

Učinci vina na izolirano srce i aortu zamorčića i štakora : značaj razlika među vrstama

Brizić, Ivica

Doctoral thesis / Disertacija

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:112558>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

IVICA BRIZIĆ

**UČINCI VINA NA IZOLIRANO SRCE I AORTU
ZAMORČIĆA I ŠTAKORA: ZNAČAJ RAZLIKA MEĐU
VRSTAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2009.

Ova disertacija je izrađena u laboratorijima Katedre za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Mladen Boban dr.med.

ZAHVALE

Hvala svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ove disertacije. Posebne zahvale prof. Mladenu Bobanu, koji mi je omogućio izradu ove disertacije i nesebično me vodio od početka do kraja ovoga istraživanja.

Posebne zahvale mojoj obitelji (Danijeli i maloj Ivi) na strpljenju i podršci.

| | |
|--|-----------|
| SADRŽAJ | 1 |
| POPIS OZNAKA I KRATICA | 3 |
| 1. UVOD | 5 |
| 1.1. Osnovna funkcija endotela | 7 |
| 1.2. Vazodilatacijski učinci crnog vina | 10 |
| 1.3. Polifenolni spojevi iz vina | 13 |
| 1.4. Mehanizmi ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja | 19 |
| 1.5. Mehanizmi ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja u srcu zamorčića i štakora | 24 |
| 1.6. Protektivni učinci komponenti crnog vina na oštećenja izoliranog srca nastala ishemijom i reperfuzijom | 27 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 30 |
| 2.1. Izolirani aortni prstenovi štakora i zamorčića | 30 |
| 2.2. Izolirana srca štakora i zamorčića | 30 |
| 2.3. Biokemijska analiza vina | 30 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 31 |
| 3.1. Crno vino i kemijske tvari | 31 |
| 3.2. Pokusne životinje | 32 |
| 3.3. Biokemijska analiza crnog vina | 32 |
| 3.3.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta crnog vina | 32 |
| 3.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu | 32 |
| 3.3.3. Određivanje koncentracije katehina u crnom vinu | 33 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.4. Određivanje koncentracije flavonoida i neflavonoida u crnom vinu | 34 |
| 3.3.5. Određivanje koncentracije antocijana u crnom vinu | 34 |
| 3.4. Mjerenja vazodilatacije na izoliranim aortnim prstenovima | 36 |
| 3.5. Mjerenja na modelu izoliranog srca | 39 |
| 3.6. Statističke metode | 42 |
| 4. REZULTATI | 43 |
| 4.1. Biokemijska analiza vina | 43 |
| 4.2. Izolirani aortni prstenovi štakora i zamorčića | 44 |
| 4.3. Izolirana srca štakora i zamorčića | 53 |
| 4.3.1. Učinci crnog vina na parametre srčane funkcije u bazalnim uvjetima | 54 |
| 4.3.2. Učinci crnog vina na parametre srčane funkcije u uvjetima ishemije i reperfuzije | 56 |
| 5. RASPRAVA | 70 |
| 5.1. Izolirani aortni prstenovi štakora i zamorčića | 70 |
| 5.2. Izolirana srca štakora i zamorčića | 75 |
| 6. ZAKLJUČCI | 84 |
| 7. SAŽETAK | 85 |
| 8. SUMMARY | 89 |
| 9. POPIS LITERATURE | 90 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 101 |

POPIS OZNAKA I KRATICA

AA *eng.* – arachidonic acid

Ach – acetilkolin

ATP – adenzin trifosfat

AMP – adenzin monofosfat

ANOVA – analiza varijance

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

cGMP – ciklički gvanozin monofosfat

Ca⁺⁺ - kalcij

COX *eng.* – cyclooxygenase

CV – crno vino

DMSO – dimetil sulfoksid

DO₂/MVO₂ – omjer dopreme i potrošnje kisika

EC₅₀ – efektivna (djelotvorna) koncentracija koja čini 50 % učinka

EET kiseline – epoksieikosatrienoične kiseline

EDHF *eng.* – endothelium-derived hyperpolarizing factor

EDRF *eng.* – endothelium-derived relaxing factor

E_{max} – maksimalna relaksacija

eNOS – endotelna NO sintetaza

ET – ekvivalent troloxa

EGK – ekvivalent galne kiseline

FRAP *eng.* – ferric reducing antioxidant power

GP *eng.* – guinea pig

H⁺ - vodik

H₂O₂ - vodikov peroksid

L-Arg – L - arginin

LOOH – lipidni peroksid

L-NAME – l-nitro arginin metil ester

MaxiK, BK – kalijevi kanali ovisni o kalciju

mM – milimol

ml – mililitar

mmHg – milimetar žive

msec – milisekunda

Na⁺ - natrij

NA – noradrenalin

NAD – nikotinamid adenin dinukleotid

nM – nanomol

NNP – natrijev nitroprusid

NO *eng.* – nitric oxide

·O₂⁻ - superoksidni anion

ODYA – 16 - oktadecinoična kiselina

·OH – hidroksilni radikal

·ONOO⁻ - peroksinitrit

PGI₂ – prostaciklini

RW *eng.* – red wine

SOD – enzim superoksid dismutaza

SR – sarkoplazmatski retikulum

TEA – tetraetilamonij

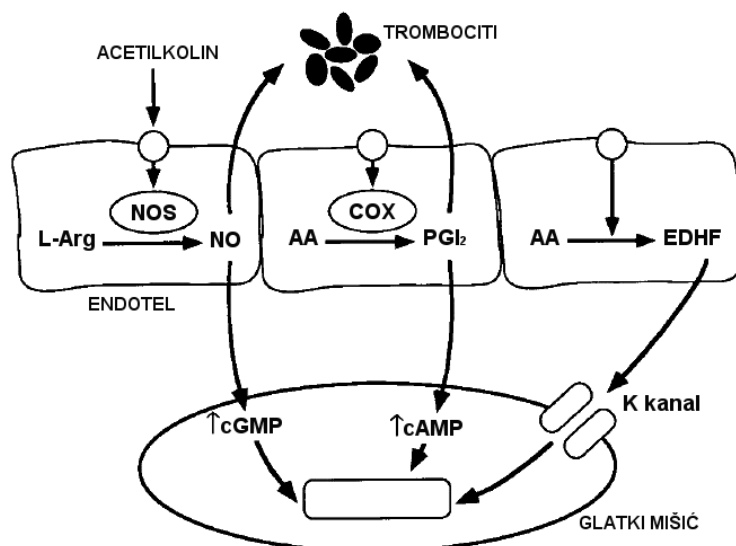
TPTZ – 2,4,6–tri (2- piridil)–s–triazinom

1. UVOD

Iako su zamorčići i štakori jedni od najčešće korištenih životinjskih modela u *in vitro* fiziološkim i farmakološkim istraživanjima kardiovaskularnog sustava, izravne komparativne studije o učincima neke tvari, u istim eksperimentalnim uvjetima, između ove dvije vrste izrazito su rijetke. Zanemarivanje razlika u fiziološkim mehanizmima između ove dvije vrste može doprinijeti pogrešnim interpretacijama eksperimentalnih rezultata dobivenih testiranjem neke tvari na jednoj od ovih vrsta. Također, fiziološke razlike između ove dvije vrste mogu značajno mijenjati njihovo podnošenje patofiziološkog opterećenja kao što je ishemija i reperfuzija. Stoga, cilj ove disertacije bio je istražiti i usporediti parametre kardiovaskularne funkcije između ove dvije vrste u bazalnim uvjetima, kao i u uvjetima globalne ishemije i reperfuzije. Nadalje, željeli smo istražiti i usporediti učinke crnog vina na iste parametre, na modelu izoliranog srca i aortnih prstenova dobivenih iz štakora i zamorčića.

