavljata plast endotelijskih celic in pod njo ležeča bazalna lamina. Plast endotelijskih celic deluje kot pregrada med krvjo in žilno steno in preprečuje agregacijo trombocitov, vstop cirkulirajočim monocitom-makrofagom v arterijsko steno ter uravnava funkcijo gladkih mišičnih celic spodnje plasti. Medijo tvorijo gladkomišične celice, ki s svojim krčenjem in relaksacijo spreminjajo tonus arterijske stene, ter zunajcelični matriks (elastin, kolagen in proteoglikani), ki vzdržujejo obliko stene (2).

Endotelijske celice igrajo pomembno vlogo v homeostazi krvi. Funkcionalne lastnosti se spreminjajo v odziv na različne dražljaje. Proces, poznan kot endotelijska aktivacija, je odgovoren za patogenezo številnih žilnih bolezni (npr. ateroskleroza). Aktivacijo endotelija povzročijo bakterijski in virusni antigeni, citokini, lipidni produkti in hipoksija. Aktivirane endotelijske celice izločajo različne vrste citokinov, limfokinov, rastne faktorje, vazokonstriktorne in vazodilatacijske molekule, kot tudi molekule, ki nadzorujejo koagulacijo (2).

Po vsebnosti elastina delimo arterije v arterije elastičnega tipa, ki vsebujejo veliko elastina in arterije mišičnega tipa, ki vsebujejo malo elastina in veliko gladkih mišičnih celic. Velike arterije, kot so aorta, pljučna arterija in subklavijska arterija, so elastičnega tipa, srednje arterije pa so mišičnega tipa. Adventicija je sestavljena iz rahlega veziva (fibroblasti, zunajcelični matriks in vasa vasorum) (2).

Struktura elastičnih arterij omogoča raztezanje žilne stene med krčenjem srca (sistolo) in zoženje krvne žile med relaksacijo srca (diastolo), kar omogoča razporeditev konstantnega krvnega tlaka in pretoka krvi (2).

Aorta

Aorta je arterija elastičnega tipa, ki dvigajoče izhaja iz levega prekata, se obrne v zavoj, ki ga imenujemo aortni lok in nato potuje navzdol proti trebušni votlini. Ima tri plasti. V tanki notranji plasti (tunika intima) so endotelijske celice, vezivo, posamezne gladke mišične celice in elastična vlakna. Najdebelejša je srednja plast (tunika medija), ki je iz številnih gladkih mišičnih celic, ki so sintetizirale številne fenestrirane membrane (2).

Krčenje in vzbujanje gladke mišice

Gladke mišice vsebujejo aktinske in miozinske filamente in imajo podobne kemijske značilnosti kot aktinski in miozinski filamenti skeletnih mišic. Za razliko od skeletnih mišic ne vsebujejo troponinskega kompleksa, ki je potreben za kontrolo krčenja skeletne mišice. Raziskave so pokazale, da se aktin pri gladki mišici veže na miozin na enak način, kot aktin pri skeletni mišici. Proces krčenja se aktivira s kalcijevimi ioni, ob tem pa se adenozin trifosfat (ATP) razgradi v adenozin difosfat (ADP), kar zagotovi energijo za proces krčenja. Gladke mišice nimajo enake razporeditve aktinskih in miozinskih filamentov kot skeletne mišice, ampak imajo veliko število aktinskih filamentov pripetih na optično gosta telesa. Nekatera membranska telesa mejnih celic pa so povezana skupaj s proteinskimi mostovi, preko katerih se prenaša sila krčenja iz ene celice na drugo. Med številnimi aktinskimi filamenti pa je vrinjenih nekaj miozinskih filamentov (4, 15).

Regulacija kontrakcije s kalcijevimi ioni

Kot pri skeletnih mišicah, je tudi pri gladkih za začetek kontrakcije potrebno povečanje znotrajcelične koncentracije kalcijevih ionov. Slednje je lahko povzročeno z živčno stimulacijo mišičnega vlakna, hormonsko stimulacijo, nategom vlakna ali pa s kemijskimi spremembami v okolici vlakna. Gladke mišice ne vsebujejo troponina, regulatornega proteina, ki ob aktivaciji s kalcijevimi ioni povzroči krčenje skeletne mišice. Namesto troponina gladka mišična celica vsebuje kalmodulin. Čeprav je podoben troponinu po tem, kako reagira s kalcijevimi ioni, se razlikuje v načinu, kako izzove kontrakcijo.

Aktivacija in sledeča kontrakcija potekata v naslednjem zaporedju: Najprej se Ca^{2+} ioni vežejo s kalmodulinom, nato pa se kompleks kalmodulin - Ca^{2+} poveže in aktivira miozinsko kinazo, ki je fosforilajoči encim. Sledi aktivacija ene izmed lahkih verig vsake miozinske glave, ki se fosforilira kot odgovor na miozinsko kinazo. Ko ta veriga ni fosforilirana, se cikel vezave in sprostitve miozinske glave ne pojavi. Ko pa je veriga fosforilirana, ima glava sposobnost vezave z aktinskim filamentom in povzroči celotni ciklični proces, ki povzroči mišično kontrakcijo.

Ko koncentracija Ca^{2+} pade pod kritično mejo, se prej omenjeni proces obrne, razen fosforilacije miozinske glave. Obraten proces zahteva drug encim, miozinsko fosfatazo, ki se

nahaja v gladko mišični celici, in razcepi fosfat od lahke verige. Takrat se cikel ustavi in krčenje preneha.

V nasprotju s skeletno mišičnimi vlakni, ki so aktivirani samo z živčnim sistemom, je lahko gladka mišica stimulirana z veliko različnimi tipi signalov (4, 15).

Najpomembnejša živčna prenašalca, ki se izločata iz avtonomnih živcev in vplivata na gladko mišico, sta acetilholin in noradrenalin, vendar se nikoli ne sprostita iz istega živčnega vlakna. Acetilholin deluje v gladko-mišičnih vlaknih nekaterih organov kot ekscitatorni prenašalec, v drugih pa kot zaviralni prenašalec. Acetilholin in noradrenalin drug drugega zavirata. Slednje je odvisno od tega, na kateri receptorski protein se prenašalec veže. Nekateri proteini povzročijo vzdraženje, medtem ko so drugi zaviralni. Torej tip receptorja določi, ali bo gladka mišica zavrtta ali vzdražena in tudi določi, kateri od teh dveh povzroči vzbujenje ali zaviranje.

Gladka mišica je zelo kontraktilna in se hitro odzove na spremembe lokalnih kemijskih pogojev v obdajajoči intersticijski tekočini. Nasprotno (vazodilatatorno) pa delujejo specifični dejavniki iz krvi v lokalnem območju tkiva, med katere prištevamo: pomanjkanje kisika v lokalnem tkivu, presežek ogljikovega dioksida (CO_2), povečana koncentracija vodikovih protonov (H^+). Ostali dejavniki, ki povzročijo vazodilatacijo so adenzin, mlečna kislina, povečana količina K^+ ionov, zmanjšanje koncentracije Ca^{2+} in povišana telesna temperatura (4, 15).

Zunajcelična koncentracija Ca^{2+} nima vpliva na moč kontrakcije skeletne mišice, vpliva pa na kontrakcijo gladkih mišic. Ko koncentracija zunajceličnega kalcija pade pod določeno mejo, kontrakcija skoraj preneha. To velja tudi za srčno mišico (4, 15).

Da pride do relaksacije, je pomembno odstraniti kalcijeve ione iz znotrajcelične tekočine aktinskih in miozinskih filamentov, pri čemer ima pomembno vlogo kalcijeva črpalka. Slednja črpa kalcijeve ione iz mišičnega vlakna v ekstracelularno tekočino ali v sarkoplazemski retikulum (4, 15).

Ravnovesje med kontrakcijo in relaksacijo gladkih mišičnih celic v mediji nadzoruje
krvni pretok in bazalni tonus

Vazokonstrikcijo povzročijo živčni impulzi ali cirkulirajoči hormoni. Nasprotno pa relaksacija gladke mišične celice povzroči vazodilatacijo (poveča luminalni premer žil), zmanjša žilni upor in sistemski krvni tlak. Vazodilatacija se pojavi kot odziv na snovi, ki jih proizvajajo endotelijske celice, imenovane sprostitveni faktor endotelijskega izvora (EDRF). Najpomembnejši EDRF so dušikov oksid (NO) in njegove sorodne substance, ki jih sproščajo endotelijske celice v arterijah, krvne kapilare in celo limfne kapilare (2, 15).

Prostanoidi

Prostaglandin I_2 je mediator, ki z vezavo na prostanoidne receptorje povzroča sproščanje gladkih mišic in zavira agregacijo trombocitov preko aktivacije adenilatne ciklaze. Endotelijske celice mikrožilja sintetizirajo prostaglandin E_2 , ki je direktni vazodilatator in tudi zavira sproščanje noradrenalina iz končičev simpatičnih vlaken. Prostaglandinska endoperoksidna intermediata (prostaglandin G_2 , prostaglandin H_2), vazokonstriktorna faktorja, ki izvirata iz endotelija, delujeta preko tromboksanskih receptorjev.

Dušikov oksid

NO se konstantno sprošča v uporovnih žilah in preko aktivacije gvanilatne ciklaze deluje kot vazodilatator. Poleg tega tudi zavira proliferacijo žilnih gladkih mišičnih celic, adhezijo in agregacijo trombocitov ter adhezijo in migracijo monocitov.

Vazoaktivni peptidi

Endotelij izloča številne vazoaktivne peptide. C-natriuretični peptid in adrenomedulin sta vazodilatatorja, ki delujeta preko cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP) in cikličnega adenozin monofosfata (cAMP). Angiotenzin II, ki ga pretvarja angiotenzinska konvertaza na površini endotelijskih celic, in endotelin sta močna vazokonstriktorna peptida endotelijskega izvora.

Hiperpolarizacijski dejavniki endotelijskega izvora (EDHF)

Od endotelija odvisna dilatacija, kot odgovor različnih mediatorjev (vključno z acetilholinom in bradikininom), je v nekaterih žilah prisotna kljub popolnemu zaviranju sinteze prostaglandina in NO (10, 15).

Okrnjeno delovanje endotelija

Okrnjeno delovanje endotelija je ena izmed najzgodnejših funkcionalnih sprememb arterij. Kaže se kot zmanjšano sproščanje oziroma razpoložljivost NO in pomeni nesorazmerje med delovanjem spojin iz endotelija, ki žilo širijo ali krčijo (16, 17).

Naloga endotelija je vzdrževanje žilnega tonusa preko spojin, ki žilo krčijo ali širijo, vzdrževanje netrombogene žilne površine preko ravnotežja med trombozo in fibrinolizo, poleg tega pa deluje tudi kot selektivna pregrada, saj nadzoruje prehod krvnih celic in makromolekul v žilno steno in preko nje. Sodeluje tudi pri nadzorovanju razraščanja pod njim ležečih gladkomišičnih celic (18, 19 20). Ko je vsaj ena izmed teh nalog okrnjena, nastopi stanje endotelijske disfunkcije oz. okrnjenega delovanja endotelija, ki predstavlja eno izmed najzgodnejših faz v procesu aterogeneze (19, 21).

Sinteza in delovanje NO

Dušikov oksid ima kratek razpolovni čas (le nekaj sekund). Nastaja preko oksidacije enega od terminalnih dušikovih atomov v gvanidinski skupini L-arginina, proces katalizira encim sintaza dušikovega oksida (NOS). Za reakcijo so poleg L-arginina potrebni še molekularni kisik ter kofaktorja 5,6,7,8-tetrahidrobiopterin in reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH). Encim NOS nastopa v treh izooblikah: endotelijska NOS (eNOS), nevronska (nNOS) in inducibilna (iNOS). nNOS in eNOS se izražata konstantno, njuno aktivnost pa uravnava znotrajcelična koncentracija kalcijevih ionov. iNOS se izraža v makrofagih po stimulaciji preko citokinov, lipopolisaharidov in drugih imunološko pomembnih dejavnikov (18).

Endotelijska NOS ima vezavni mesti za molekulo hema in kalmodulina, ki sta nujna za njeno pravilno delovanje. Aktivacija poteka po dveh poteh. Glavni dražljaj za aktivacijo je povečanje znotrajcelične koncentracije kalcijevih ionov v endotelijski celici. Vezava kalcija na kalmodulin povzroči vezavo nastalega kompleksa na eNOS, elektroni se prenesejo z NADPH na oksigenazno domeno eNOS, ki vsebuje hem skupino, nastaneta citrulin in NO (22). Drugi način aktivacije je neodvisen od kalcijevih ionov. Poteka preko fosforilacije eNOS. Aktivacijo sproži porast strižne napetosti, posledično pa se zviša koncentracija NO (18).

Dušikov oksid, ki nastaja znotraj endotelijskih celic, prehaja do gladkomišičnih celic, kjer aktivira citosolni encim gvanilatno ciklazo, kar poveča tvorbo in znotrajcelično koncentracijo cikličnega gvanozin monofosfata, zavre kontraktilni aparat celice in povzroči sprostitvev gladkomišičnih celic. Poleg tega zavira tudi prekomerno razraščanje gladkomišičnih celic. Endotelijske celice izločajo NO tudi v žilno svetlino, kjer zavira adhezijo trombocitov in levkocitov na endotelij (18).

Mehanizmi nastanka okrnjenega delovanja endotelija

Ko postane delovanje endotelija okrnjeno, se ravnotežje med spojinami, ki žilo širijo in spojinami, ki žilo krčijo, poruši in premakne v smer nastajanja spojina, ki žilo krčijo. Ker delovanje endotelija ni več normalno, prihaja tudi do povečane prepustnosti endotelija, agregacije trombocitov, adhezije levkocitov in nastanka vnetnih citokinov, kar vse skupaj spodbuja napredovanje procesa ateroskleroze. Motena je od endotelija odvisna razširitvena sposobnost arterij, ki nastane predvsem zaradi motnje v sintezi, sproščanju in razpoložljivosti NO (18, 22).

Možni mehanizmi, ki vodijo do znižanja koncentracije NO, so zaviranje izražanja eNOS, zmanjšanje aktivnosti eNOS in zmanjšanje razpoložljivosti NO. Zaviranje izražanja eNOS je posledica delovanja dejavnikov na nivoju genskega izražanja. Ti dejavniki so: tumor nekrotizirajoči dejavnik alfa, lipopolisaharidi, hipoksija, visoke koncentracije oksidiranega LDL holesterola. Do zmanjšane aktivnosti eNOS pride, ko je v celici znižana koncentracija arginina ali tetrahidrobiopterina. Koncentracija tetrahidrobiopterina se zmanjša zaradi zmanjšane sinteze, kar je lahko posledica inzulinske rezistence, kajenja, hiperholesterolemije in povečanega izražanja provnetnih citokinov. Do znižane koncentracije arginina pa pride zaradi lokalnega ali sistemskega vnetnega dogajanja, kar poveča aktivnost arginaze, ki je ključni encim za pretvorbo arginina v ornitin in sečno kislino. Delovanje eNOS lahko zavirajo tudi endogeni zaviralci, kot je npr. asimetrični dimetilarginin, in pa izoprenoid geranilgeranilpirofosfat, molekula, ki nastaja v sintezni poti holesterola (22).

Zmanjšanje razpoložljivosti NO povzročita oksidativni stres in vnetje. Zmanjšata tudi aktivnost eNOS. Reaktivne kisikove spojine (ROS) v povečanem obsegu nastajajo v področjih vnetja in poškodbe. Glavni viri ROS v žilni steni so NADPH-oksidaza, ksantinska oksidaza, mitohondriji in nesklepljena eNOS, pri kateri pride do razdruženja NADPH-

oksidacije/sinteze NO. Oksidativni stres poveča prepustnost endotelija in preko povečanega izražanja adhezijskih in kemotaktičnih molekul na njegovi površini spodbuja adhezijo levkocitov. ROS zavirajo delovanje NO in z njim tvorijo citotoksični peroksinitrit, ki poveča oksidacijo LDL in tako spodbuja proces ateroskleroze. Oksidirani LDL poveča tvorbo kaveolina-1, s čimer preko zaviranja delovanja eNOS zmanjša nastajanje NO (22).

1.2 Polifenolne spojine

1.2.1 Polifenoli

Polifenoli so zelo široka skupina spojin. So sekundarni metaboliti rastlin in imajo glavno vlogo pri zaščiti rastlin pred ultravijoličnimi žarki in patogeni (23). Sintetizirajo jih lahko le rastline in mikroorganizmi, živali in človek pa jih morajo pridobiti s hrano. Njihova skupna značilnost je aromatski obroč, na katerega je vezana ena ali več hidroksilnih skupin. Hidroksilne skupine so proste ali pa tvorijo etre, estre ali glikozide. Po tej definiciji bi lahko mednje uvrstili tudi alkaloidne in nekatere terpene, zato je za natančnejšo definicijo potreben biosintezni kriterij (24).

Polifenoli nastajajo po dveh biosinteznih poteh, in sicer preko šikimske kisline ter preko acetata. Sintezna pot preko šikimske kisline poteka od monosaharidov do aminokislin fenilalanina in tirozina, nato poteče deaminacija do cimetine kisline in njenih derivatov, kot so benzojska kislina, acetofenon, lignani, lignini in kumarini. Sinteza preko acetata pa poteka preko acetata do poliketidov, ki s ciklizacijo največkrat tvorijo policiklične produkte (kromoni, izokumarini, orcinoli, depsidi, ksantoni in kinoni). S kombinacijo obeh biosinteznih poti pa nastanejo flavonoidi, stilbeni, pironi, ksantoni...V sintezo se lahko vključi še mevalonat, kar vodi v nastanek mešanih derivatov šikimske kisline in mevalonata (nekateri kinoni, furano- in piranokumarini) ali mešanih derivatov acetata in mevalonata (kanabinoidi). Pri sintezi lahko sodelujejo tudi vsi trije prekursorji, tako nastanejo rotenoidi (24).

Flavonoidi

Flavonoidi so rastlinski pigmenti, odgovorni za barvo cvetov, sadežev in včasih listov (24, 25). Pomembni so za razmnoževanje rastlin (privabljajo žuželke), varujejo rastline pred

škodljivimi virusi, insekti, glivicami in ultravijoličnimi (UV) žarki ter vplivajo na oksidacijske in redukcijske procese v celici (25, 26). Najdemo jih v sadju, zelenjavi, zelenem čaju, rdečem vinu, soji in zdravilnih rastlinah (26).

Vsi flavonoidi (približno 4000 različnih spojin) imajo skupen biosintezni izvor in zato vsebujejo enak osnovni strukturni element 2-fenilkroman (2-fenilbenzopiran). Razdelimo jih glede na stopnjo oksidacije centralnega piranskega obroča, ki se lahko odpre in pretvori v furanski obroč (23).

Glikozidi flavonoidov so topni v vodi, aglikoni pa so bolj lipofilni (23). Sladkorna komponenta je lahko glukoza, galaktoza, aloza, apioza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, glukuronska ali galakturonska kislina. Največkrat gre za O-glikozide. Glikozilirana je lahko katerakoli hidroksilna skupina aglikona, največkrat pa na mestu 3 in 7. Manj pogosti so C-glikozidi (26).

Flavonoide razdelimo glede na aglikon na (26, 27):

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

Učinki flavonoidov

Flavonoidi se primarno uporabljajo za zdravljenje kapilarnih in venskih motenj. Sami ali v kombinaciji z drugimi učinkovinami so pogoste sestavine zdravil, ki zaščitno delujejo na žile, so venotoniki in se uporabljajo v flebologiji (23).

Študije so pokazale, da naj bi uživanje flavonoidov zmanjšalo smrtnost zaradi kardiovaskularnih bolezni. Predvideva se, da flavonoidi varujejo LDL pred oksidacijo. Pogosto se omenjajo kot protivnetne snovi, kar izhaja iz njihovih (*in vitro*) interakcij z levkociti, trombociti in metabolizmom arahidonske kisline. Znižujejo nivo holesterola v krvi,

delujejo diuretično, antibakterijsko in protivirusno *in vitro* ter inhibirajo rast tumorskih celic *in vitro* (23).

Biološka učinkovitost teh molekul pri človeku je na splošno majhna in učinki, opisani *in vitro*, so redko v korelaciji z učinki *in vivo*. Poleg tega je nekaj rezultatov pridobljenih z glikozidi, ki se najverjetneje hidrolizirajo z bakterijskimi glikozidazami v prebavnem traktu (23).

Čreslovine (tanini)

Zgodovinsko so tanini pomembni zaradi njihove strojilne sposobnosti. Strojenje je posledica tvorbe vezi med kolagenskimi vlakni v koži, kar povzroči odpornost na vodo, vročino in abrazijo. Zmožnost taninov, da se povežejo z makromolekulami, pojasni obarjanje celuloze, pektinov in proteinov ter adstringentno delovanje (23).

Tanini in makromolekule se povezujejo z vodikovimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami med fenolno skupino tanina in proteina ali drugega polimera (23).

Pri višjih rastlinah na splošno razlikujemo glede na strukturo in biogenetski izvor na hidrolizirajoče in kondenzirane tanine. Hidrolizirajoči tanini so estri sladkorja (ali sorodnega poliola) in različnega števila molekul fenolnih kislin. Sladkor je ponavadi glukoza. Kondenzirani tanini ali proantocianidi so polimerni flavani. Sestavljeni so iz flavan-3-olnih enot, povezanih z ogljikovimi vezmi (23).

Učinki čreslovin

Aplikacija zdravil, ki vsebujejo tanine, je omejena in izhaja iz njihove afinitete do proteinov. Ker so vodoodporni, pri dermalni uporabi ščitijo globlje plasti kože. Imajo tudi vazokonstriktorni učinek na majhne površinske žile. Z zmanjšanjem izgube tekočin in preprečevanjem zunanjih vplivov, tanini povečajo regeneracijo tkiva v primeru površinskih ran in opeklin. Pri peroralni uporabi imajo antidiaroično delovanje. Ne glede na aplikacijo pa imajo antiseptični učinek (antibakterijski in protiglivični), kar je dobrodošlo pri zdravljenju infekcijskih diarej in dermatitisa. *In vitro* so lovilci radikalov in zaviralci nastanka superoksidnih ionov. Odgovorni naj bi bili tudi za preventivni učinek pred nastankom okvar pri srčno-žilnih boleznih (23).

1.2.2 Zaščitni učinki polifenolnih spojin na srčno-žilni sistem

Študije s polifenolnimi spojinami so pokazale ugodne učinke na srčno-žilni sistem. Največ raziskav je bilo narejenih s polifenoli rdečega vina, kakava, črnega in zelenega čaja ter različnih vrst jagodičevja (maline, borovnice, brusnice...).

Poskusi s polifenoli iz rdečega vina so na podganah pokazali, da polifenoli preprečujejo z Ang II inducirano hipertenzijo in endotelijsko disfunkcijo in normalizirajo produkcijo superoksidnega aniona v žilah in ekspresijo podenote NADPH oksidaze (27). Študija pri ljudeh je pokazala, da uživanje polifenolov rdečega vina izboljša relaksacijo žil v povezavi z NO in EDHF, normalizira oksidativni stres, ekspresijo majhnih in srednjih kalijevih kanalov, aktiviranih s Ca^{2+} in komponente angiotenzinskega sistema (28). Podobno so pokazali poskusi na spontano hipertenzivnih podganah z izvlečkom iz malin. Izvleček je povzročil postopno zmanjšanje krvnega tlaka. Predvidevajo, da je verjeten mehanizem antihipertenzivnega učinka povezan z od endotelija odvisno relaksacijo, ker je izvleček povzročil značilno povečanje vrednosti serumskega NO in znižal vrednost plazemskega endotelina (ET). Poleg tega je izvleček povečal serumsko aktivnost superoksid dismutaze (SOD) in znižal vrednost malondialdehida, ki je pokazatelj oksidativnega stresa, kar nakazuje, da je zmanjšanje oksidativnega stresa pomemben element mehanizma antihipertenzivnega učinka (29).

V študiji z zelenim čajem so preučevali direktne učinke katehinov na funkcije srčne mišice. Ugotovili so, da epikatehin-3-galat in epigalokatehin-3-galat zmanjšata občutljivost srčnih filamentov na Ca^{2+} ione preko interakcije s srčnim troponinom C. Te komponente bi lahko bile uporabne za razvoj zdravil za zdravljenje hipertrofične kardiomiopatije, nastale zaradi povečane občutljivosti srčnih filamentov na Ca^{2+} , kar vodi v srčno popuščanje (30). Pri bolnikih s koronarno boleznijo pa je študija pokazala, da se po kratkotrajnem in dolgotrajnem uživanju črnega čaja poveča plazemska koncentracija flavonoidov – katehinov ter izboljša od endotelija odvisna razširitev brahialne arterije (31).

1.2.3 Piknogenol®

Piknogenol® (Pycnogenol®) je izvleček iz lubja francoskega obmorskega bora (*Pinus pinaster*). Je naravni antioksidativni izdelek in je močan lovilec radikalov, kot so kisikove in

dušikove reaktivne spojine. Vsebuje polifenolne komponente (katehin, taksifolin, procianidine z različno dolgimi verigami katehinskih in epikatehinskih enot, in fenolne kisline), ki izkazujejo učinke proti kroničnim in degenerativnim boleznim (32, 33, 34, 35).

Učinki naj bi bili tesno povezani z njihovo močno antioksidativno sposobnostjo in lovljenjem radikalov. Pokazalo se je, da ekstrakt stimulira intracelularno obrambo proti radikalom preko povečanja produkcije antioksidativnih encimov, poleg tega, da ima odlične sposobnosti lovljenja radikalov. Antioksidativne lastnosti so vsaj deloma zaslužne za njegov zaščitni učinek proti različnim srčno-žilnim boleznim, saj je povečan oksidativni stres eden izmed glavnih krivcev za razvoj hipertenzije (32).

Piknogenol naj bi ugodno deloval na srčno-žilni sistem (kot vazorelaksant), inhibiral naj bi angiotenzin-konvertazo in imel sposobnost povečati mikrocirkulacijo preko povečanja kapilarne prepustnosti (36). Študija s spontano hipertenzivnimi podganami je pokazala signifikantno zmanjšanje sistoličnega krvnega tlaka, izboljšanje žilne morfologije in endotelijske funkcije (37). Študija s sladkornimi bolniki tipa 2 pa je pokazala, da Piknogenol pomaga pri nadziranju bolezni in zmanjšanju dejavnikov tveganja za srčno-žilne bolezni ter zmanjšanju uporabe antihipertenzivov pri sladkornih bolnikih (38). Pri bolnikih s koronarnimi arterijskimi boleznimi dnevno uživanje ekstrakta izboljšuje mikrocirkulacijo in funkcijo trombocitov. Pri pacientih s hipertenzijo uživanje prehranskega dopolnila zmanjša koncentracijo plazemskega endotelina-1 (ET-1), medtem ko koncentracija NO naraste, kar kaže ugodne učinke na endotelijsko funkcijo. Zanimivo je tudi, da ekstrakt sam povzroči od endotelija odvisno vazorelaksacijo, kar je bilo dokazano v *in vitro* poizkusih na izoliranih podganjih obročkih. Ob dodatku zaviralca neselektivne NOS je bila vazorelaksacija zavrta. Ugotovili so, da je za vazorelaksacijo, ki jo povzroči ekstrakt, najbolj odgovorna frakcija oligomernih proantocianidinov. Študije so tudi pokazale, da je bila od endotelija odvisna vazorelaksacija posredovana s signalno potjo eNOS–NO–topna gvanilat ciklaza. Vazorelaksacijo je spremljala povečana ekspresija fosforilirane eNOS brez vpliva na celokupno koncentracijo eNOS. Fosforilacijsko mesto je bilo največkrat prepoznano na mestu Ser1177. Fosforilacija na tem mestu poveča aktivacijo eNOS, posredovano z vezavo Ca^{2+} /kalmodulin (32).

In vitro študije so pokazale, da izvleček iz lubja francoskega obmorskega bora inhibira peroksidacijo LDL, lipidno peroksidacijo v fosfolipidnih liposomih (39) in membranah

eritrocitov (40) ter z UVB-inducirano lipidno peroksidacijo v celicah. Uporaben naj bi bil pri preprečevanju ateroskleroze, saj so ugotovili, da zavira izražanje proteina, ki je zelo visoko izražen v makrofagih in aterosklerotičnih lezijah in sodeluje pri nastajanju penastih celic (36).

1.3 Navadna jelka (*Abies alba*, bela jelka, hoja)

Navadna jelka raste v srednji in delu južne Evrope. Njeno območje razširjenosti poteka po grebenih Apeninov prek jugovzhodnih Alp na Balkansko gorovje in Karpate. V Sloveniji je razširjena na območju jelovo-bukove združbe, ki porašča obsežne, razgibane visokokraške planote, grebene in vrhove dinarskega sveta. Jelka je podnebno občutljiva vrsta, saj ne prenese visokih poletnih in nizkih zimskih temperatur (41). Je zelo visoko drevo, ki doseže višino 55 m in več. Krošnja je piramidasta, pri starejših drevesih pri vrhu zaobljena. Skorja je gladka in svetlosiva. Igllice so sploščene, na vrhu zaobljene, temnozeleno, spodaj pa imajo dve srebrno beli črti, po katerih je jelka tudi dobila ime. Ko odpadejo, na vejici ostanejo okrogle neizbočene brazgotine. Storži so pokončni, 10-15 cm dolgi in ne odpadejo v celoti - ob zrelosti luske razpadejo, na veji ostane olesenelo vreteno (42).

1.4 Izvleček iz lubja navadne jelke

Raziskave na Fakulteti za farmacijo, na Univerzi v Ljubljani, so pokazale, da poleg bora tudi drugi iglavci vsebujejo podobne zmesi polifenolov, ki so enakovredna ali učinkovitejša alternativa pripravku Piknogenol®. V okviru diplomskega dela iz leta 2008 so ugotovili, da lubje navadne jelke predstavlja boljšo alternativo lubja obmorskega bora kot pa lubje navadne smreke. Ekstrakt lubja smreke ima namreč le 0,6-kratno, ekstrakt lubja jelke pa 1,6-kratno antioksidativno aktivnost Piknogenola, določeno z DPPH metodo. Na podlagi tekočinske kromatografije visoke ločljivosti so sklepali, da je lubje jelke tudi po vrstah spojin, ki jih vsebuje, bolj sorodno lubju bora, kot pa je lubje smreke (43). V okviru diplomskega dela iz leta 2011 so v izvlečku iz lubja bele jelke identificirali tri flavan-3-ole in tri dimere proantocianidinov: katehin, epikatehin, (epi)galokatehin, (epi)galokatehin-(epi)galokatehin in (epi)katehin-(epi)katehin (44).

V letu 2012 je na tržišče prišlo prehransko dopolnilo Abigenol®, ki vsebuje standardizirani izvleček iz skorje kočevske navadne jelke, pridobljen po patentiranem postopku. S posebno

ekstrakcijo iz skorje navadne jelke odstranijo sestavine, ki niso koristne ali primerne za uživanje, kot so: smole, eterična olja, polifenoli z veliko molekulsko maso (45).

V pogojih *in vitro* se je Abigenol izkazal kot eden izmed najmočnejših naravnih antioksidantov. Trenutno potekata dve klinični študiji. Ob ugodnih rezultatih bi bila možna uvrstitev Abigenola v kategorijo zdravil brez recepta, kar bi bil prvi primer registriranega antioksidanta iz skupine polifenolov pri nas (46).

Podatki študij *in vitro* kažejo, da spojine, ki so podobne spojinam izvlečka iz lubja bele jelke (predvsem katehin, epikatehin in epigalokatehin) vplivajo na vazodilatacijo preko aktivacije eNOS (32), ščitijo srčne miocite pred apoptozo celic (47), značilno zmanjšajo območje infarkta (47, 48, 49, 50), izboljšajo ventrikularno funkcijo, zvišajo koronarni pretok ter inhibirajo lipidno peroksidacijo (49).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Letno umre za posledicami srčno-žilnih obolenj več ljudi kot zaradi kateregakoli drugega vzroka. Od tega največ ljudi umre zaradi koronarne srčne bolezni in kapi (51).

Za srčno-žilne bolezni, kot sta ateroskleroza in hipertenzija, je značilna oslABLJENA endotelijska funkcija, ki prizadene vazodilatacijo pri živalih in ljudeh in je eden najzgodnejših patoloških pojavov žilja.

Veliko število epidemioloških študij je pokazalo, da uživanje hrane, bogate s polifenoli, zmanjša pojav srčno-žilnih bolezni. Predvidevamo lahko, da so polifenoli aktivne učinkovine, ki ščitijo žilje, čeprav mehanizem njihovega delovanja ni popolnoma pojasnjen.

Raziskave so pokazale, da je izvleček iz lubja navadne jelke bogat s polifenoli in izkazuje močne antioksidativne lastnosti.