1.1. Osnovna funkcija endotela

Istraživanja provedena posljednjih dvadesetak godina pokazala su kako endotel nije samo pasivna barijera između plazme i glatkomišićne stijenke krvnih žila, već je važan sudionik brojnih procesa u krvi i krvnim žilama. Dokazano je da endotel sintetizira brojne medijatore koji kontroliraju tonus krvnih žila (izazivajući vazokonstrikciju ili vazodilataciju), sudjeluje u procesu hemostaze, utječe na funkciju trombocita i leukocita te na proliferaciju i apoptozu stanica.



Slika 1. Shema najvažnijih vazodilatacijskih medijatora endotelnog porijekla

(L-Arg – L-Arginin, NO – dušikov oksid, NOS – NO sintetaza, COX – *eng.* cyclooxygenase, AA – *eng.* arachidonic acid, EDHF – *eng.* endothelium-derived hyperpolarizing factor, PGI₂ – prostaciklini, cGMP – ciklički gvanozin monofosfat, cAMP – ciklički adenzin monofosfat)

Glavna uloga endotela je modulacija tonusa krvnih žila koju održava s više različitih čimbenika. Najvažniji endotelni čimbenik u regulaciji krvožilnog tonusa jest dušikov oksid (NO), tzv. čimbenik relaksacije endotelnog podrijetla (*eng.* endothelium-derived relaxing factor, EDRF) kojeg su otkrili 1980. Furchgott i Zawadzki (1, 2). U endotelnim stanicama krvnih žila nalazi se konstitutivna, endotelna NO sintetaza (eNOS) koja koristi aminokiselinu L-arginin i molekularni kisik za proizvodnju NO-a i L-citrulina, uz prisustvo više različitih kofaktora. NO zatim pasivnom difuzijom prelazi iz endotela u priležne stanice glatkih mišića, gdje aktivira citosolnu gvanilat ciklazu i tako povećava količinu cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) (3). Protein kinaza ovisna o

cGMP-u povećava izlazak kalcija (Ca^{++}) iz glatkomišićnih stanica i tako smanjuje aktivnost kontraktilnog aparata uz posljedično opuštanje glatkih mišića odnosno vazodilataciju krvnih žila. Osim toga, protein kinaza ovisna o cGMP-u uzrokuje fosforilaciju kalijevih (K^+) kanala što uzrokuje hiperpolarizaciju glatkomišićnih stanica i na taj način doprinosi vazodilataciji krvnih žila (4). Na nekim vrstama krvnih žila NO može izravno, neovisno o cGMP-u, aktivirati K^+ kanale i uzrokovati vazodilataciju (5). Hipoteza da je NO najvažniji medijator endotel-ovisne vazodilatacije, te da stvaranje NO-a dovodi do vazodilatacije, potvrđena je u pokusima s analogima L-arginina (lažnim supstratima eNOS), gdje inhibicija nastanka NO-a uzrokuje povećanje arterijskog tlaka u pokusnih životinja (6, 7). Stvaranje NO-a u endotelnim stanicama reguliraju brojni humoralni i fizikalni podražaji (8). Različite endogene tvari, poput acetilkolina (Ach), bradikinina i histamina uzrokuju oslobađanje NO-a koji zatim difundira u glatki mišić, ali i u lumen krvne žile, gdje ostvaruje druge važne učinke. Osim vazodilatacijskog učinka, NO smanjuje proliferaciju glatkomišićnih stanica, adheziju i agregaciju trombocita (9). Smanjeno stvaranje NO-a i njegovih učinaka kod endotelne disfunkcije smatra se ključnim u nastanku različitih patoloških stanja, poput ateroskleroze ili arterijske hipertenzije.

Prostaciklini (PGI_2) su metaboliti arahidonske kiseline (*eng.* arachidonic acid, AA) koji nastaju u endotelnim stanicama uz pomoć enzima ciklooksigenaze (*eng.* cyclooxygenase, COX). PGI_2 uzrokuju vazodilataciju krvnih žila aktivirajući adenilat ciklazu i povećavajući količinu cAMP-a (ciklički adenzin monofostat) u glatkomišićnim stanicama (10, 11). Nastali cAMP stimulira otvaranje nekoliko vrsta K^+ kanala (K^+ kanale ovisne o ATP-u, K^+ kanale ovisne o Ca^{++}) i tako uzrokuje hiperpolarizaciju glatkomišićnih stanica,

odnosno vazodilataciju krvnih žila (12). Osim toga, PGI₂ povećavaju izlazak Ca⁺⁺ iz citosola stanica glatkog mišića što također doprinosi vazodilataciji krvnih žila. Za razliku od NO-a, vazodilatacijska aktivnost PGI₂ je uvjetovana prisutnošću specifičnih receptora na glatkomišićnim stanicama krvnih žila (13, 14). To znači da PGI₂ ne mogu uzrokovati vazodilataciju krvnih žila koje ne posjeduju takve receptore. Doprinos prostaciklina u endotel-ovisnoj dilataciji relativno je malen u odnosu na NO (8). PGI₂ i NO pokazuju komplementarne učinke u vazodilatacijskom procesu. Dokazano je da NO potencira učinke PGI₂ na glatkomišićne stanice krvnih žila, a PGI₂ povećava oslobađanje NO-a iz endotelnih stanica (15, 16). NO neizravno produžuje poluvijek cAMP-a, drugog glasnika PGI₂ tako što, povećavajući razinu cGMP-a smanjuje raspoloživost fosfodiesteraze za razgradnju cAMP-a (15, 17). PGI₂ i NO mogu uzrokovati vazodilataciju krvnih žila otvaranjem istih vrsta K⁺ kanala. Tijekom inhibicije jednog od njih, drugi medijator može nadoknaditi nedostatak drugog i uzrokovati jednaku vazodilataciju (5, 12).

U većine arterija manjeg promjera, endotel-ovisna vazodilatacija može biti očuvana unatoč potpunoj inhibiciji sinteze PGI₂ i NO-a (18, 19). Takva vazodilatacija karakterizirana je endotel-ovisnom hiperpolarizacijom glatkih mišića a posredovana je «čimbenikom hiperpolarizacije endotelnog podrijetla» (*eng.* endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF). Unatoč brojnim studijama, identitet EDHF-a je još uvijek nepoznat. Kao kandidati najčešće se spominju epoksieikosanoidi i ioni kalija (8, 20). Značaj EDHF-a u usporedbi s NO-om veći je u arterijama manjeg promjera, odnosno raste kako se lumen krvne žile smanjuje (21). Utvrđeno je da kombinacija specifičnih blokatora K⁺ kanala karibdotoksina i apamina, kao i visoke izvanstanične koncentracije K⁺,

inhibiraju učinak EDHF-a (22). To upućuje da K^+ struja, odnosno K^+ kanali ovisni o Ca^{++} srednje i/ili spore provodljivosti, izravno ili neizravno sudjeluju u vazodilatacijskom učinku EDHF-a.

Osim o tipu i veličini krvne žile, mehanizmi vazodilatacije ovise i o eksperimentalnoj vrsti. Kao primjer možemo navesti različite učinke Ach i histamina na aortne prstenove zamorčića i štakora. Utvrđeno je da Ach uzrokuje snažnu vazodilataciju aortnih prstenova štakora i slabu vazodilataciju aortnih prstenova zamorčića (15, 16). Hozumi i suradnici su u svom istraživanju uočili značajnu razliku u vazodilatacijskom učinku Ach i tvari P u aortalnim prstenovima zamorčića. Ach je pokazao značajno slabiji vazodilatacijski učinak u odnosu na tvar P. Utvrđeno je da Ach uzrokuje oslobađanje samo NO-a iz endotelnih stanica izolirane aorte zamorčića, dok tvar P posreduje u oslobađanju NO-a i EDHF-a (23). Za razliku od aorte zamorčića, gdje NO i EDHF podjednako sudjeluju u vazodilataciji, u štakorskoj aorti taj učinak uglavnom je posredovan NO-om (24). Još veće razlike među vrstama u vazodilatacijskom učinku zabilježene su kod histamina. Histamin uzrokuje vazodilataciju aortnih prstenova štakora dok u aortalnim prstenovima zamorčića uzrokuje vazokonstrukciju (25). Svi navedeni medijatori svoje učinke ostvaruju preko specifičnih receptora u stijenci krvnih žila.

1.2. Vazodilatacijski učinci vina

Vino, osobito crno, pokazuje brojne i značajne učinke na endotel i vaskularnu funkciju. Između ostalog, vino i njegovi sastojci utječu na arterijski tlak, inhibiraju migraciju i proliferaciju stanica glatkih mišića, inhibiraju agregaciju trombocita i uzrokuju vazodilataciju krvnih žila (26).

Prvu studiju koja je proučavala vazodilatacijske učinke polifenola i vina proveli su Fitzpatrick i suradnici 1993. godine na izoliranoj štakorskoj aorti (27). U ovoj studiji Fitzpatrick je pokazao vazodilatacijske učinke različitih vrsta crnog i bijelog vina, soka od grožđa kao i učinke pojedinih polifenolnih spojeva iz vina. Utvrđeno je da je vazodilatacijski učinak vina posredovan produkcijom NO-a i njegovog drugog glasnika cGMP-a. Nakon pionirske studije Fitzpatricka, slijedile su studije na različitim humanim i životinjskim izoliranim krvnim žilama koristeći biljne polifenole iz različitih izvora: različita vina, kakao, zeleni čaj, glog i druge (28-32). Cishek je u studiji na izoliranoj aorti kunića pokazao vazodilatacijske učinke crnog vina (Merlot). Koristeći farmakološke alate kao što su L-NAME-a i indometacin, dokazao je potpunu ovisnost vazodilatacije o NO-u, dok indometacin kao inhibitor PGI₂, nije imao značajne učinke na vazodilatacijsku aktivnost vina. Odstranjivanjem endotela s aortnih prstenova kunića, vazodilatacijski učinak vina je izostao (29). Ubrzo nakon toga slijedile su dvije studije Andriambelosona koje su pokazale da je vazodilatacijski učinak vina praćen povećanom produkcijom cGMP. Osim endotel-ovisne vazodilatacije, u navedenim studijama je zabilježena i endotel-neovisna vazodilatacija koja je uzrokovana primjenom ekstremno velikih koncentracija polifenolih spojeva iz vina (28, 33). Daljnja istraživanja su pokazala da polifenoli iz crnog vina povećavaju razinu Ca⁺⁺ u endotelnim stanicama krvnih žila, što je

uvjet za aktivaciju NO-sintetaze i oslobađanje NO-a iz endotelnih stanica (34, 35). Za razliku od endotelnih stanica, navedeni učinci nisu zabilježeni u glatkomišićnim stanicama krvnih žila (34). Osim što potiče sintezu i oslobađanje NO-a, crno vino svojim antioksidacijskim učinkom također reducira degradaciju, produžuje poluvijek i povećava biodostupnost NO-a (36).

Pored NO-a, u vinom uzrokovanoj vazodilataciji primijećena je uključenost i drugih čimbenika vazodilatacije. Derek i njegov tim su pokazali da crno vino uzrokuje produkciju PGI₂ iz izoliranih endotelnih stanica (37). Sukladno tome, vazodilatacija uzrokovana procijanidinima je značajno reducirana kada su prstenovi prethodno izloženi indometacinu (38). Međutim, neke studije nisu pokazale uključenost PGI₂ u vazodilatacijskom učinku vina, odnosno indometacin nije mijenjao učinak vina (29, 39). Ovo upućuje da vazodilatacijski učinak vina, koji je posredovan PGI₂, ovisi o vrsti žile i eksperimentalnom modelu.

Na nekim vrstama krvnih žila primjećeno je da unatoč inkubaciji prstenova sa L-NAME-om i indometacinom zaostaje određena vazodilatacija. U studijama koje su provedene na mezenterijalnim i koronarnim krvnim žilama, dokazano je da i EDHF sudjeluje u vazodilataciji posredovanoj polifenolima iz crnog vina (39, 40).

Osim što sastojci vina povećavaju sintezu vazodilatatornih komponenti iz endotelnih stanica krvnih žila, u nekoliko studija se pokazalo da polifenoli iz crnog vina smanjuju produkciju vazokonstriktornih tvari. Corder je u svojoj studiji na goveđim endotelnim stanicama pokazao da polifenoli iz vina značajno inhibiraju sekreciju endotelina i transkripciju proendotelina (41). Slične učinke

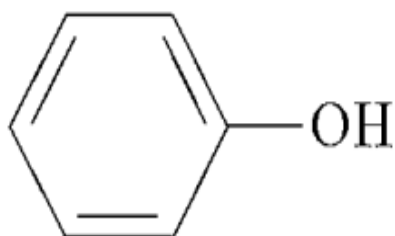
na sintezu endotelina su pokazali izolirani polifenoli kao što su resveratrol i kvercetin (42, 43).