Namen našega dela je ovrednotiti vpliv izvlečka iz lubja navadne jelke na odzivnost žilnih obročkov izolirane podganje torakalne aorte, ter proučiti, ali izvleček deluje zaščitno pred ishemično/reperfuzijskimi okvarami izoliranega podganjega srca. V ta namen bomo izolirali torakalno aorto in jo namestili na napravo za izolirane žile in preučevali vpliv izvlečka na sposobnost relaksacije in kontrakcije. Izolirali bomo tudi srca podgan, jih namestili na napravo za izolirano srce in jih perfundirali z oksigenirano hranilno raztopino z dodatkom izvlečka iz lubja navadne jelke. Srca bomo potem izpostavili splošni ishemiji in nato ocenjevali stopnje okvare srca v reperfuziji. Mehanizmi okvar žilja so podobni kot pri splošnem zoženju koronarnih žil, ki ga najdemo pri nekaterih oblikah ateroskleroze in funkcionalnih zožitvah.

Delovne hipoteze so:

- izvleček iz lubja jelke povzroča sprostitvev predhodno skrčenih izoliranih žil z ohranjenim endotelijem
- izvleček iz lubja jelke povzroča sprostitvev predhodno skrčenih izoliranih žil preko delovanja na endotelij
- izvleček iz lubja jelke povzroča sprostitvev predhodno skrčenih izoliranih žil preko vpliva na aktivnost encima NOS

- akutno dodajanje izvlečka iz navadne jelke značilno zmanjša I/R poškodbo srca
- akutno dodajanje izvlečka iz lubja jelke deluje na srce antiaritmično

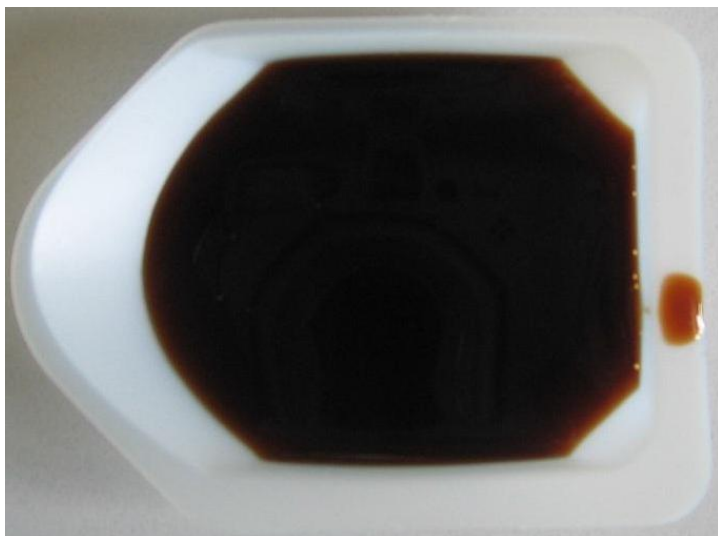
3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Izvleček iz lubja navadne jelke

Tekoči izvleček iz lubja jelke je bil pridobljen po postopku dvostopenjske ekstrakcije. 5 kg zmletega lubja jelke (*Abies alba*) so v prvi stopnji ekstrahirali s 25 L vode pri 70 °C, dve uri. Vodni izvleček so pri znižanem tlaku uparili do volumna 5 L. V drugi stopnji ekstrakcije so koncentriran vodni izvleček ekstrahirali s 3 x po 3 L etilacetata. Etilacetatnemu izvlečku so dodali 25 mL polietilenglikola 400 in iz zmesi odparili etilacetat. Pridobili so 50 mL rjavorumenega viskoznega izvlečka z vonjem po smoli (Slika 2).

Naknadno smo odstranili preostalo topilo etilacetat na rotavaporju Büchi Rotavapor R-200, Büchi (Flavil, Švica).



Slika 2: Izvleček iz lubja navadne jelke

3.1.2 Poskusne živali

Za izvedbo poskusov smo uporabili izolirana srca in žile podgan obeh spolov tipa Wistar (Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani). Živali so bile vzgojene v konstantnih klimatskih pogojih (temperatura okolja 21-24 °C),

hranjene s standardno prehrano za podgane v obliki briketov (Krka d.o.o., Novo mesto), ves čas so imele na razpolago vodo. Dnevno-nočno osvetlitev smo določili na 12 urni cikel. V posamezni kletki je bilo od 5 do 7 živali. Samice so tehtale od 200 do 340g, samci od 240 do 370g.

Pred pričetkom poskusov smo izključili živali neustrezne teže in starosti ter šibke in bolne živali. Kriteriji za izključitev ob začetku poskusov so bili: začetni koronarni pretok pod 7 ali nad 12 ml/min, pojavljanje aritmij ali zamudna preparacija.

3.1.3 Reagenti in pribor, ki so bili uporabljeni pri izolaciji podganje aorte

- CO₂
- Škarje
- Mala in velika pinceta
- Kirurška prijemalka
- Petrijevka
- Krebs-Henseleit (K-H) raztopina

3.1.4 Reagenti in pribor, ki so bili uporabljeni pri izolaciji podganjega srca

- CO₂
- Škarje
- Mala in velika pinceta
- Kirurška prijemalka
- Sukanec
- Kanila

3.1.5 Reagenti in raztopine, ki so bili uporabljeni pri poskusih na žilnih obročkih

• Izvleček iz lubja navadne jelke.

Izvleček smo redčili v bidestilirani vodi.

• **Raztopina po Krebs-Henseleitu za žilo (K-Hraztopina):**

- 117,8 mmol/l NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 4,7 mmol/l KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 1,2 mmol/l KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- 1,2 mmol/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija)
- 23,8 mmol/l NaHCO_3 (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 2,5 mmol/l CaCl_2 (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 11,0 mmol/l glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška)

• **Acetilholin** (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA. $M = 181,7 \text{ g/mol}$).

Koncentracija matične raztopine je znašala 10 mmol/l.

• **Fenilefrin** (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija $M = 167,2 \text{ g/mol}$).

Koncentracija matične raztopine je znašala 10 mmol/l.

• **KCl** (Merck, Darmstadt, Nemčija. $M = 74,56 \text{ g/mol}$).

Koncentracija matične raztopine je znašala 3 mol/l.

• **Karbogen** (Messer, Slovenija).

Plinska mešanica za preprihanje Krebs-Henseleit (K-H) raztopine v kivetah je sestavljena iz 95 % O_2 in 5 % CO_2 .

• **N ω -nitro-L-arginin** (L-NNA) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija. $M = 219,2 \text{ g/mol}$).

Koncentracija matične raztopine je bila 12 mmol/l.

3.1.6 Reagenti in raztopine, ki so bili uporabljeni pri poskusih na izoliranih srcih

• **Izvleček iz lubja navadne jelke.**

• **Raztopina po Krebs-Henseleitu za srce (K-H raztopina):**

- 118,4 mmol/l NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 4,7 mmol/l KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija)

- 1,2 mmol/l NaH₂PO₄ x 2H₂O (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- 1,2 mmol/l MgSO₄ x 7H₂O (Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija)
- 25 mmol/l NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 1,5 mmol/l CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 11,1 mmol/l glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška)

• **Karbogen** (Messer, Slovenija).

Plinska mešanica za prepihanje K-H raztopine je sestavljena iz 95 % O₂ in 5 % CO₂

• **LDH reagent**

- 9,7 mmol/L piruvata (Boehringer Mannheim, Nemčija)
- 0,24 mmol/L NADH (Roche, Švica)
- TRIS pufer (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.1.7 Uporabljen pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na žilnih obročkih

- Čaše
- Bučke
- Hladilnik, +4 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Analitska tehtnica KERN ALS 120-4 (Kern & Son GmbH, Balingen, Nemčija)
- Polavtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska)
- Naprava za izolirane žile (Laboratorij za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Ljubljana)
- Osebni računalnik PC
- Elektromehanski pretvornik (ITIS, Ljubljana, Slovenija)
- Analogno digitalni (A/D) pretvornik (National Instruments, NI PCI-6013, ZDA)
- Programska oprema DEWESoft 6.5 (DEWESoft d.o.o., Trbovlje, Slovenija).

3.1.8 Uporabljen pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na izoliranih srcih

- Epruvete

- Polavtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska)
- Vortex
- Parafilm
- Aparatura po Langendorff-u
- Srebrove elektrode (Ag/AgCl) s predojačevalnikom za merjenje EKG, 100x predojačitev signala (Dewetron, Slovenija)
- Napetostni ojačevalniki DAQP-V (Dewetron, Avstrija)
- Napetostni ojačevalnik DAQP-T (Dewetron, Avstrija)
- Termostat LAUDA E 100 z grelcem in črpalko LAUDA ecoline 003 (Lauda dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Nemčija)
- Tlačna kateterska sonda MILLAR Micro-tip SPR-524 (Millar Instruments, Inc., ZDA)
- Kontrolna enota tlačne sonde MILLAR PCU 2000 (Millar Instruments, Inc., ZDA)
- Analogno digitalni (AD) pretvornik PCI-6013, 200 K-Hz, 16 bit (National Instruments, ZDA)
- Osebni računalnik PC
- Spektrofotometer ECOM-F 6124 (Eppendorf, Nemčija)
- Dewesoft 6.1b14 Prof (Dewetron, Slovenija)
- FlexPro version 6.0.31 (Weisang GmbH & CO. KG, Nemčija)
- GraphPad Prism version 4.00 za Windows (GraphPad Software, ZDA) za statistično in grafično obdelavo podatkov

3.2 Metode pri poskusih z izolirano podganjo aorto

3.2.1 Žrtvovanje živali in priprava žilnih obročkov

Najprej smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin v odmerku 1000 i.e./100 g telesne mase živali, da bi preprečili strjevanje krvi. Nato smo živali zaprli v komoro in jih usmrtili s CO₂. Preparacijo smo začeli, ko živali niso kazale življenjskih znakov. Nato smo prerezali trebušno steno 2 cm pod ksifoidnim izrastkom spodnjega dela prsnice. Izrezali smo torakalno aorto, jo položili v petrijevko s K-H raztopino, odstranili vezivo in maščevje, ki je žilo obdajalo in s škarjicami narezali osem žilnih obročkov, ki so bili dolgi približno 2 - 3 milimetre.

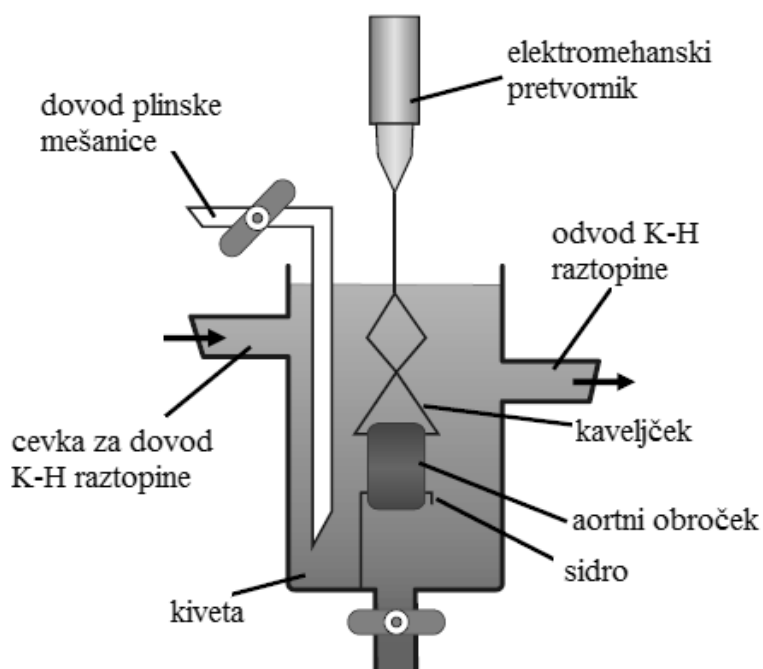
3.2.2 Nameščanje žilnih obročkov na napravo za poskuse na izoliranih žilah

Poskuse na žilah smo izvajali s pomočjo naprave za poskuse na izoliranih žilah (Slika 3), v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Naprava je sestavljena iz osmih kivet. Kivete obdaja vodna kopel, ki zagotavlja stalno temperaturo vsebine v kiveti, $37,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Kivete imajo prostornino 10 mL. Poleg vodne kopeli imajo kivete še dovodni in odvodni sistem za izmenjavo K-H raztopine in cev za dovajanje plinske mešanice kisika in ogljikovega dioksida za oksigenacijo raztopine.

Posamezen žilni obroček je bilo najprej potrebno namestiti v kiveto. Nataknili smo ga na kaveljček, ki je bil povezan z elektromehanskim pretvornikom, ter sidro, ki je bilo pritrjeno na cevko za plinsko mešanico. Taka namestitev je omogočala, da je bil žilni obroček razpet in je skozi prehajala raztopina in kisik. Pazili smo, da nismo poškodovali endotelija. Kivete so bile predhodno napolnjene s K-H raztopino, ki smo jo prepihovali s plinsko mešanico kisika in ogljikovega dioksida. Čas priprave in namestitve je bil v povprečju 5-10 minut.

Elektromehanski pretvornik je spremembo sile izometričnega krčenja žilnih obročkov pretvarjal v spremembo električne napetosti. Električno napetost smo preko ojačevalca in A/D pretvornika zapisovali na trdi disk osebnega računalnika. Tako dobljene podatke smo obdelovali s programsko opremo DEWESoft 6.5.



Slika 3: Shematski prikaz naprave za poskuse na izoliranih žilah. Prirejeno po (52).

3.2.3 Stabilizacija žilnih obročkov

Pred začetkom dodajanja substanc smo morali žilne obročke stabilizirati. Stabilizacija je potekala 90 minut. Obročke smo na začetku naravnali s pomočjo vijaka, ki je bil nameščen na elektromehanski pretvornik na mirovno napetost 20 mN in vsakih petnajst minut spirali kiveto z raztopino K-H, da smo odstranili ostanke krvi in zagotovili zadostno prehranjenost žilnih obročkov. Ko mirovna napetost ni več nihala, smo lahko pričeli s poskusi. Skozi zgornjo odprtino kivete smo začeli dodajati substance in preverjati odzivnost žil.

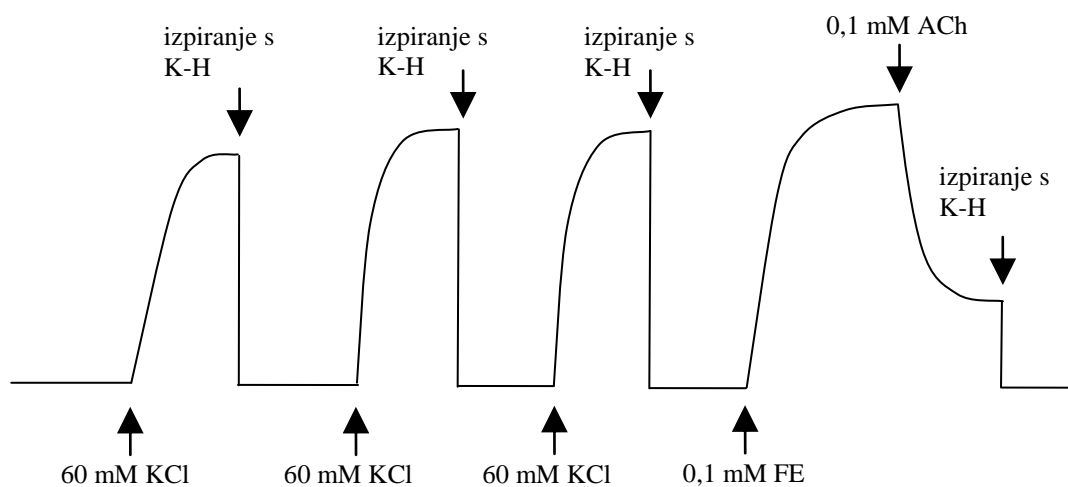
3.2.4 Preverjanje intaktnosti endotelija

Pri vseh vzorcih smo najprej preverili odzivnost in s tem intaktnost endotelija, saj je bilo za poskus pomembno, da endotelij ni bil poškodovan.

V kiveto smo najprej dodali 200 μ L KCl, tako da je njegova končna koncentracija v kiveti znašala 60 mmol/L. Žila se je pričela krčiti, napetost rasti. Ko je napetost dosegla plato (približno po 30 minutah), smo žilne obročke spirali s K-H raztopino 10 minut, da je napetost ponovno padla na mirovno in nato ponavljali postopek s KCl, dokler nismo dosegli

enakomernost odziva. Po zadnjem spiranju smo dodali 100 μ L fenilefrina, ki je povzročil skrčenje žilnega obročka. Končna koncentracija fenilefrina v kiveti je bila 0,1 mmol/L. Ko je skrčitev dosegla plato, smo v kiveto dodali 100 μ L acetilholina, končna koncentracija v kiveti je bila 0,1 mmol/L. Acetilholin je izzval od endotelija odvisno sprostitvev obročkov (Slika 4).