Rijetke su studije koje su u *in vitro* uvjetima istraživale vazodilatacijske učinke crnog vina na koronarnim krvnim žilama, a rezultati postojećih studija nisu usuglašeni. Flesch je dokazao da pojedina francuska i talijanska crna vina dilatiraju humane koronarne krvne žile, dok njemačka vina nemaju takve učinke (30). U studiji koju su proveli Rending i njegov tim, crno vino nije pokazalo vazodilatacijski učinak na koronarnim krvnim žilama štakora (44). Ndiaye je u svome istraživanju na koronarnim žilama svinje pokazao vazodilatacijski učinak crnog vina (40). Iz navedenog se može zaključiti da vazodilatacijski učinak crnog vina na koronarnu cirkulaciju ovisi o modelu koji je korišten u istraživanju, ali i porijeklu crnog vina.

Ne postoje studije koje su istraživale vazodilatacijske učinke crnog vina na krvnim žilama zamorčića, a niti studije koje su uspoređivale vazodilatacijske učinke između više vrsta.

1.3. Polifenolni spojevi iz vina

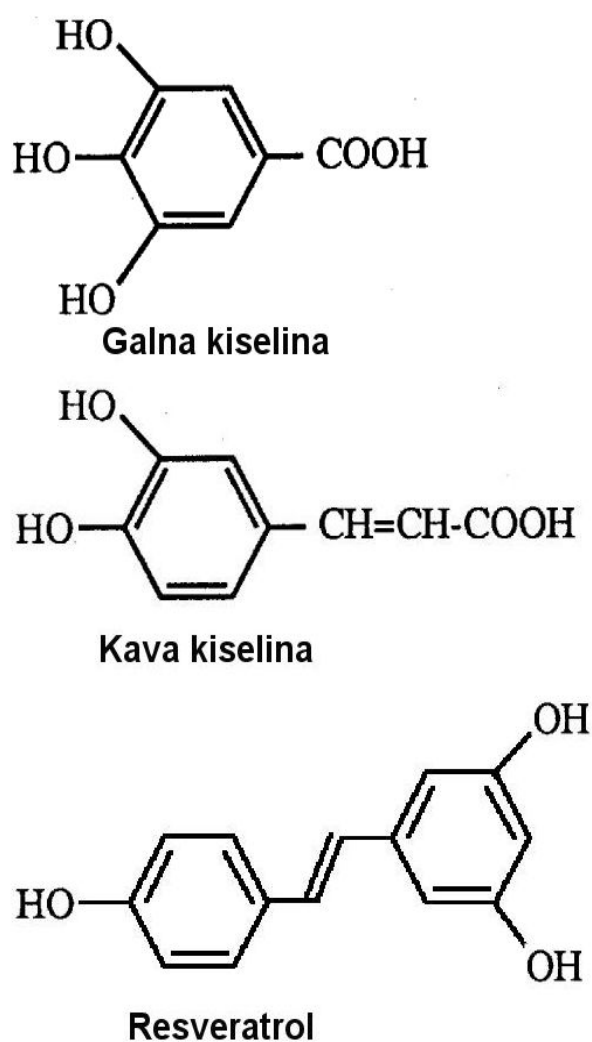
Polifenoli su spojevi široko rasprostranjeni u ishrani i nalazimo ih u različitim vrstama voća, povrća, žitarica i napitaka, kao što je vino. Glavna uloga polifenola u biljaka je zaštita od različitih infekcija, ultraljubičastog zračenja, fizičkih oštećenja i drugih vrsta stresa (45). Jednostavni fenoli su spojevi s jednim aromatskim prstenom koji ima jednu ili više hidroksilnih skupina i osnovna su građevna jedinica svih polifenola (Slika 2.).



Slika 2. Osnovni fenolni prsten

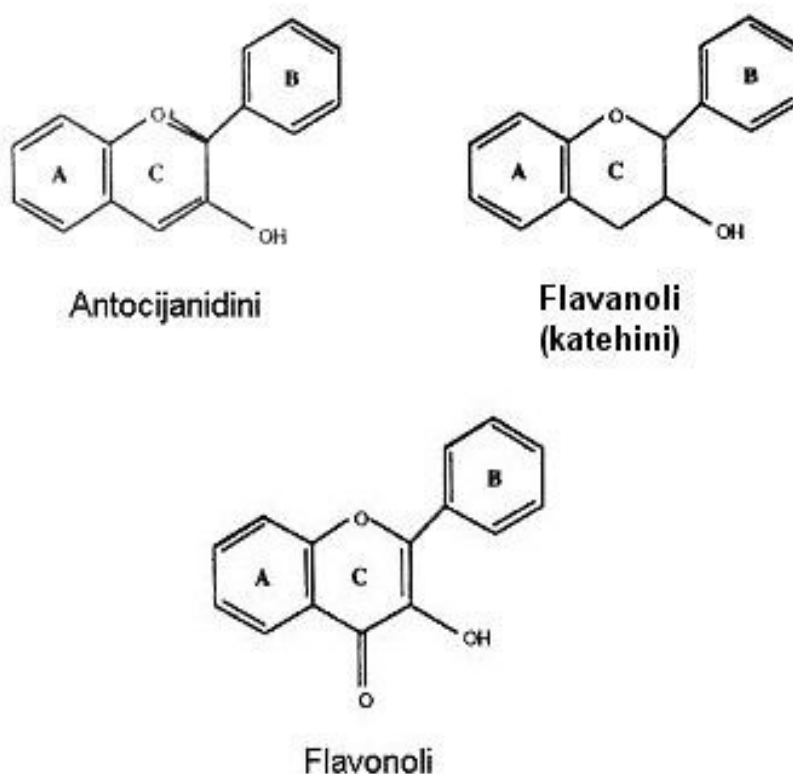
Polifenoli su spojevi koji imaju više fenolnih prstenova unutar svoje strukture. Procjenjuje se da postoji više od 8 000 različitih fenolnih struktura (26). Vinski polifenoli se dijele na dvije osnovne skupine, neflavonoide i flavonoide.

U neflavonoide spadaju fenolne kiseline i stilbeni. Od fenolnih kiselina, najvažniji su derivati hidroksicimetne kiseline (kava kiselina) i derivati benzojeve kiseline (galna kiselina) (Slika 3.). Od stilbena, najvažniji predstavnik je resveratrol koji nastaje u grožđu kao odgovor na različite vrste stresa. Jedan je od najistraživanijih fenolnih spojeva s dokazanim brojnim povoljnim biološkim učincima (46-48) .