Sprostitev, ki je bila večja od 50%, je pomenila, da je endotelij ohranjen. Žilne obročke, ki niso bili odzivni, smo zavrgli, ostale pa sprali s K-H raztopino. Poskuse smo nadaljevali z dodajanjem substanc po predpisanih protokolih.



Slika 4: Shematski prikaz stabilizacije izoliranih žilnih obročkov s KCl in preverjanje intaktnosti endotelija s pomočjo fenilefrina in acetilholina. Prve tri krivulje prikazujejo odzivnost na KCl. Po dosegu enakomernosti odziva sledi odziv na fenilefrin in acetilholin, s čimer preverimo morebitno poškodbo endotelija. Osi: x = čas, y = sila kontrakcije na žilni obroček. FE = fenilefrin.

3.2.5 Ugotavljanje delovanja izvlečka iz lubja navadne jelke na odzivnost žilnih obročkov – protokol poskusov

Poskuse smo razdelili v štiri sklope. Predhodno smo pripravili ustrezne redčitve izvlečka iz lubja navadne jelke.

Naraščajoča koncentracija izvlečka

V prvem sklopu smo preverjali, kako se žila odziva na naraščajočo koncentracijo izvlečka.

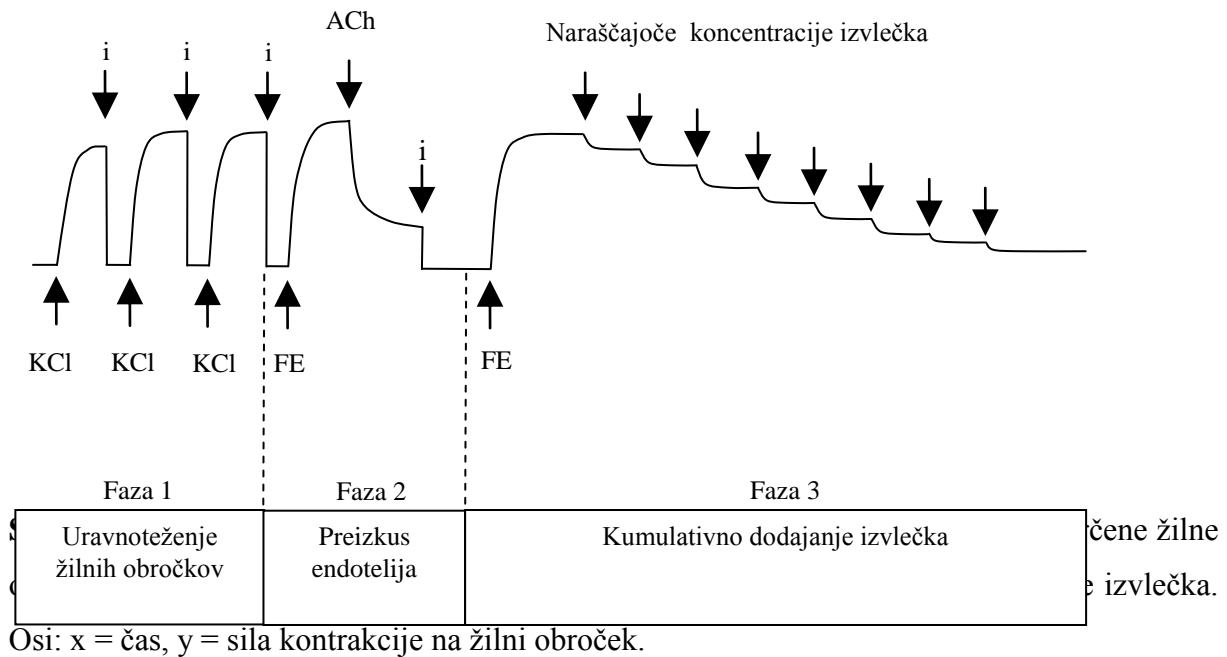
Predhodno smo si pripravili osnovno raztopino izvlečka, ki je bila koncentracije 10 g/L (100-kratna redčitev) in nadaljnje redčitve.

Upoštevati moramo, da se je ob dodajanju 0,1 mL vzorca v 10 mL kiveto, njegova koncentracija še 100-krat razredčila (Tabela 1).

Najprej smo v kiveto dodali 100 μ L fenilefrina, da se je žilni obroček skrčil. Ko je napetost dosegla plato, smo začeli dodajati različne volumne rastoče koncentracije raztopine izvlečka (Slika 5). Raztopine smo dodajali postopoma, vrednosti smo odčitavali sproti, ko je relaksacija dosegla konstantno vrednost po dodatku raztopine, kar je v povprečju trajalo dve minuti.

Tabela 1: Prikaz dodajanja naraščajoče koncentracije izvlečka lubja jelke.

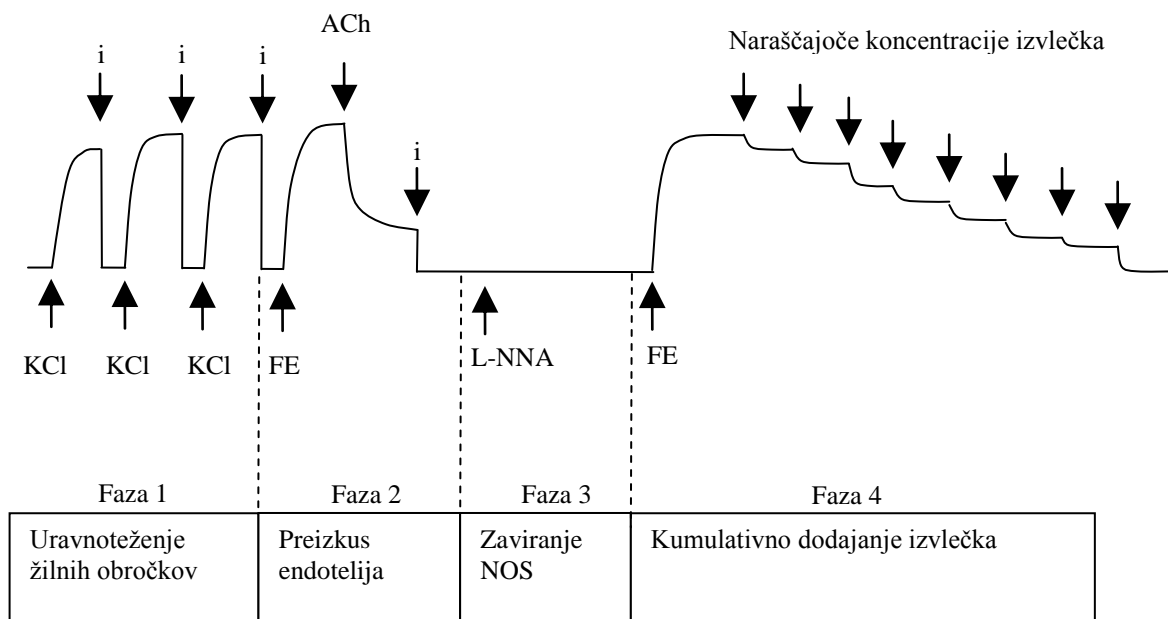
Dodatek v kiveto	Končna redčitev	Koncentracija izvlečka v kiveti μg/L
100 μ L 10^7 x redčitev izvlečka	10^9	0,01
+ 90 μ L 10^6 x redčitev izvlečka	10^8	0,1
+20 μ L 10^5 x redčitev izvlečka	3×10^7	0,3
+70 μ L 10^5 x redčitev izvlečka	10^7	1
+20 μ L 10^4 x redčitev izvlečka	3×10^6	3
+70 μ L 10^4 x redčitev izvlečka	10^6	10
+90 μ L 10^3 x redčitev izvlečka	10^5	100
+90 μ L 10^2 x redčitev izvlečka	10^4	1000



Legenda: i- izpiranje s K-H raztopino, KCl = 60 mM, FE = 0,1 mM, ACh = 0,1 mM, različne koncentracije izvlečka smo dodajali po postopku, opisanem v Tabeli 1.

Predhodna inkubacija v L-NNA

Vpliv izvlečka na NO smo preverjali s predhodno inkubacijo v L-NNA, ki je zaviralec NO-sintaze. Najprej smo stabilizirali žilne obročke in preverili intaktnost endotelija po zgoraj omenjenem postopku. Sledil je dodatek L-NNA v kiveto. Inkubacija je trajala 10 minut. Nato smo obročke skrčili z enako koncentracijo fenilefrina, kot pri poskusih brez L-NNA in po dosegu platoja kumulativno dodajali naraščajoče koncentracije izvlečka, kot je prikazano v Tabeli 1 (Slika 6).



Slika 6: Shematski prikaz poteka dela pri preverjanju vpliva izvlečka na predhodno skrčene žilne obročke s fenilefrinom (FE) z ohranjenim endotelijem in zavrtim encimom NOS.

Osi: x = čas, y = sila kontrakcije na žilni obroček.

Legenda: i- izpiranje s K-H raztopino, KCl = 60 mM, FE = 0,1 mM, ACh = 0,1 mM, L-NNA, različne koncentracije izvlečka smo dodajali po postopku, opisanem v tabeli 1.

Kontrolni poskusi

Kontrolne poskuse smo izvedli na enak način kot poskuse z naraščajočo koncentracijo izvlečka, le da smo namesto kumulativnih volumnov izvlečka dodajali volumne bidestilirane vode.

3.2.6 Obdelava podatkov

S pomočjo računalniškega programa za zajem in obdelavo podatkov DeweSoft 6.1. (Dewetron, Trbovlje, Slovenija) smo pri posameznih poskusih določili višino platojev, ki so predstavljali silo izometrične kontrakcije. Z računalniškim programom GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, ZDA) smo nato podatke statistično in grafično obdelali. Dobljene rezultate pri posameznih koncentracijah smo povprečili ter jih izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM).

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

3.3 Metode pri poskusih z izoliranim podganjim srcem

3.3.1 Žrtvovanje živali in priprava izoliranega podganjega srca

Srca smo izolirali po Langendorffu.

Proti strjevanju krvi smo intraperitonealno vbrizgali heparin in sicer 1000 i.e. heparina v 0,2 ml na 100 g telesne teže živali. Žival smo zaprli v komoro in jo omrtvili s CO₂. Žrtvovani živali smo odprli prsni koš in v aorto uvedli kanilo, napolnjeno z raztopino K-H, ki je vsebovala heparin (2500 i.e. heparina na 100 ml fiziološke raztopine). Med preparacijo smo srce polivali z mrzlo fiziološko raztopino K-H in s tem umirili moč kontrakcij srca.

3.3.2 Nameščanje src na aparat po Langendorffu

Po vstavitvi kanile smo srce izolirali in ga namestili na aparat po Langendorffu. Izolirano srce smo perfundirali s fiziološko raztopino K-H s stalnim tlakom. Tlak (nivo raztopine nad srcem) smo vzdrževali na enaki višini z namestitvijo steklenic po Mariottu. V fiziološko raztopino smo dovajali mešanico kisika in ogljikovega dioksida (95% kisika in 5% ogljikovega dioksida). Perfuzijsko raztopino smo med poskusi vzdrževali na temperaturi 38,5 °C s pomočjo termostata. Skozi levi preddvor smo v levi prekat vstavili Millarjevo tlačno sondo, s pomočjo katere smo merili moč kontrakcij levega prekata. Na srce smo v smeri električne osi srca namestili srebrovi elektrodi za zajem EKG-ja. Da smo srce zaščitili pred temperaturnimi vplivi in izsušitvijo, smo uporabili termostatiran steklen plašč in parafilm.

3.3.3 Potek poskusov

Poskuse smo razdelili na tri sklope. Prvi sklop so bili kontrolni poskusi, drugi sklop poskusi s koncentracijo izvlečka 10 µg/L in tretji sklop poskusi s koncentracijo izvlečka 100 µg/L. Vsi poskusi so trajali 120 minut.

Kontrolna skupina poskusov je zajemala izolirana srca samcev in samic, ki smo jih perfundirali samo z oksigenirano K-H raztopino, brez dodatka izvlečka. Prvih 30 minut smo srca perfundirali z oksigenirano K-H raztopino in jih nato izpostavili 40-minutni vsesplošni

ishemiji tako, da smo prekinili dotok K-H raztopine. Po 40 minutah smo ponovno vzpostavili pretok, reperfuzija je trajala 50 minut.

Druga skupina poskusov je zajemala izolirana srca samcev in samic, ki smo jih na začetku 20 minut perfundirali z oksigenirano raztopino K-H, nato smo na Langendorffovi aparaturi preklopili na dotok oksigenirane raztopine K-H z dodanim izvlečkom koncentracije 10 $\mu\text{g/L}$. Srce smo perfundirali 10 minut, nato smo popolnoma prekinili dotok oksigenirane raztopine K-H z dodano učinkovino. Ishemija je trajala 40 minut. Po ishemiji smo srca reperfundirali 50 minut z enako raztopino kot tik pred ishemijo.

Tretja skupina poskusov je bila enaka kot druga, le da smo imeli oksigenirano raztopino K-H s koncentracijo izvlečka 100 $\mu\text{g/L}$.

3.3.4 Merjene spremenljivke

Vse spremenljivke smo merili vseh 120 minut poskusa, razen v času ishemije.

Koronarni pretok

Srca smo perfundirali skozi kanilo, ki smo jo uvedli v aorto. Spodnji del kanile je segal nad semilunarne zaklopke. Ker so vhodi v koronarne žile nad temi zaklopkami, smo tako srce perfundirali skozi koronarne žile. Perfuzijska tekočina se je iztekala skozi koronarni sinus v desni preddvor in srce jo je iztisnilo skozi odrezane žile. Efluent smo lovili v umerjeno epruveto v minutnih časovnih razmikih ob predhodno določenih časih in tako merili koronarni pretok (ml/min).

Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)

Iz odvzetega efluenta smo odvzeli 33 μL in jih dodali v 1 mL LDH reagenta, ki smo ga predhodno premešali na stresalniku (vorteks). Zmes smo pol minute ročno mešali in nato s spektrofotometrom pri 340 nm merili porabo NADH in s tem aktivnost LDH v tekočini in jo izrazili kot hitrost sproščanja LDH v $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tlak v levem prekatu - moč kontrakcij levega prekata

Moč kontrakcij levega prekata (angl. left ventricular pressure, LVP) smo merili s pomočjo Millarjeve tlačne kateterske sonde, ki smo jo uvedli skozi levi preddvor in mitralne zaklopke v levi prekat. Sondo smo priklopili na ojačevalnik preko Millarjeve kontrolne enote. Spremembo tlaka smo vzorčili s 500 Hz. Ojačane signale smo preko analogno–digitalnega (AD) pretvornika dovedli do računalnika, kjer smo zajete podatke ves čas poskusa beležili in shranjevali na računalniški trdi disk s pomočjo programske opreme Dewesoft. Spremembo tlaka pri kontrakciji levega prekata smo izrazili v mm živega srebra (mmHg).

Trajanje aritmij in frekvenca (število utripov na minuto)

EKG smo snemali s srebrovimi (Ag/AgCl) elektrodami, nameščenimi na srce. Signal smo predhodno 100x ojačali s predojačevalnikom (Dewetron, Slovenija), nato preko ojačevalnika DAQP-V (Dewetron, Avstrija) in analogno-digitalnega pretvornika podatke shranjevali na trdi disk osebnega računalnika.

Aritmije smo opazovali in odčitavali na EKG zapisu, iz spremembe električne napetosti pa smo izračunali frekvenco utripov srca (število utripov na minuto).

3.3.5 Obdelava podatkov

Z računalniškim programom GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, ZDA) smo dobljene podatke statistično in grafično obdelali. Dobljene rezultate pri posameznih koncentracijah smo povprečili ter jih izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM). Razlike med skupinami meritev smo izračunali z enosmerno analizo variance - ANOVA metodo. V primeru značilnih razlik smo primerjali posamezne srednje vrednosti z Bonferroni post-testom. Kjer ni bilo mogoče uporabiti enosmerne ANOVA metode, smo uporabili t-test. Za značilne smo vzeli razlike pri $p < 0,05$.

Izračunali smo tudi površine pod kumulativno koncentracijsko-relaksacijsko krivuljo (AUC, area under the curve) ter z uporabo enofaktorske analize variance (one-way ANOVA) in Bonferronijevim post-hoc testom primerjali skupine med seboj. Pri primerjavi rezultatov je značilno razliko predstavljala vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI

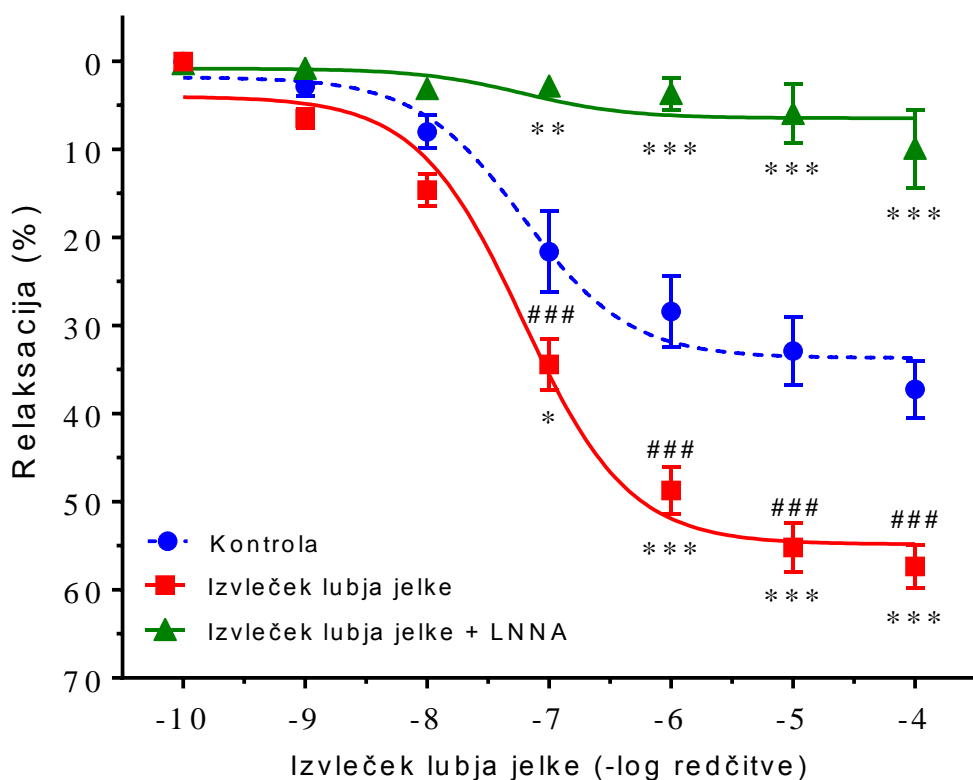
4.1 Poskusi na izolirani podganji aorti

Pri poskusih z izolirano podganjo aorto smo ugotavljali, kako izvleček iz lubja jelke učinkuje na sprostitvev žilnih obročkov. Aortne obročke s funkcionalnim endotelijem smo predhodno skrčili s fenilefrinom. Ko je skrčitev dosegla plato, smo kumulativno dodajali vedno večje koncentracije izvlečka in spremljali spremembe. Želeli smo ugotoviti, kako izvleček vpliva na e-NOS. V ta namen smo nekaj žilnih obročkov inkubirali v prisotnosti e-NOS zaviralca L-NNA in preverjali odziv.

Rezultate smo statistično obdelali in jih grafično prikazali kot odstotek relaksacije žilnih obročkov v odvisnosti od logaritma koncentracije izvlečka lubja jelke glede na stopnjo predhodne skrčitve. Izračunali smo tudi površine pod krivuljami, ki so predstavljale odstotek relaksacije v odvisnosti od koncentracije izvlečka in jih prikazali v grafikonu.

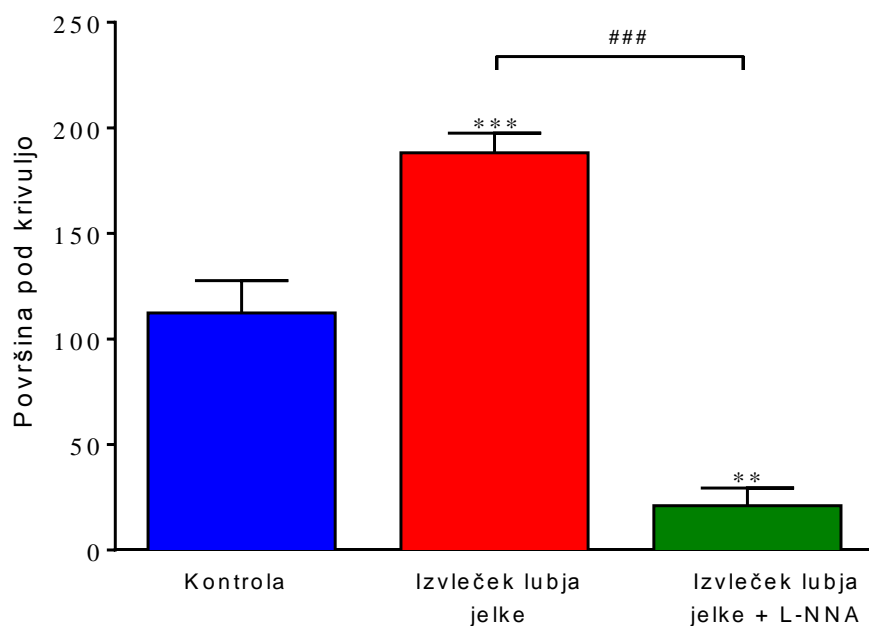
Relaksacija se je z naraščanjem koncentracije izvlečka v kiveti povečevala. Rezultati kažejo, da je relaksacija pri poskusih z izvlečkom glede na kontrolo značilno večja pri koncentraciji enaki ali večji od 1 $\mu\text{g/L}$. Pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/L}$ je relaksacija značilno večja ($p < 0,05$), nato pa doseže značilno večjo relaksacijo pri vrednosti $p < 0,001$. Iz grafa je razvidno tudi, da je inkubacija v L-NNA skoraj popolnoma preprečila relaksacijo žilnega obročka glede na kontrolo ($p < 0,001$). Relaksacija pri poskusih z izvlečkom je značilno večja ($p < 0,001$) pri koncentraciji večji od 1 $\mu\text{g/L}$ glede na relaksacijo pri poskusih pri predhodni inkubaciji žilnega obročka v L-NNA (Slika 7).

Podobno smo ugotovili tudi pri primerjavi površin pod krivuljami. Dodatek izvlečka iz lubja jelke povzroči značilno večjo relaksacijo ($p < 0,001$). Inkubacija v L-NNA značilno prepreči relaksacijo žilnih obročkov glede na kontrolo ($p < 0,01$) (Slika 8).



Slika 7: Odstotek relaksacije žilnih obročkov v odvisnosti od logaritma redčitve izvlečka lubja jelke v kivetu.

Odziv predhodno skrčenih žilnih obročkov na povečevanje koncentracije izvlečka brez in ob predhodni inkubaciji v L-NNA. Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin. * predstavlja značilno razliko glede na kontrolo, # pa predstavlja značilno razliko glede na izvleček ob predhodni inkubaciji v L-NNA. In sicer: * pomeni $p < 0,05$, ** pomeni $p < 0,01$, *** pomeni $p < 0,001$, # pomeni $p < 0,05$, ## pomeni $p < 0,01$ in ### pomeni $p < 0,001$. Značilno razliko je predstavljal vrednost $p < 0,05$.



Slika 8: Površina pod krivuljo odstotka relaksacije žilnih obročkov v odvisnosti od logaritma koncentracije izvlečka lubja jelke. * predstavlja značilno razliko glede na kontrolo, # pa predstavlja značilno razliko glede na izvleček ob predhodni inkubaciji v L-NNA. In sicer: ** pomeni $p < 0,01$, *** pomeni $p < 0,001$, ### pomeni $p < 0,001$. Značilno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$.

4.2 Poskusi na podganjem srcu

Kontrolne poskuse smo izvedli na štirih srcih, poskuse z izvlečkom pa na petih srcih za vsako koncentracijo.

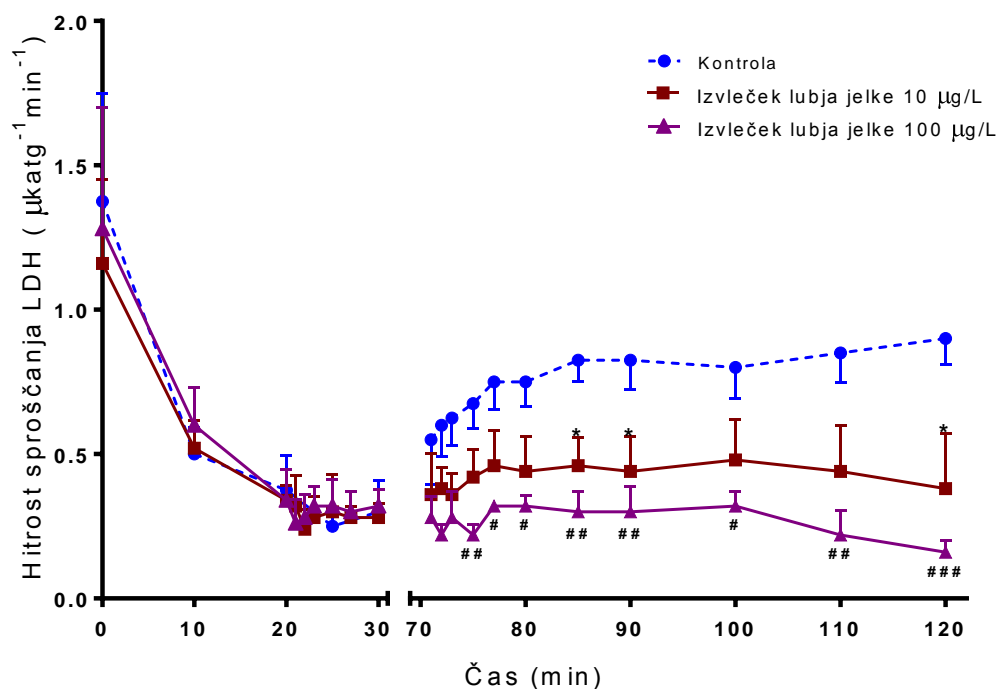
Do 20 minute so v vseh treh skupinah poskusov srca bila perfundirana z oksigenirano perfuzijsko raztopino K-H. V dvajseti minuti smo pri poskusih z izvlečkom lubja jelke raztopino K-H zamenjali z oksigenirano raztopino K-H, ki je vsebovala izvleček lubja jelke. Od 30. do 70. minute poskusa smo pretok raztopine skozi srce prekinili – ishemija. Po 70. minuti je sledila ponovna vzpostavitev pretoka z enako raztopino kot tik pred prekinitvijo.

4.2.1 Hitrost sproščanja LDH

Spremembe v hitrosti sproščanja LDH smo izrazili v $\mu\text{kat} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

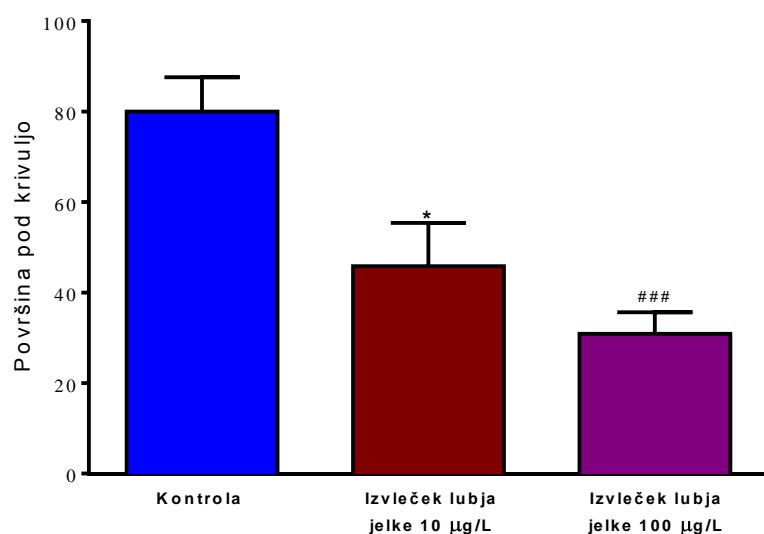
Hitrost sproščanja LDH se je pred pričetkom ishemije manjšala enako za vse tri sklope poskusov. Po koncu ishemije je pri kontrolnih poskusih hitrost sproščanja LDH začela naraščati in ohranila trend naraščanja do konca poskusa. Pri obeh sklopih poskusov z dodanim izvlečkom lubja jelke se je hitrost sproščanja LDH po začetku ishemije nekoliko povečala – pri koncentraciji izvlečka 10 $\mu\text{g/L}$, oziroma ostala enaka – pri koncentraciji izvlečka 100 $\mu\text{g/L}$, proti koncu poskusa pa je začela padati pri obeh koncentracijah. Značilno manjša hitrost pri koncentraciji izvlečka 10 $\mu\text{g/L}$ je bila v 85. in 90. minuti ter v 120 minuti, in sicer za razliko $p < 0,05$. Značilno manjša hitrost sproščanja LDH pri koncentraciji izvlečka 100 $\mu\text{g/L}$ je bila ves čas po koncu ishemije in sicer največ za razliko $p < 0,01$, v 120 minuti pa celo za razliko $p < 0,001$ (Slika 9).

Primerjava površin pod krivuljo je pokazala, da izvleček značilno zmanjša hitrost sproščanja LDH. Sproščanje LDH bolj zavre višja koncentracija izvlečka - 100 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,001$) (Slika 10).



Slika 9: Spremembe v hitrosti sproščanja LDH iz izoliranega podganjega srca ($\mu\text{kat} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. * - značilne ($p < 0,05$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 10 $\mu\text{g/L}$ glede na kontrolno skupino; # - značilne ($p < 0,05$) razlike, ## - značilne ($p < 0,01$) razlike, ### - značilne ($p < 0,001$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 100 $\mu\text{g/L}$ glede na kontrolno skupino. Vrednosti so izražene kot

aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.



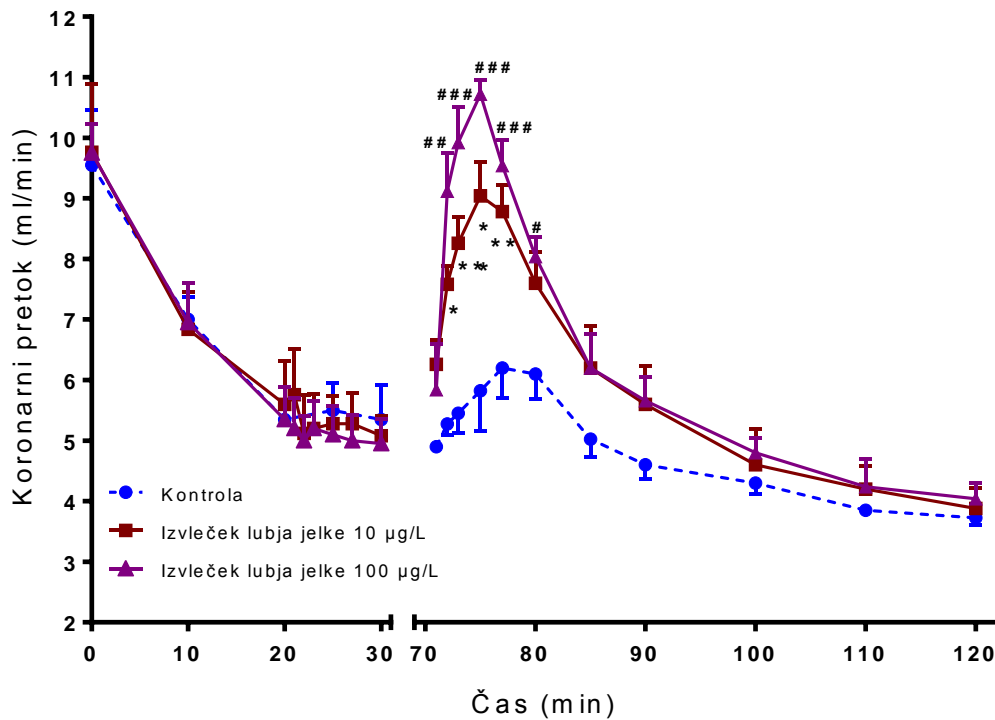
Slika 10: Površina pod krivuljo hitrosti sproščanja LDH od začetka reperfuzije naprej iz izoliranega podganjega srca v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. *- značilne ($p < 0,05$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 10 µg/L glede na kontrolno skupino; ### - značilne ($p < 0,001$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 100 µg/L glede na kontrolno skupino.