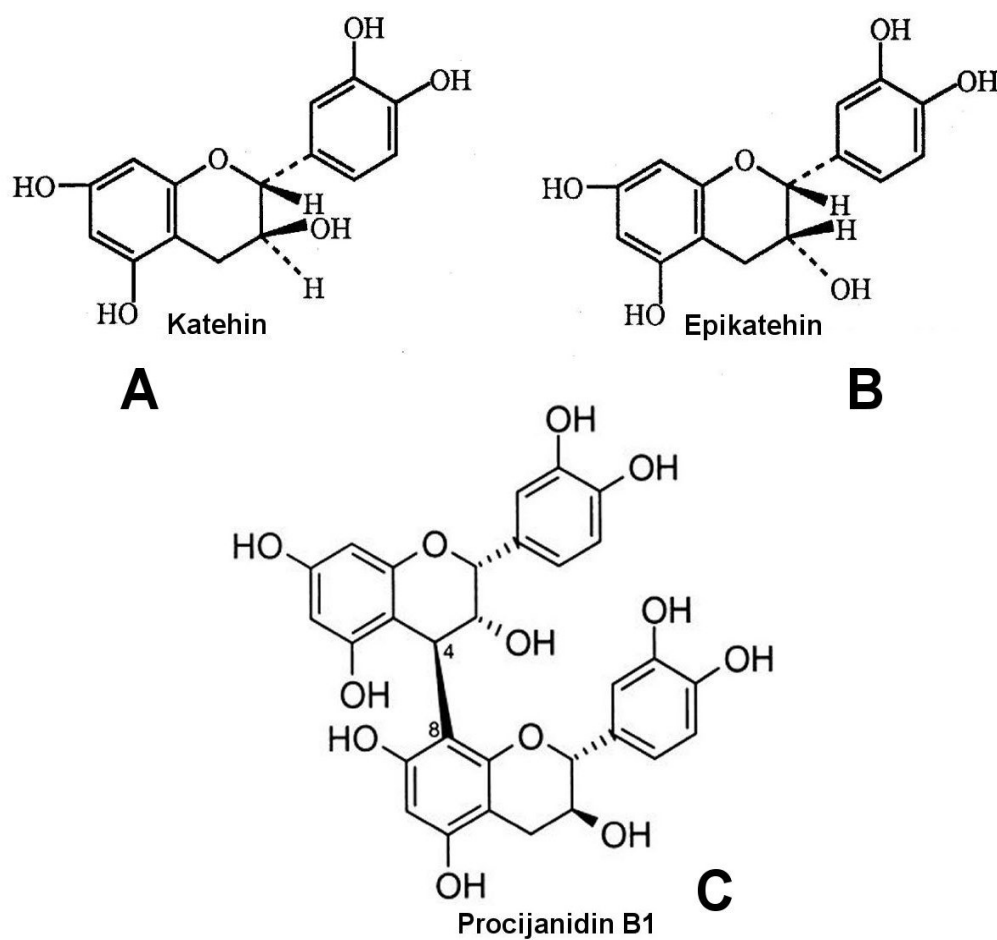
Slika 3. Prikaz nekih neflavonoida iz crnog vina.

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji imaju zajedničku jezgru od tri aromatska prstena (A, B, i C). Na benzenski prsten A izravno je vezan šesteročlani prsten C, koji na poziciji 2 ima spojen benzenski prsten B kao radikal (Slika 4.). Prsten C može biti heterociklički piran kod skupine flavanola (nazivaju se i katehini prema svom glavnom predstavniku) i antocijanidina (tipični predstavnik je cijanidin), ili piron kod skupine flavonola (tipični predstavnik je kvercetin), (46-48). Flavonoidi su najzastupljeniji fenoli u crnom vinu koji se ekstrahiraju iz sjemenki i pokožice grožđa tijekom fermentacije. Alkohol služi kao dobro otapalo za ekstrakciju flavonoida i prelazak ovih spojeva iz grožđa u vino (48).



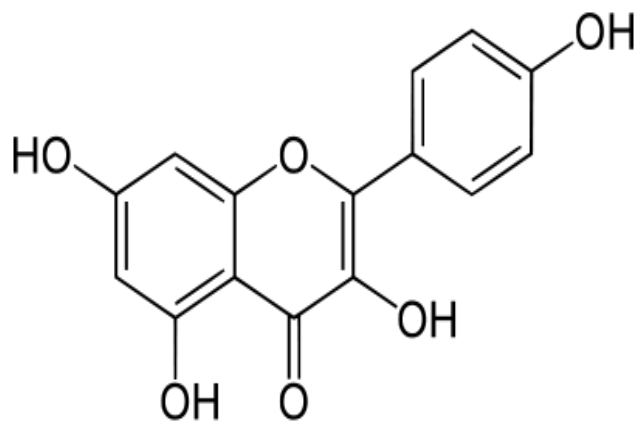
Slika 4. Prikaz glavnih skupina vinskih flavonoida.

Flavanoli su prevladavajući flavonoidi u grožđu i vinu, gdje se nalaze kao aglikoni, za razliku od ostalih pripadnika flavonoida koji su vezani za šećere. Najvažniji predstavnici su monomeri katehina i njegovog stereoizomera epikatehina, te njihovi oligomeri, procijanidini (Slika 5.) Upravo procijanidini čine najveći dio fenolnih spojeva u crnom vinu (0,5-1,5 g/l).

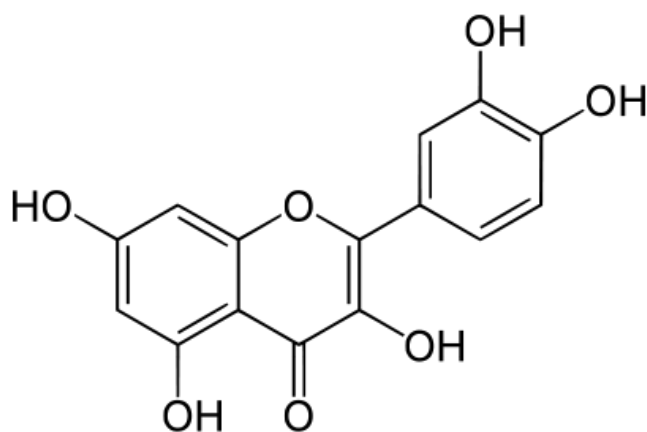


Slika 5. Prikaz nekih flavanola iz crnog vina.

Flavonoli se nalaze kao glikozidi prvenstveno u pokožici grožđa. Na njihovu proizvodnju i količinu značajno utječe sunčeva svjetlost te se čini da ti spojevi djeluju kao prirodna zaštita od sunca i UV zračenja. Najvažniji predstavnici su kvercetin, miricetin i kampferol (Slika 6.).



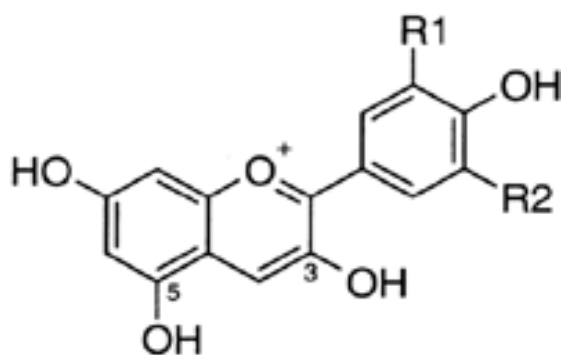
kampferol



kvercetin

Slika 6. Prikaz nekih flavonola iz crnog vina.