4.2.2 Koronarni pretok

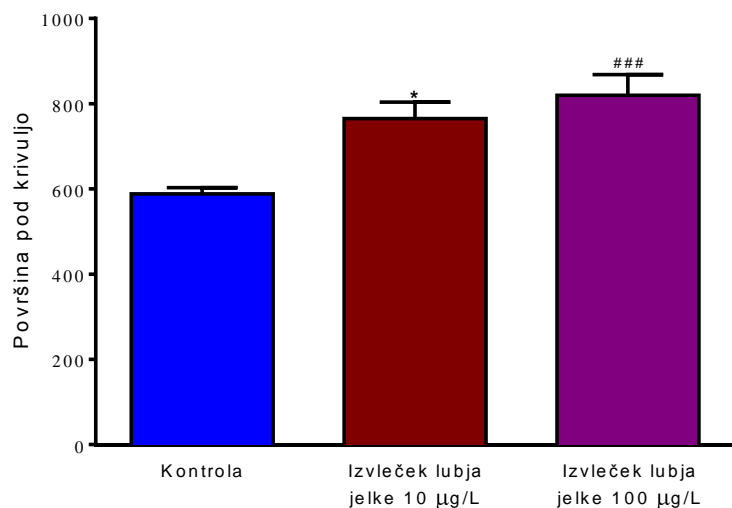
Spremembe koronarnega pretoka smo izrazili v mL/min.

Koronarni pretok je do pričetka ishemije vseskozi upadal enako za vse tri sklope poskusov. Po začetku reperfuzije se je pretok povečal, vrh je dosegel med 75. in 77. minuto. Močno se je povečal pri skupinah poskusov z izvlečkom lubja jelke, in sicer pri obeh značilno glede na kontrolo. Pri koncentraciji izvlečka 10 µg/L za razliko $p < 0,01$, pri koncentraciji izvlečka 100 µg/L pa celo za razliko $p < 0,001$. Po dosegu vrha je pretok začel upadati v vseh treh poskusih. Po 80. minuti je upadal neznačilno za obe koncentraciji glede na kontrolo, pri obeh koncentracijah se je spreminjal skoraj enako, še vedno pa je bil nekoliko večji od kontrole (Slika 11).

Primerjava površin pod krivuljo je pokazala, da je bil koronarni pretok značilno povečan pri obeh koncentracijah izvlečka lubja jelke glede na kontrolo in sicer pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/L}$ za razliko $p < 0,05$, pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/L}$ pa za razliko $p < 0,001$ (Slika 12).



Slika 11: Spremembe koronarnega pretoka izoliranega podganjega srca (mL/min) v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. * - značilne ($p < 0,05$) razlike za koncentracijo izvlečka 10 $\mu\text{g/L}$ glede na kontrolno skupino, ** - značilne ($p < 0,01$) razlike za koncentracijo izvlečka 10 $\mu\text{g/L}$ glede na kontrolno skupino; # - značilne ($p < 0,05$) razlike za koncentracijo izvlečka 1 $\mu\text{g/L}$ glede na kontrolno skupino, ## - značilne ($p < 0,01$) razlike za koncentracijo izvlečka 1 $\mu\text{g/L}$ glede na kontrolno skupino, ### - značilne ($p < 0,001$) razlike za koncentracijo izvlečka 1 $\mu\text{g/L}$ glede na kontrolno skupino. Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.



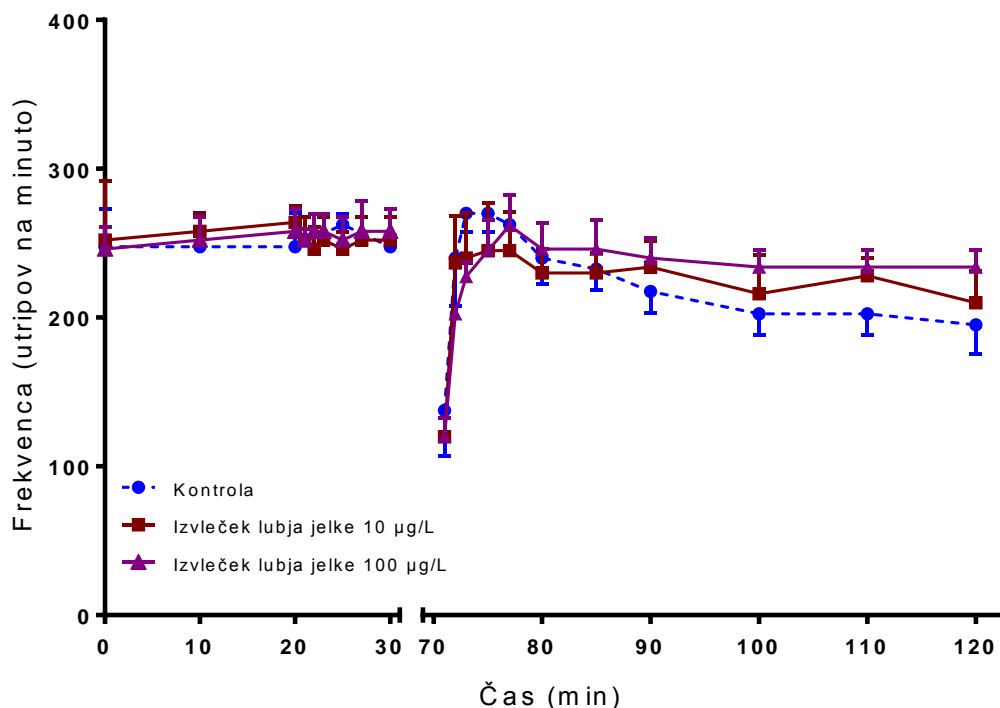
Slika 12: Površina pod krivuljo spremembe koronarnega pretoka izoliranega podganjega srca od začetka reperfuzije naprej v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. *- značilne ($p < 0,05$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 10 µg/L glede na kontrolno skupino; ### - značilne ($p < 0,001$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 100 µg/L glede na kontrolno skupino.

4.2.3 Frekvenca

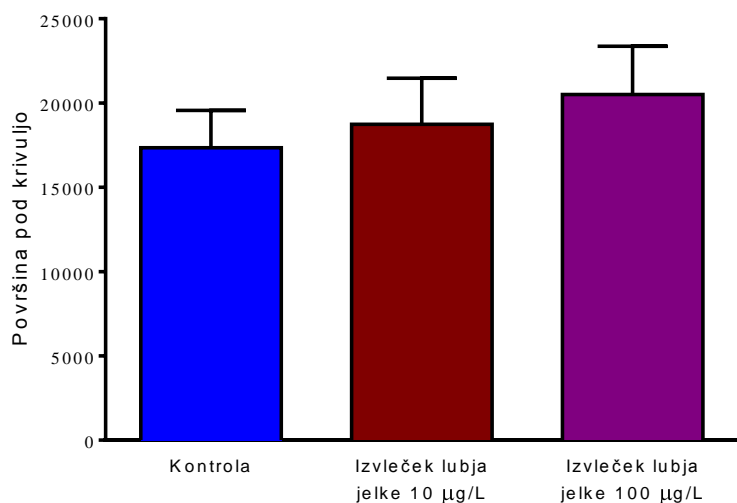
Frekvenco smo izrazili kot število utripov na minuto.

Frekvenca je do pričetka ishemije stalna in enaka za vse tri sklope poskusov. Po ishemiji frekvenca močno upade in naglo naraste na začetno vrednost že v prvih minutah reperfuzije. Po vrhu nekoliko upade in ostane enaka do konca poskusa. Rezultati poskusov z izvlečkom lubja jelke se značilno ne razlikujejo od kontrole (Slika 13).

Površine krivulj poskusov z izvlečkom lubja jelke se ne razlikujejo od površine kontrole (Slika 14).



Slika 13: Spremembe frekvenca izoliranega podganjega srca v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin. Ni prisotnih značilnih razlik.



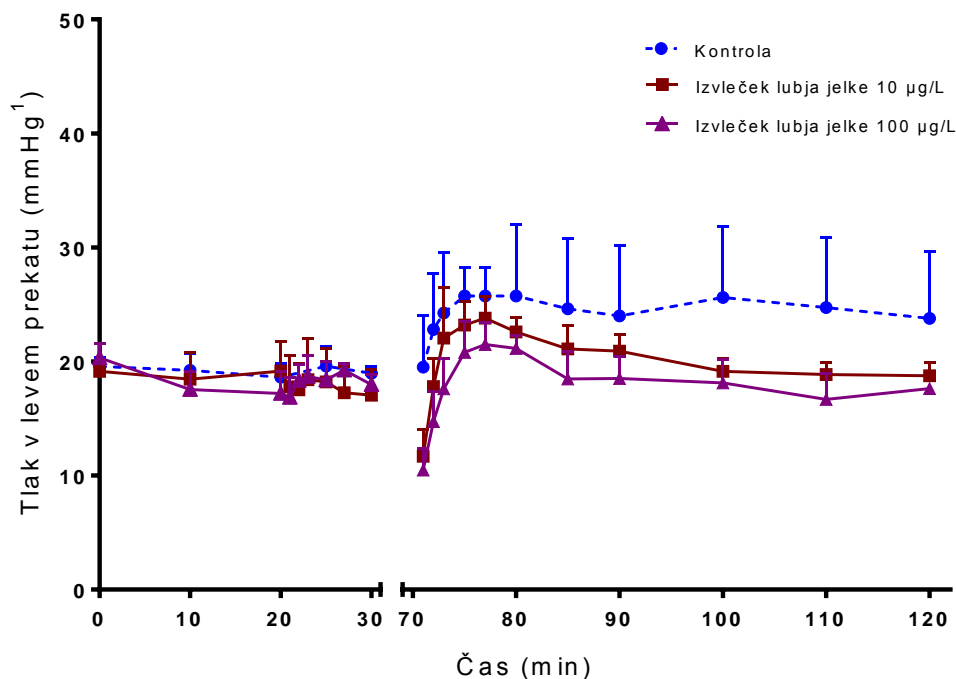
Slika 14: Površina pod krivuljo frekvenca izoliranega podganjega srca od začetka reperfuzije naprej v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. Površine se značilno ne razlikujejo.

4.2.4 Tlak v levem prekatu

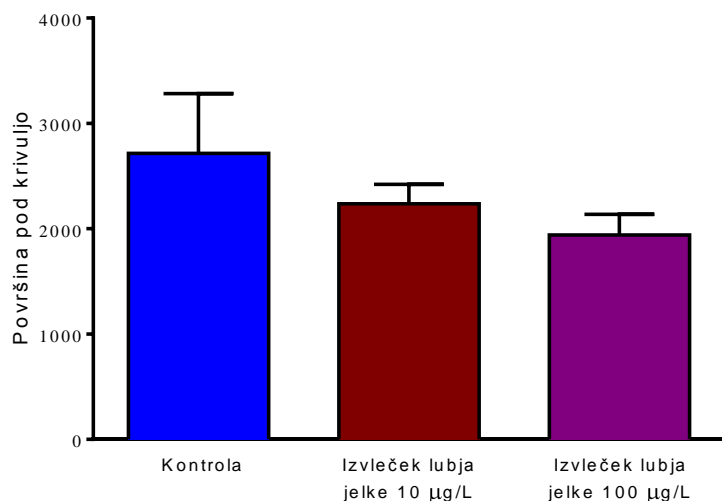
Spremembe tlaka v levem prekatu smo izrazili v mmHg.

Tlak je do pričetka splošne ishemije stalen in enak za vse tri sklope poskusov. Po splošni ishemiji tlak pri kontroli nekoliko naraste, doseže plato in ostane enak do konca poskusa. Tlak pri poskusih z izvlečkom lubja jelke po ponovni vzpostavitvi nekoliko upade, nato naglo naraste nekoliko nad vrednost pred pričetkom splošne ishemije, nato pa pade na enako vrednost, kot je bila pred začetkom ishemije in ostane stalen do konca poskusa. Tlak pri poskusih z izvlečkom lubja jelke se značilno ne razlikuje od kontrole, je pa vseskozi nekoliko nižji (Slika 15).

Površine krivulj poskusov z izvlečkom lubja jelke se ne razlikujejo od površine kontrole (Slika 16).



Slika 15: Spremembe tlaka v levem prekatu izoliranega podganjega srca v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, ki so dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posameznih koncentracijah. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin. Ni prisotnih značilnih razlik.

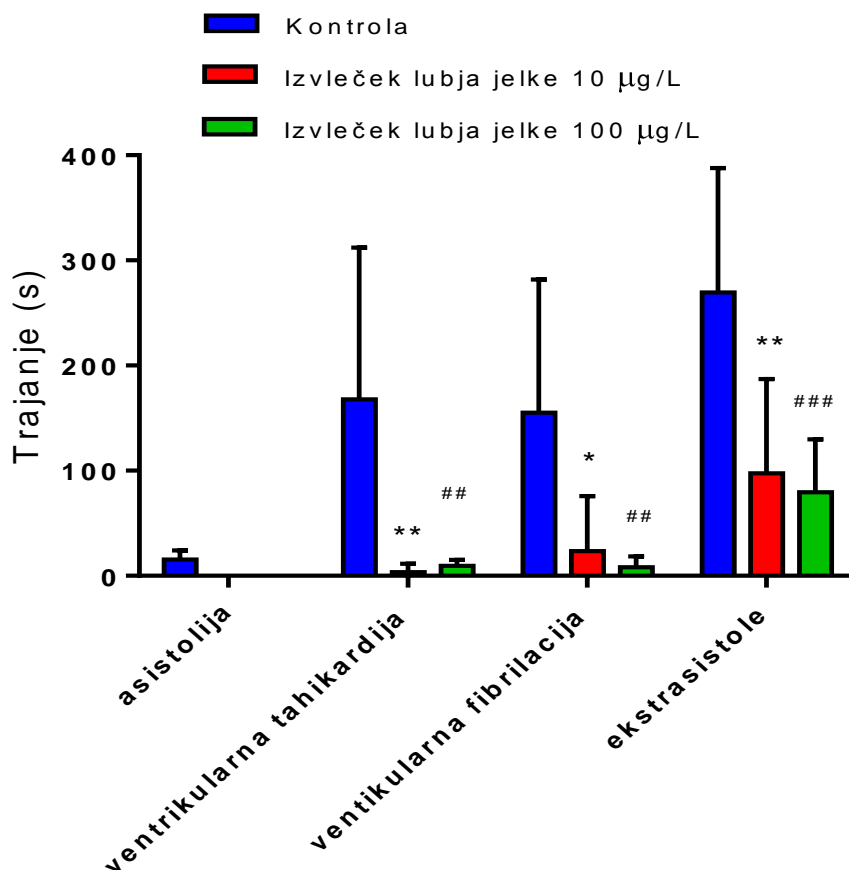


Slika 16: Površina pod krivuljo spremembe tlaka v levem prekatu izoliranega podganjega srca od začetka reperfuzije naprej v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. Površine se značilno ne razlikujejo.

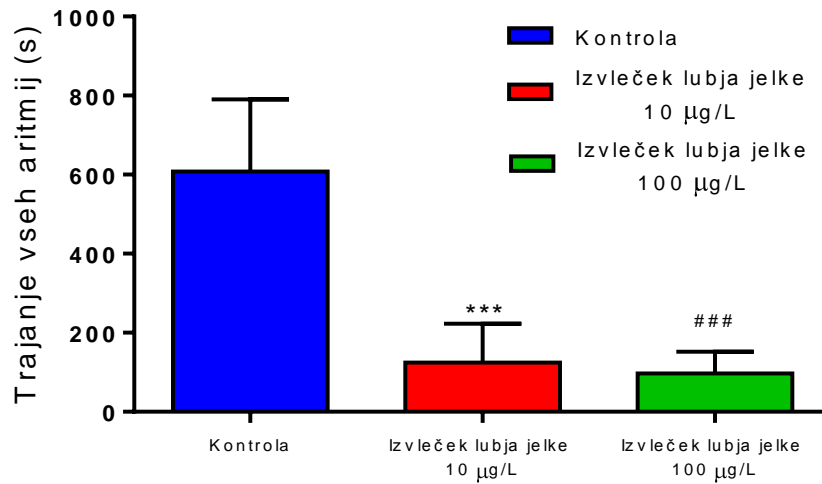
4.2.5 Trajanje aritmij

Pojavljanje aritmij smo spremljali tekom celotnega poskusa. Določali smo asistolije, prekatne fibrilacije (PF), prekatne tahikardije (PT) in prekatne prezgodnje utripe (PPU). Trajanje posameznih tipov aritmij smo izrazili v sekundah. Rezultate smo prikazali kot trajanje posameznih vrst aritmij pri vsakem poskusu in kot skupno vsoto aritmij pri posameznem poskusu.