Antocijanidini daju boju vinu i grožđu, a njihov specifični konjugirani C prsten odgovoran je za plavo ili crveno obojenje. Najvažniji predstavnici su cijanidin i malvidin (Slika 7.). Antocijanidini su aglikoni koji su vrlo nestabilni i ne postoje kao takvi u vinu i grožđu. U vinu i grožđu su prisutni kao glikozidi i tada se nazivaju antocijanini (46-48).



R1, R2
H, OH; cyanidin
H, OCH₃; peonidin
OH, OH; delphinidin
OH, OCH₃; petunidin
OCH₃, OCH₃; malvidin

Slika 7. Prikaz nekih antocijanidina iz crnog vina

Ukupna količina fenola u crnom vinu ovisi o više različitih čimbenika i to: sorti grožđa, podrijetlu, tehnici proizvodnje, skladištenju, sazrijevanju vina i dr. Prosječna struktura fenolnih spojeva u crnom vinu je: procijanidini (1000 – 3000 mg/l), fenolne kiseline (oko 150 mg/l), monomeri katehina (oko 100 mg/l), flavonoli (oko 100 mg/l), antocijanini (oko 100 mg/l) i stilbeni (oko 10 mg/l) (48).

1.4. Mehanizmi ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja miokarda

Ishemija miokarda nastaje uslijed nerazmjera u dopremi i potrebi za kisikom. Takav disbalans može uzrokovati različita metabolička, funkcionalna, elektrofiziološka i morfološka oštećenja miokarda. Najčešće se javlja u koronarnoj bolesti, vodećem uzroku smrti u razvijenim zemljama. Stupanj oštećenja srca koji nastaje tijekom ishemijske oštećenja ovisi o opsegu i trajanju ishemijske te o metaboličkim potrebama srca prije, za vrijeme ishemijske te tijekom reperfuzije (49). Iako je rana uspostava perfuzije nakon ishemijske jedini način sprječavanja nekroze srčanog mišića, sama reperfuzija može uzrokovati oštećenja u dijelovima tkiva za koje bi se očekivao funkcijski oporavak (50). Ta oštećenja se najčešće očituju pojavom različitih aritmija i poremećajem kontraktilnosti srca (51-53). Brojni su mehanizmi odgovorni za nastanak ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja i uvelike se preklapaju (49). Ipak, prekomjerno unutarstanično nakupljanje Ca^{++} i stvaranje slobodnih kisikovih radikala tijekom reperfuzije smatraju se glavnim pokretačima reperfuzijskog oštećenja. Nekoliko je mogućih mehanizama odgovornih za prekomjerno unutarstanično nakupljanje Ca^{++} (54).

Ulazak Ca^{++} iz izvanstaničnog u unutarstanični prostor odvija se najvećim dijelom kroz L tip kalcijevih kanala, tzv. o naponu-ovisne spore kalcijevske kanale. Najveći ulazak Ca^{++} u stanicu kroz L tip Ca^{++} kanala događa se tijekom zaravnog akcijskog potencijala i služi kao okidač za daljnje otpuštanje Ca^{++} iz sarkoplazmatskog retikuluma (SR). Međutim, o naponu-ovisni Ca^{++} kanali inhibiraju se vrlo brzo tijekom ishemijske te je količina Ca^{++} koja ulazi u stanicu kroz ove kanale tijekom ishemijske vrlo mala.

Utvrđeno je da Na^+/Ca^{++} izmjenjivač ima značajnu ulogu u održavanju homeostaze Ca^{++} u stanici, odnosno pomaže ionskim crpkama u eliminaciji

Ca^{++} iz stanice (55). Međutim, postoje dokazi koji potvrđuju kako je $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ izmjenjivač izvor unutarstaničnog nakupljanja Ca^{++} u reperfuziji. Značajnije nakupljanje Na^+ u stanici započinje već tijekom ishemije zbog manjka energije i inhibicije Na^+/K^+ crpke (56, 57). Zbog anaerobnih uvjeta nastaje unutarstanična acidoza koja dovodi do povećane izmjene unutarstaničnog vodika (H^+) za Na^+ . Uspostavom reperfuzije izvanstanični se pH normalizira, a to uzrokuje snažan transmembranski gradijent za H^+ i njegov izlazak iz stanice. Tim se ostvaruju uvjeti za ulazak Na^+ u stanicu putem Na^+/H^+ izmjenjivača. Tako nakupljeni Na^+ se $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ izmjenjivačem izbacuje iz stanice u zamjenu za Ca^{++} što u konačnici rezultira prekomjernim nakupljanjem Ca^{++} u stanici. Kako reperfuzija odmiče, taj fenomen je manje izražen i dolazi do normalizacije koncentracije Na^+ , a s time i Ca^{++} u stanici. Prema tome, inhibicija $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ izmjenjivača smanjuje ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje srca (58). Također, inhibicija Na^+/H^+ izmjenjivača može smanjiti oštećenja miokarda tijekom ishemije i reperfuzije (59).

Nakupljanju Ca^{++} tijekom ishemije doprinose i unutarstanični izvori. Mogućnosti sarkoplazmatskog retikuluma i mitohondrija da akumuliraju i zadrže Ca^{++} u svom lumenu reduciraju se tijekom ishemije (60).

Povećana koncentracija Ca^{++} u stanici aktivira veliki broj različitih enzima koji dovode do oštećenja stanica. Ca^{++} ovisne proteaze i lipaze oštećuju proteinske i lipidne strukture stanične membrane i membrane sarkoplazmatskog retikuluma, mijenjaju konfiguraciju enzima ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu, što ima za posljedicu stvaranje slobodnih radikala i metabolita arahidonske kiseline koji dovode do oštećenja miofilamenta i time kontraktilne sposobnosti miocita (61, 62). Nakupljanje Ca^{++} u mitohodrijima uzrokuje njihovo

oštećenje te oni više nisu u stanju sintetizirati ATP oksidativnom fosforilacijom što dovodi do daljnjeg i nepovratnog gubitka energije, a u oštećenim mitohondrijima se lakše ostvaruje curenje elektrona i stvaranje slobodnih radikala.

Porast unutarstaničnog Ca^{++} i pad ATP-a tijekom ishemije uzrokuje kontrakturu miokarda koja nastaje zbog nerazdvajanja poprečnih mostova kontraktilnih vlakana. Tijekom reperfuzije dodatno se povećava utok Ca^{++} u stanicu i kontraktura miokarda se povećava što uzrokuje oštećenja svih staničnih struktura (63). Posljedica oštećenja stanične membrane i drugih membranskih struktura u stanici te hipoenergoza stanice uzrokuje daljnje povećanje koncentracije Ca^{++} u citosolu što uglavnom dovodi do smrti stanice.

Istraživanja su pokazala nastajanje slobodnih radikala tijekom reperfuzije miokarda. *In vitro* nastajanje slobodnih radikala može oštetiti srčane stanice i oponašati patološke promjene ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja (64). Slobodni radikali su molekule sa nesparenim elektronom u vanjskoj ljusci što je uzrok njihove visoke reaktivnosti i nestabilnosti. Nespareni elektron je onaj elektron koji sam zauzima atomsku ili molekulsku orbitalu. Slobodni radikali i reaktivni spojevi kisika nastaju pri nepotpunoj redukciji kisika, odnosno univalentnoj redukciji kisika. U tom procesu nastaju superoksidni anion ($\cdot\text{O}_2^-$), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$). Procjenjuje se kako do 3% kisika u respiracijskom lancu prelazi u slobodne kisikove radikale (65). Opisan je još jedan važan mehanizam stvaranja $\cdot\text{OH}$ u reakciji koja uključuje interakciju $\cdot\text{O}_2^-$ i NO-a pri čemu nastaje peroksinitritni anion ($\cdot\text{ONOO}^-$) (66).

Više je mehanizama koji dovode da nastanka slobodnih radikala u miokardu tijekom ishemije odnosno reperfuzije. Potencijalni izvor slobodnih

kisikovih radikala u ishemičnom i reperfundiranom srcu je enzim ksantin dehidrogenaza/oksidaza (67). Enzim je sintetiziran kao ksantin dehidrogenaza i predstavlja 90% enzima u zdravom tkivu (68). Ovaj oblik enzima upotrebljava nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) kao primatelj elektrona prilikom oksidacije ksantina. Ovaj enzim može postojati i u obliku oksidaze koja koristi molekularni kisik kao primatelja elektrona, prilikom čega nastaje superoksidni radikal. Pretvorba enzima iz jednog oblika u drugi nastaje kao posljedica tkivne ishemije, vjerojatno zbog manjka ATP-a i gubitka kontrole homeostaze Ca^{++} . Povećana koncentracija Ca^{++} u citosolu aktivira Ca^{++} ovisne proteaze koje pretvaraju dehidrogenazni oblik u oksidazu. Nemogućnost resintetiziranja ATP uslijed prekida oksidativne fosforilacije dovodi do degradacije nukleotida na AMP, a kasnije na adenzin, inozin, hipoksantin i ksantin koji predstavljaju supstrat za ksantin oksidazu i nakupljaju se u ishemijskom tkivu. Kada molekularni kisik postane dostupan u trenutku reperfuzije nastane ubrzana proizvodnja superoksidnog radikala (69).

Slobodni radikali koji nastaju tijekom ishemije i reperfuzije oštećuju ključne stanične strukture kao što su lipidi i proteini. Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima membrana stanica uzrokuje oštećenje funkcija staničnih organela i narušava propusnost stanične membrane (70, 71). Na^+/Ca^{++} izmjenjivač i Na^+/K^+ crpka su proteinske strukture na staničnoj membrani koje mogu biti oštećene utjecajem slobodnih radikala. Također, dokazana su oštećenja kontraktilnih proteina oksidacijom tiolnih skupina, a kod miofilamenata koji su izloženi superoksidnom anionu dolazi do smanjivanja maksimalne snage kontrakcije. Slobodni radikali također oštećuju i funkciju sarkoplazmatskog retikuluma (61, 72, 73). Hipoteza slobodnih radikala i Ca^{++}

hipoteza se moraju promatrati zajedno i predstavljaju dvije strane istog patofiziološkog procesa (74).

Zadnjih desetak godina objavljeno je nekoliko studija, na različitim eksperimentalnim modelima, u kojima je pokazano da apoptoza igra važnu ulogu u ishemijsko-reperfuzijskim oštećenjima miokarda. Hipoksični uvjeti, aktivacija receptorskog „smrtonosnog“ puta i oksidativni stres su glavni trigeri apoptoze tijekom ishemije i reperfuzije (75). Utvrđena je značajna uloga NO-a u regulaciji programirane stanične smrti. Međutim, učinci NO-a su proturječni i značajno ovise o staničnoj količini NO-a ali i o eksperimentalnom modelu, odnosno vrsti koja je korištena u istraživanju. Zanimljivo, ali i paradoksalno je da je tijekom reperfuzije apoptotska aktivnost intenzivnija nego tijekom ishemije. Razlog ubrzane apoptoze tijekom reperfuzije je povećana količina slobodnih radikala, ali i prisutnost kisika i energije koji su potrebni za odvijanje programirane stanične smrti (76).

1.5. Mehanizmi ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja u srcu zamorčića i štakora

Studije provedene na izoliranim srcima različitih eksperimentalnih vrsta uglavnom se poistovjećuju te se vrlo rijetko misli i raspravlja o potencijalnim razlikama među njima. U prethodnom poglavlju su opisani najznačajniji patofiziološki mehanizmi tijekom ishemijske i reperfuzijske te je posebno naglašen značaj Ca^{++} kao i mehanizmi kojima se kontrolira njegova razina u stanici. Odavno je poznato da postoje značajne fiziološke razlike između štakora i zamorčića, osobito su te razlike bitne glede mehanizama utoka, pohrane i eliminacije Ca^{++} iz stanica srčanog mišića (77-79) Tako je pokazano da je uloga Na^+/Ca^{++} izmjenjivača u eliminaciji kalcija iz kardiomiocita zamorčića značajno veća nego u štakora (77, 79). Utvrđeno je da tijekom zaravni akcijskog potencijala, kroz L tip Ca^{++} kanala u kardiomiocite zamorčića ulazi duplo veća količina Ca^{++} (80). Ca^{++} koji ulazi u stanicu putem L tipa Ca^{++} kanala okidač je za oslobađanje kalcija iz sarkoplazmatskog retikuluma (SR) čiji je doprinos ukupnoj količini kalcija u citosolu daleko veći nego onoga koji ulazi izvana. U SR kardiomiocita zamorčića deponirana je manja količina kalcija nego u štakora. Nadalje, u zamorčića je potrebna puno veća količina izvanstaničnog kalcija za oslobađanje kalcija deponiranog u SR nego što je to slučaj u kardiomiocitima štakora (77, 78). Sve su to važne stanične komponente o kojima ovisi stanična funkcija u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima kao što je ishemija i reperfuzija.

Kao bitan čimbenik u produkciji slobodnih kisikovih radikala opisali smo enzim ksantin oksidoreduktazu koja se tijekom nepovoljnih uvjeta ishemijske i reperfuzijske pretvara u ksantin oksidazu i tako doprinosi većoj produkciji slobodnih radikala (67). Utvrđeno je da se u srcu zamorčića nalazi manja

količina ksantin oksidoreduktaze nego u izoliranom srcu štakora (81, 82). Sukladno tome, u srcu zamorčića se tijekom ishemije i reperfuzije očekuje manja produkcija kisikovih radikala.