Aritmije so se pojavljale pri vseh sklopih poskusov, vendar pri poskusih z izvlečkom mnogo manj. Asistolija se je pojavila samo pri kontrolnih poskusih, pri poskusih z izvlečkom ni bila prisotna. Trajanje ventrikularnih tahikardij je bilo pri obeh koncentracijah značilno nižje glede na kontrolo in sicer za razliko $p < 0,01$. Trajanje ventrikularnih fibrilacij je bilo pri obeh koncentracijah izvlečka značilno nižje. Pri koncentraciji 10 µg/L za razliko 0,05, ter pri koncentraciji 100 µg/L za razliko 0,01. Trajanje ekstrasistol je bilo značilno manjše pri obeh koncentracijah izvlečka in sicer pri koncentraciji 10 µg/L za razliko 0,01, pri koncentraciji 100 µg/L pa celo za razliko 0,001. Pri kontrolni skupini je bil skupni čas trajanja aritmij v reperfuziji najvišji, značilno nižji je bil pri obeh koncentracijah izvlečka in sicer za razliko $p < 0,001$. Najnižji je bil pri koncentraciji izvlečka 100 µg/L (Slika 17, Slika 18).



Slika 17: Graf trajanja posameznih vrst aritmij izoliranega podganjega srca v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. * - značilne ($p < 0,05$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 10 µg/L glede na kontrolno skupino; ** - značilne ($p < 0,01$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 10 µg/L glede na kontrolno skupino; ## - značilne ($p < 0,01$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 100 µg/L glede na kontrolno skupino; ### - značilne ($p < 0,001$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 100 µg/L glede na kontrolno skupino.



Slika 18: Vsota skupnega trajanja aritmij izoliranega podganjega srca v odvisnosti od koncentracije izvlečka lubja jelke. *** - značilne ($p < 0,001$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 10 µg/L glede na kontrolno skupino; ### - značilne ($p < 0,001$) razlike za koncentracijo izvlečka lubja jelke 100 µg/L glede na kontrolno skupino.

5 RAZPRAVA

V naši raziskavi smo preučevali vpliv izvlečka lubja bele jelke na izoliranih žilnih obročkih podganje aorte z ohranjenim endotelijem. Preverjali smo, ali povzroči sprostitvev aorte in ali deluje koncentracijsko odvisno. Z zavrtjem NO-sintaze smo preverili morebiten mehanizem delovanja. Preučevali smo tudi, ali izvleček deluje zaščitno pred ishemično-reperfuzijskimi okvarami izoliranega podganjega srca. Preverjali smo stopnjo okvare po izpostavitvi srca ishemiji, sposobnost širitve koronarnih žil ter morebitne antiaritmogene učinke izvlečka.

5.1 Razprava o materialih in metodah

5.1.1 Izvleček iz lubja bele jelke

Raziskave, narejene na izvlečku iz lubja jelke kažejo, da ima močno antioksidativno delovanje *in vitro*. Predvideva se, da so za to odgovorne polifenolne spojine, ki jih najdemo tudi v številnih drugih rastlinah (zeleni in črni čaj, maline, grozdje, kakav, obmorski bor, itd.) Na njih intenzivno potekajo številne raziskave (53, 54, 55, 56).

Ugotovili so, da polifenolne spojine ugodno vplivajo na zdravje. Eden izmed ugodnih vplivov je zmanjšano tveganje za razvoj srčno-žilnih obolenj (53, 54, 56).

Najpogostejši vzrok smrtnosti v razvitih deželah sveta je ishemična bolezen srca. Procesi, ki vodijo do sprememb povzročijo zoženje ali pa celo zaprtje koronarne arterije. Učinkovine s protivnetnim in antioksidativnim delovanjem imajo čedalje večjo vlogo v preprečevanju in zdravljenju ateroskleroze, saj je nastanek ateroskleroze pomembno povezan z okvaro žilnega endotelija in povečano oksidacijo LDL delcev. Do okvare in povečane oksidacije pa pride zaradi oksidativnega stresa, ki je povezan s prekomerno koncentracijo radikalov. Napredovanje ateroskleroze pa spodbuja še vnetje v žilni steni. Po vnosu polifenolnih spojin so zaznali izboljšano funkcijo endotelija, ugotovili pa so tudi antitrombotično, antihipertenzivno in antidiabetično delovanje (53, 54, 56).

Izvleček iz lubja bele jelke je po sestavi podoben Piknogenolu®, kateremu so dokazali antioksidativne, protivnetne in druge učinke ter izboljšanje endotelijske funkcije preko

povečane sinteze NO. Sklepali smo, da bo tudi izvleček lubja jelke ugodno vplival na srčno-žilni sistem (34).

V tem diplomskem delu smo se osredotočili na vpliv izvlečka lubja jelke na sposobnost relaksacije žil ter morebitne zaščitne učinke izvlečka na izolirano srce, ki je bilo izpostavljeno ishemiji. Preverjali smo direkten vpliv izvlečka lubja jelke na encim eNOS, ostalih učinkov (antioksidativnega, protivnetnega in drugih potencialnih učinkov) pa neposredno nismo merili. Na podlagi rezultatov lahko samo sklepamo, da izvleček deluje na več nivojih.

Ugotovili smo, da izvleček relaksira izolirano žilo, vpliva na delovanje encima eNOS in deluje zaščitno na srce, ki je bilo izpostavljeno ishemiji.

5.2 Poskusne živali

Poskusi so bili izvedeni na izoliranih žilnih obročkih aorte in src podganjih samcev in samic seva Wistar. Bistvena prednost uporabe manjših živalskih modelov, kamor spada podgana, je lažja in cenejša vzreja živali v laboratorijskih pogojih. Veliki sesalci, med katere spada npr. prašič, so ustrežnejši živalski model za primerjavo s človekom. Podganji model je primeren samo za preverjanje akutnih učinkov, kroničnih pa ne, ker podgane same sintetizirajo vitamin C. Poleg tega dobimo samo podatke o direktnem delovanju na žilje in srce.

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

Pred usmrčitvijo smo živalim intraperitonealno injicirali heparin, ki je preprečil strjevanje krvi. Ker se kri ni strdila, je takoj, ko smo pričeli z izolacijo, odtekla. S tem smo se izognili odvečni krvi, ki bi motila izvajanje poskusov. Za usmrtitev živali smo uporabili CO₂. Metoda je enostavna, hitra in neboleča. CO₂ tudi ne vpliva na nadaljnje raziskave na žilah podgan. Priprava živali in izolacija žil je bila vedno enaka, hitra in standardizirana.

5.2.1 Izolirani žilni obročki podganje aorte

Model izoliranih žilnih obročkov ima to prednost, da lahko nadziramo koncentracijo na mestu delovanja – ob receptorju. Na ta način se tudi izognemo vplivu živčnega in hormonskega delovanja, ki bi lahko vplival na rezultate.

Koliko se žilni obroček skrči, je odvisno od koncentracije vazokonstriktorjev ter ostalih dejavnikov, kot sta premer žilnega obročka in variabilnost debeline gladkega mišičnega sloja.

Poskuse smo izvedli na descendenti aorti, saj je bilo pri prejšnjih poskusih ugotovljeno, da dajejo poskusi na izoliranih obročkih ascendentne aorte neenakomerne odzive, odsek ascendentne aore je precej krajši in omogoča pripravo največ treh žilnih obročkov, medtem ko jih lahko iz odseka descendentne aorte pripravimo osem (52).

5.2.2 Model izoliranega podganjega srca

Model izoliranega podganjega srca se v zadnjem desetletju vse več uporablja kot model za ugotavljanje vpliva učinkovin na prekatno fibrilacijo, ki jo povzročimo z miokardno ishemijo in sledečo reperfuzijo. Predvsem je uporaben za prepoznavanje antiaritmogenega delovanja zdravil in drugih učinkovin, po predhodni izpostavljenosti src ishemiji. Primeren je tudi za preučevanje prekondicioniranja, mehanizmov endogene zaščite in mehanizmov, odgovornih za sprožanje in vzdrževanje prekatne fibrilacije. Je zelo uporaben, saj omogoča dodajanje substanc preko perfuzata in opazovanje učinkov substanc na srce brez ovir, ki se pojavijo pri *in vivo* poskusih, kot so na primer metabolizem s prehodom skozi jetra ter živčni in hormonski vplivi pri živi živali (57). Model je poceni in zanesljiv, izolacija in delo sta enostavna (58, 59).

Največja pomanjkljivost poskusov je v povezavi z metodologijo uporabe izoliranega podganjega srca. Perfundirali smo ga namreč s fiziološko raztopino K-H namesto s krvjo, ki vsebuje vse cirkulirajoče celice, vključno z nevtrofilci, ki igrajo ključno vlogo pri poškodbi srca, inducirani z ishemijo. Vendar pa dobljeni podatki klub omejitvam omogočajo identifikacijo zaščitnih učinkov različnih učinkovin.

5.3 Razprava o rezultatih

5.3.1 Poskusi na izoliranih žilnih obročkih

Določali smo vpliv izvlečka iz navadne jelke na sposobnost relaksacije žilnih obročkov, ki so imeli ohranjen endotelij. Ugotavljali smo, kako se obročki odzivajo na postopno povečevanje koncentracije izvlečka. Preverjali smo tudi vpliv pri obročkih, kjer smo predhodno inhibirali NO – sintazo, saj nas je zanimalo ali izvleček morebiti vpliva na aktivnost tega encima. Sposobnost izvlečka, da žilo širi, bi imelo ugoden vpliv pri preprečevanju zmanjšane sposobnosti endotelija, ki je ena izmed najzgodnejših funkcionalnih sprememb arterij in postopoma vodi v razvoj ateroskleroze.

Pri vseh obročkih smo najprej preverili ohranjenost endotelija. Obročke smo skrčili s KCl, ki deluje po mehanizmu, neodvisnem od endotelija in receptorjev. Povzroča namreč depolarizacijo membrane gladkih-mišičnih celic žil. To povzroči aktivacijo napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalov na sarkolemi, povečano koncentracijo Ca^{2+} v citosolu in posledično skrčitev gladke mišice. Zaradi takšnega načina delovanja je primeren za poskuse odzivnosti žilnih obročkov. Odziv žilnih obročkov je namreč odvisen od gladkih mišičnih celic, endotelija ter premera žilnih obročkov. Poleg tega na odziv žil vpliva tudi koncentracija vazorelaksatorja in vazokonstriktorja.

Vpliv izvlečka lubja jelke na izolirano podganjo torakalno aorto

Iz poteka krivulj je razvidno, da so se žilni obročki, predhodno skrčeni z fenilefrinom, pod vplivom izvlečka relaksirali. Izvleček deluje koncentracijsko odvisno in deluje v celem spektru konstantno, do zasičenja ne pride. Dvofaktorska analiza variance je pokazala, da se sprostitve žilnih obročkov značilno razlikuje od kontrole. Poskus z L-NNA je pokazal, da izvleček deluje na eNOS oz. na signalno pot pred tem encimom, ki pospešuje njegovo aktivnost, saj je ob predhodni inkubaciji z L-NNA sposobnost relaksacije skoraj popolnoma zavrta (Slika 7).

Pri primerjavi površin pod krivuljo smo ugotovili podobno. Izvleček izzove relaksacijo značilno glede na kontolo, relaksacije pa ni, kadar je inhibirano delovanje encima eNOS (Slika 8).

Lastnost izvlečka, da relaksira žilo, bi lahko izkoristili pri preprečevanju oziroma zmanjševanju endotelijske disfunkcije, ki ima pomembno vlogo pri razvoju ateroskleroze in posledično pri razvoju ostalih srčno-žilnih obolenj. Okvara žilnega endotelija se med drugim kaže tudi kot zmanjšana sinteza NO, kar vpliva na slabšo relaksacijo žile, mi pa smo uspeli dokazati, da izvleček poveča aktivnost encima, ki je odgovoren za zvečano koncentracijo NO.

Relaksacija, odvisna od endotelija, je bila dokazana tudi v drugih raziskavah. Podatki kažejo, da spojine, ki so podobne spojinam izvlečka iz lubja navadne jelke (predvsem katehin, epikatehin in epigalokatehin) vplivajo na vazodilatacijo preko aktivacije eNOS, ki je odgovorna za sintezo NO (28, 29, 32).

Pomembno je, da so tudi izvlečku iz lubja obmorskega bora enako dokazali od endotelija odvisno relaksacijo. V *in vitro* poskusu z izoliranimi podganjimi obročki so dokazali močno vazorelaksantno aktivnost, ki je od endotelija odvisna in je bila zavrtta s predhodnim tretiranjem z neselektivnim NOS zaviralcem, tako kot v našem poskusu. Po odstranitvi endotelija Pknogenol ni imel učinka. Pokazalo se je tudi, da so za od endotelija odvisno relaksacijo odgovorni oligomerni procianidini (32).

5.3.2 Poskusi na izoliranih podganjih srcih

Hitrost sproščanja LDH

S pomočjo spremljanja količine LDH v efluentih smo preverjali stopnjo okvare srčnih celic. LDH je namreč citoplazemski encim, ki se začne sproščati iz poškodovanih celic, na primer ob zastoju srca, in kaže stopnjo okvare. Ker med ishemijo srca nismo izvajali vzorčenja, saj srca takrat nismo perfundirali s prehranjevalno tekočino in kisikom, in ni bilo sprotnega izplavljanja snovi iz celic, iz naše metode ne moremo sklepati, kakšno je bilo razmerje med ishemičnimi in reperfuzijskimi okvarami. Vpliv izvlečka smo preverjali pri dveh koncentracijah in sicer pri 100 µg/L in 10 µg/L.

Pri kontrolnih poskusih je hitrost sproščanja LDH v času reperfuzije postopoma naraščala, pri poskusih z izvlečkom pa je hitrost sproščanja LDH naraščala bistveno manj kot pri kontroli oz. celo padala. Nižja koncentracija je izzvala značilno znižanje glede na kontrolo samo v določenih minutah in sicer v 85., 90. in 120. minuti. Višja koncentracija pa je izzvala značilno

znižanje glede na kontrolo v vseh časovnih točkah, največje v 120. minuti. Med koncentracijama pa ni značilnih razlik (Slika 9). Sklepamo lahko, ima izvleček večkomponentno delovanje, ne vpliva samo na relaksacijo žil, temveč so prisotni še drugi učinki, saj bi ob pojavu ishemije v nasprotnem primeru morala biti hitrost LDH povečana zaradi kisikovega šoka. Predvidevamo, da je za ta učinek pomembno tudi antioksidativno delovanje izvlečka.

Iz površin pod krivuljo je razvidno, da se hitrost sproščanja LDH značilno zmanjša pri obeh koncentracijah glede na kontrolo, med koncentracijama pa ni značilnih razlik.

Koronarni pretok

Preverjali smo, kako se koronarni pretok spreminja s časom pri poskusih z dvema koncentracijama izvlečka (100 µg/L in 10 µg/L) glede na kontrolo. Ugotovili smo, da se povišanje koronarnega pretoka pojavi takoj po vzpostavitvi reperfuzije in sicer pri obeh skupinah z izvlečkom značilno glede na kontrolo. S tem smo ponovno potrdili akutni vazodilatatorni učinek izvlečka. Po določenem času učinki izzvenijo, krivulji poskusov z izvlečkom se približata kontroli (Slika 11). Predvidevamo, da se to zgodi, ker tkivni encimi ne nastajajo na novo, kar bi se zgodilo pri *in vivo* poskusih. Koncentracija encimov, na katere deluje izvleček, sčasoma upade, zato se proti koncu poskusa zniža tudi koronarni pretok. Primerjali smo vrednosti koronarnega pretoka in hitrosti sproščanja LDH. Ob vzpostavitvi reperfuzije se koronarni pretok poveča, zato se poveča tudi kisikov šok. Iz tega sledi, da bi se morala hitrost sproščanja LDH povečati, kar pa se v našem primeru ne zgodi, LDH je nižji. Sklepamo, da je LDH nižji zaradi drugih učinkov ekstrakta, torej je prisotno večkomponentno delovanje – izvleček ne deluje samo kot vazorelaksant. Predvidevamo da je vpleteno antioksidativno delovanje.

Iz površin pod krivuljo je razvidno, da se koronarni pretok značilno poveča pri obeh koncentracijah glede na kontrolo, med koncentracijama pa ni značilnih razlik (Slika 12).

Frekvenca

Frekvence utripanja so bile pri vseh skupinah približno enake, do značilnih razlik ni prišlo. Sklepamo, da nobena komponenta, ki bi delovala na ionske kanale, ne prevladuje (Slika 13).

Enako razberemo iz površin pod krivuljami (Slika 14).

Tlak v levem prekatu

Povišan tlak v levem prekatu v reperfuziji je pokazatelj poškodovanega miokarda, saj v poškodovane celice vdre več zunajceličnega kalcija, ki za nekaj časa poveča moč kontrakcij srca. Pri naših poskusih smo opazili rahel trend upadanja, zato lahko sklepamo, da so prisotne komponente s potencialno negativnim inotropnim delovanjem, vendar pa vrednosti niso značilno spremenjene glede na kontrolo. Pri poskusih z izvlečkom so si vrednosti bolj podobne, ni prisotnih aritmij, pri kontroli pa so vrednosti v širokem razponu. Na podlagi tega lahko sklepamo, da ima izvleček zaščitno delovanje (Slika 15).

Površine pod krivuljo kažejo, da preizkušeni koncentraciji izvlečka značilno ne vplivata na tlak v levem prekatu (Slika 16).

Trajanje aritmij

Okvaro src smo določali tudi na podlagi aritmij. V naših poskusih je bilo trajanje vseh štirih opazovanih vrst aritmij (asistolija, prekatna fibrilacija, prekatna tahikardija, prekatni prezgodnji utripi) najdaljše pri kontrolnih poskusih. Asistolija, ki je najbolj nevarna vrsta aritmije, se je pojavila samo pri kontrolnih poskusih, pri poskusih z izvlečkom se ni pojavila. Značilno se je zmanjšalo trajanje ventrikularne tahikardije, ventrikularne fibrilacije in ekstrasistol (Slika 17). Ventrikularna tahikardija in ventrikularna fibrilacija sta pogosti vrsti v kliničnih stanjih. Značilnih razlik med koncentracijama izvlečka ni bilo. Pri višji koncentraciji izvlečka je bilo trajanje aritmij najkrajše (Slika 18). Sklepamo lahko, da izvleček ščiti srce pred ishemično-reperfuzijskimi okvarami, saj močno zniža pojavnost oz. trajanje aritmij. Zmanjšanje aritmij je v naših poskusih eden pomembnejših zaščitnih učinkov delovanja snovi iz izvlečka lubja navadne jelke.

Primerjava rezultatov s podobnimi raziskavami

V podobnih raziskavah na podganjih srcih so ugotavljali zaščitne učinke polifenolov pred ishemično-reperfuzijskimi okvarami. Raziskave so narejene predvsem na polifenolih

zelenega čaja. Pri vseh, tako kot v naši raziskavi, so ugotovili ugodne vplive – polifenoli so zmanjšali miokardno okvaro, povzročeno z ishemijo in reperfuzijo. Vedno več dokazov je, da polifenoli ne delujejo samo kot antioksidanti, ampak delujejo na več nivojih – vpletajo se v signalne poti in vplivajo na aktivnost encimov.

V raziskavi, kjer so ugotavljali učinke epigalokatehin galata, polifenola, ki je zastopan v zelenem čaju, so ugotovili, da je značilno zmanjšal območje infarkta (48). V podobni raziskavi so ugotovili, da epigalokatehin galat ščiti srčne miocite pred apoptozo, ki je izzvana z ishemijo in reperfuzijo ter omeji obseg infarktne območja. Zmanjšan obseg nekroze je bil povezan z olajšanim vzpostavljanjem hemodinamike in izboljšano ventrikularno funkcijo (47). Epigalokatehin galat je značilno zvišal koronarni pretok, inhibiral lipidno peroksidacijo, zvišal izražanje SOD ter zmanjšal koncentracijo LDH v efluentih. Sledi, da ima epigalokatehin galat zaščitne učinke na I/R poškodbo v povezavi s hemodinamskimi spremembami ter kot antioksidant in antiapoptotska učinkovina ob enem (49).

6 ZAKLJUČEK

V tem diplomskem delu smo preverjali akutne učinke izvlečka iz navadne jelke na ishemično-reperfuzijske okvare podganjega srca in vpliv na sposobnost razširitve podganje torakalne aorte.

Ugotovili smo, da izvleček širi žilo in deluje koncentracijsko odvisno. Potrdili smo tudi, da posredno ali neposredno vpliva na aktivacijo encima eNOS in s tem potrdili hipoteze o delovanju izvlečka na endotelij. Dokazane lastnosti bi lahko uporabili pri zdravljenju endotelijske disfunkcije, ki je poglavitni vzrok za razvoj ateroskleroze in vodi v srčno-žilna obolenja. Endotelijska disfunkcija se namreč ravno kaže kot zmanjšana sposobnost žile, da se širi, kar je posledica zmanjšane razpoložljivosti NO.

Tudi s poskusi na izoliranih podganjih srcih smo pokazali, da ima izvleček ugodne zaščitne učinke pri ishemično-reperfuzijskih okvarah, saj značilno zmanjša I/R poškodbo izoliranega podganjega srca. Preverjanje izplavljanja LDH je pokazalo, da izvleček zmanjša stopnjo okvare srčnih mišičnih celic, koronarni pretok se je značilno povečal, kar kaže na sposobnost izvlečka, da širi žile. Na podlagi medsebojne primerjave rezultatov sproščanja LDH in koronarnega pretoka predvidevamo, da ima izvleček večkomponentno delovanje. Izvleček deluje tudi antiaritmogeno, saj značilno zmanjša trajanje aritmij in celo prepreči asistolije, ki se pojavijo pri kontrolnih poskusih. Na podlagi rezultatov smo potrdili hipotezi, da akutno dodajanje izvlečka značilno zmanjša I/R poškodbo srca in deluje na srce antiaritmčno. Ugodne učinke bi lahko izkoristili kot preventivno terapijo pri osebah z zvečanim tveganjem za srčno-žilna obolenja.

Ker smo preverjali samo akutne učinke na samem mestu delovanja bi bilo smiselno rezultate primerjati z raziskavami, ki so narejene po daljšem uživanju izvlečka (60). Smiselno bi bilo proučiti tudi učinke na drugih živalskih modelih, ki so primernejši za primerjavo s človekom, saj na primer pri podganah ne moremo preučevati antioksidativnih učinkov, ker same sintetizirajo vitamin C. Na živalskih modelih je bilo posredno dokazano, da absorpcija poteka (60), vendar pa bi bilo potrebno podrobneje raziskati absorpcijo in metabolizem izvlečka ter predpostavljene mehanizme izvlečka, saj je bila do sedaj dokazana samo močna antioksidativna aktivnost *in vitro*.

7 LITERATURA

1. Zorc-Pleskovič R, Milutinović-Živin A, Petrovič D: Histologija, učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Littera Picta, Ljubljana 2006: 49-52.
2. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W: Histology: A Text and Atlas, 4th Ed., Lippincot Williams& Wilkins, Philadelphia, 2003: 326-350.
3. Štiblar-Martinčič D: Histologija, univerzitetni učbenik, 1. izdaja, Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Littera Picta, Maribor, 2010: 44-45.
4. Guyton CA, Hall EJ: Textbook of Medical Physiology, 11th Ed., Elsevier, Philadelphia, USA, 2006: 87-233.
5. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW, Higgins AJ, Julian DG, Lab MJ, Manning AS, Northover BJ, Parratt JR, Riemersma RA, Riva E, Russell DC, Sheridan DJ, Winslow E, Woodward B: The Lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 447-55.
6. Kumar P, Clark M: Clinical medicine, 7th Ed., Elsevier, Spain, 2009: 743-744
7. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL: Basic pathology. 7th edition. W.B. Saunders Company 1997; 4-11, 310-17.
8. Opie LH: Reperfusion injury and its pharmacological modification. *Circul* 1989; 80(4):1049-62.
9. Miyamae M, Camacho SA, Weiner MW, Figueredo VM: Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of $[Ca^{2+}]_i$ overload in rat hearts. *Am J Physiol* 1996; 271: H2145-H2153.
10. Ribarič S, Bresjanac M, Črne-Finderle N, et al: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. izdaja. Inštitut za patološko fiziologijo 1998; 15-45.
11. McDonough KM: The role of alcohol in the oxidant antioxidant balance in heart. *Fronti Biosc* 1999; 4:D601-606.
12. Lunder M, Kuhar P: Zaščitni učinki rdečega vina pred ishemično-reperfuzijskimi okvarami izoliranega podganjega srca, Raziskovalna naloga, Ljubljana, 2006.
13. Bajrovič F, Bresjanac M, Črne-Finderle N, Grubič Z, Kordaš M, Kovačič U, Marš T, Ribarič S, Sket D, Sketelj J, Šuput D, Zorec R, Živin M: Temelji patološke fiziologije, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Littera picta, Ljubljana, 2009: 175-184.

14. Curtis MJ: Characterisation, utilisation and clinical relevance of isolated perfused heart models of ischaemia-induced ventricular fibrillation, *Cardiovasc Res* 1998, 39:194–215.
15. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: Rang and Dale's pharmacology, 6th Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007; 29, 144-188, 265-273, 298-320.
16. Vanhoutte PM: Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease, *Circ J*, 2003; 67: 572-575.
17. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S: Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease, *Diabetes Care*, 2009; 32: 314-321.
18. Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction and atherosclerosis, *Eur Heart J*, 1997; 18: 19-29.
19. Luscher TF, Barton M: Biology of the endothelium, *Clin Cardiol.*, 1997; 20:II-3-10.
20. Kinlay S, Libby P, Ganz P: Endothelial function and coronary artery disease, *Curr Opin Lipidol*, 2001; 12 (4): 383-9.
21. Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, et al: Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis, *J Am Coll Cardiol.*, 1994; 23 (4): 833-43
22. Bermudez V, Bermudez F, Acosta G, et al: Molecular mechanisms of endothelial dysfunction: from nitric oxide synthesis to ADMA inhibition, *Am J Ther.*, 2008; 15 (4) :326-33.
23. Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants, 2th Ed., Lavoisier Publishing, Paris, 1999: 223-261, 309-403.
24. Bhooshan-Pandey K, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009; 2;5: 270-278.
25. Prijatelj N: Farmakognozija; kemijska struktura naravnih spojin, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2005: 82-86.
26. Kočevar N, Glavač I, Kreft S: Flavonoidi. *Farm vestn* 2007; 58: 145-148.
27. Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak M-H, Muller B, Chataigneau, Schini-Kerth V: Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: Role of NADPH oxidase. *Oxford journals*, 2006; 71 (4): 794-802.

28. Khodja NI, Chataigneau T, Auger C, Schini-Kerth V: Grape-Derived Polyphenols Improve Aging-Related Endothelial Dysfunction in Rat Mesenteric Artery: Role of Oxidative Stress and the Angiotensin System. *Plos One*, 2012; 7 (2): e32039.
29. Jia H, Wen Liu J, Ufur H, Sheng He G, Liqian H, Chen P: The antihypertensive effect of ethyl acetate extract from red raspberry fruit in hypertensive rats. *Pharmacognosy Magazine*, 2011; 7 (25): 19-24.
30. Tadano N, Du CK, Yumoto F, Morimoto S, Ohta M, Xie MF, Nagata K, Zhan DY, Lu QW, Miwa Y, Takahashi-Yanaga F, Tanokura M, Ohtsuki I, Sasaguri T: Biological actions of green tea catechins on cardiac troponin C. *Br J Pharmacol.*, 2010; 161(5): 1034–1043.
31. Duffy SJ, Keanev JF, Holbrook M, Gokce N, Swerdlloff PL, Frei B, Vita JA: Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *American Heart Association, Circulation*, 2001; 104: 151-156.
32. Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schönlau F, Rohdewald P, Jialal I: Supplementation with a Pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids*, 2002; 37: 931-934.
33. Enseleit F, Sudano I, Periat D, Winnik S, Wolfrum M, Flammer AJ, Fröhlich GM, Kaiser P, Hirt A, Haile SR, Krasniqi N, Matter CM, Uhlenhut K, Högger P, Neidhart M, Lüscher TF, Ruschitzka F, Noll G: Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled cross over study. *European Heart Journal*, 2012; 10: 1-9.
34. Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K: A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 133: 261-277.
35. Ohkita M, Kiso Y, Matsumura Y: Improvement of Vascular Endothelial Function by French Maritime Pine Bark Extract (Flavangenol). *Journal of Pharmacological Sciences*, 2011; 115: 461 – 465.
36. Iravani S, Zolfaghari B: Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Res Pharm Sci*, 2011; 6(1):1-11.
37. Rezzani R, Porteri E, Ciuceis CD, Bonomini F, Rodella LF, Paiardi S, Boari GEM, Platto C, Pilu A, Avanzi D, Rizzoni D, Rosei EA: Effects of Melatonin and

- Pycnogenol on Small Artery Structure and Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *American Heart Association*, 2010; 55:1373-1380.
38. Zibadi S, Rohdewald PJ, Park D, Watson RR: Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol supplementation. *Science Direct*, 2008; 315-320.
 39. Sivoňová M, Žitňanová I, Horáková Ľ, Štrosová M, Muchová J, Balgavý P, Dobrota D, Ďuračková Z: The Combined Effect of Pycnogenol with Ascorbic Acid and Trolox on the Oxidation of Lipids and Proteins. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2006; 25:379-396.
 40. M Sivoňová, I Waczulíková, E Kilanczyk, M Hrnčiarová, M Bryszewska, B Klajnert, Z Ďuračková: The Effect of Pycnogenol on the Erythrocyte Membrane Fluidity. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2004; 23: 39-51.
 41. Mechora Š, Kos I: Srebrna kraljica gozdov. *Proteus*, 2010; 72 (5): 206-210.
 42. Schauer T: Rastlinski vodnik. Prva izdaja, Modrijan založba, d.o.o., Ljubljana, 2008; 428.
 43. Mravlje V: Analiza antioksidativnih spojin v skorji navadne smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) in skorji navadne jelke (*Abies alba* Mill.), Diplomsko delo, Ljubljana, 2008.
 44. Čajić A: Karakterizacija in poskus identifikacije komponent antioksidativnega ekstrakta lubja navadne jelke (*Abies alba*), Diplomsko delo, Ljubljana, 2011.
 45. <http://www.arspharmae.com/izdelki/abigenol-4/> (datum dostopa 1. 4. 2013)
 46. Bošnjak D: Prodali patentno prijavo. *Delo* 2009; 209: 16.
 47. Townsend PA, Scarabelli TM, Pasini E, Gitti G, Menegazzi M, Suzuki H, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A: Epigallocatechin-3-gallate inhibits STAT-1 activation and protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-induced apoptosis. *The FASEB Journal*, 2004; 8 (13):1621-3.
 48. Lee SK, Kim JH, Kim JS, Jang Y, Kim J, Park YH, Chun KJ, Lee MY: Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate-induced cardioprotection may attenuate ischemia-reperfusion injury through adenosine receptor activation: a preliminary study. *Korean J Anesthesiol*, 2012; 63 (4): 340-345.
 49. Piao CS, Kim DS, Ha KC, Kim HR, Chae HJ, Chae SW: The Protective Effect of Epigallocatechin-3 Gallate on Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Hearts: An ex vivo Approach. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2011; 15 (5): 259-66.
 50. Yamazaki KG, Romero-Perez D, Barraza-Hidalgo M, Cruz M, Rivas M, Cortez-Gomez B, Ceballos G, Villarreal F: Short- and long-term effects of (-)-epicatechin on

- myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 295 (2): H761-7.
51. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> (datum dostopa 1.4.20013)
52. Solar B: Izolacija biološko aktivnih snovi iz vina z delovanjem na izolirane žile podgane. Diplomsko delo, Ljubljana, 2009.
53. Bhooshan-Pandey K, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009; 2;5: 270-278.
54. Curin Y, Andriantsitohaina R: Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological reports* 2005; 57: 97-107.
55. Crespy V, Williamson G: A review of the health effects of green tea catechins *in vivo* animal models. *J Nutr* 2004; 134: 3431S-3440S.
56. Vita JA: Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 292-297.
57. Mackman N: The role of the tissue factor-thrombin pathway in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Semin Vasc Med*, 2003; 3:193-8.
58. Farkas A, Qureshi A, Curtis MJ: Inadequate ischaemia-selectivity limits the antiarrhythmic efficacy of mibefradil during regional ischaemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. *Br J Pharmacol*, 1999; 128: 41-50.
59. Pabla R, Curtis M: Effects of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart. *Circ Res*, 1995; 77:984-92.
60. Mikelj A: Vpliv izvlečka iz lubja bele jelke (*Abies alba* Mill.) na funkcionalne in morfološke spremembe arterij pri budrah krmljenih z aterogeno krmo.