Za ovu studiju važno je spomenuti spoznaje o učincima NO-a na kardiomiocite zamorčića i štakora, odnosno učinke NO-a na programiranu staničnu smrt kardiomiocita. Pokazano je da NO potiče apoptozu kardiomiocita štakora, dok smanjuje i usporava programiranu staničnu smrt i propadanje kardiomiocita srca zamorčića (83, 84). Sve navedene razlike mogu značajno utjecati na ishemijsko-reperfuzijska oštećenja srca dobivenih od različitih eksperimentalnih vrsta.

Vrlo su rijetke i nedostatne studije koje opisuju učinke jedne tvari na srce dvije različite vrste, kako u bazalnim uvjetima, tako i u uvjetima ishemije i reperfuzije. Paskvalin je u svojoj studiji uspoređivao učinke endogenog inotropnog faktora na trabekule atrija srca zamorčića i štakora i utvrdio značajnu razliku u odgovoru na tu endogenu tvar. Pokazalo se da dolazi do puno veće kontrakcije trabekule atrija zamorčića u odnosu na trabekule štakora (85). U drugoj studiji koja je istraživala osjetljivost srca različitih vrsta u uvjetima izvantjelesne izolacije, pokazano je da je funkcionalna degradacija tijekom promatranog vremena bila puno veća u srcima zamorčića nego u srcu štakora. U uvjetima ishemije i reperfuzije rezultati su bili slični, odnosno štakorsko srce je bilo otpornije na ishemiju i reperfuziju od srca zamorčića (86). Usporedbom studija na pojedinim vrstama između različitih laboratorija i eksperimentalnih uvjeta ne otkrivaju postojanje značajnih razlika između srca zamorčića i štakora (87-90). Razlog tomu mogu biti: razlika u otopinama kojima se perfundiraju srca, kirurška tehnika, prehrana i uvjeti uzgoja pokusnih životinja i mnogi drugi.

Zbog ovako oprečnih rezultata, ali i fizioloških razlika među vrstama, potrebno je istražiti kako se srca od različitih eksperimentalnih vrsta ponašaju nakon izolacije i kako podnose ishemiju ako se pokusi rade u istim eksperimentalnim uvjetima. Također, zanimljivo je vidjeti kakve će učinke na srce imati primjena otopine bogate polifenolima u bazičnim i u uvjetima patofiziološkog opterećenja.

1.6. Protektivni učinci komponenti crnog vina na oštećenja izoliranog srca nastala ishemijom i reperfuzijom

Rijetke su *in vitro* studije koje su istraživale učinke sastojaka crnog vina na oštećenja izoliranog srca nastala ishemijom i reperfuzijom. U postojećim studijama uglavnom su korišteni pojedini izolirani polifenoli, njihovi oligomeri ili frakcije crnog vina. Pored toga, sve studije su provedene na izoliranim srcima štakora.

Nekoliko autora je dokazalo protektivne učinke katehina i resveratrola na ishemijsko-reperfuzijska oštećenja miokarda (90-92). Polifenoli, kao što su katehin i resveratrol, djeluju kao „hvatači“ slobodnih radikala i kelatori metalnih iona što u uvjetima ishemije i reperfuzije može značajno smanjiti oksidacijski stres i posljedična oštećenja miokarda (93-96). Osim izravnih učinaka, vinski polifenoli mogu neizravno smanjiti oksidativni stres aktivirajući enzime kao što su SOD, katalaza i glutacion peroksidaza, ali i inhibirajući ksantin oksidazu (95, 97, 98). Oligomeri polifenola kao što su proantocijanidini, ovisno o koncentraciji, smanjuju učestalost aritmija tijekom reperfuzije, smanjuju oštećenja koronarne cirkulacije i kontraktilne funkcije izoliranog srca štakora (99). Kardioprotektivnim učincima proantocijanidina doprinosi njihova antioksidacijska aktivnost kao i sposobnost da regeneriraju ostale antioksidanse. Na izoliranom srcu štakora utvrđeni su protektivni učinci dealkoholiziranih frakcija crnog vina. Najznačajniji učinak su pokazale frakcije bogate proantocijanidinima. Frakcija bogata proantocijanidinima je jedina pokazala jednake učinke kao što je imao ekstrakt crnog vina, za razliku od ostalih polifenolnih frakcija (100). Proantocijanidini svoje kardioprotektivne učinke ostvaruju uglavnom na razini mitohondrija odnosno na razini mitohondrijskog respiracijskog lanca. Sato je u svojim

istraživanjima na izoliranom srcu štakora dokazao da *trans*-resveratrol i dealkoholizirani ekstrakt vina pokazuju protektivne učinke u uvjetima ishemije i reperfuzije, osobito na kontraktilnu i vaskularnu funkciju uz značajno smanjenje veličine infarkta. Da bi razlučili protektivni učinak vinskih polifenola i etanola, u istoj studiji je istraživana i učinak samog etanola iz vina koji nije pokazao protektivne učinke (101, 102).

U navedenim istraživanjima nije korišteno intaktno crno vino, a postupci ekstrakcije ili frakcioniranja pojedinih komponenti crnog vina značajno mijenjaju njihova fizikalno-kemijska svojstva, a time i biološku aktivnost. Tijekom pripreme ekstrakta vino se zagrijava na određenu temperaturu prilikom čega se uklanja alkohol, ali i ostali lako hlapljivi sastojci vina, što samo po sebi može utjecati na interakciju polifenola sa drugim molekulama kao što su proteini i time mijenjati njihovu biološku aktivnost (103). Osim toga, polifenolni sastojci su također podložni termalnoj degradaciji s posljedičnim dinamičkim promjenama u njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti (104). Vinski polifenoli uglavnom se unose u organizam pijenjem intaktnog crnog vina, a vrlo rijetko kao izolirani pripravci polifenola. Stoga je dodatna snaga ove studije korištenje crnog vina koje nije ni na bilo koji način modificirano te da su korištene koncentracije vina koje odgovaraju preporučenim za svakodnevno konzumiranje. U većini prethodno opisanih istraživanja, korištene su velike i neprirodne koncentracije pojedinih polifenola koje se ne mogu naći u maloj količini vina prilikom normalnog konzumiranja. Također, učinak pojedinog polifenola ne može se promatrati u istom smislu kada je izoliran kao jedna zasebna komponenta i kada je sastavni dio kompleksne otopine kao što je crno vino. Također, teško je na osnovu istraživanja koja su provedena samo na jednoj eksperimentalnoj vrsti donositi

relevantne zaključke o učincima neke tvari budući da među vrstama mogu postojati značajne razlike. Stoga je važan doprinos ovog istraživanja i u tome što će se uz štakorsko srce koristiti i model izoliranog srca zamorčića koji do sada nije bio istraživani.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Izolirani aortni prstenovi štakora i zamorčica

1. Utvrditi mehanizme izravnog vazodilatacijskog učinka crnog vina na izolirane aortne prstenove zamorčica.
2. Usporediti mehanizme izravnog vazodilatacijskog učinka crnog vina na izolirane aortne prstenove zamorčica i štakora.

2.2. Izolirano srce štakora i zamorčica

1. Istražiti učinke različitih koncentracija vina na parametre srčane funkcije (kontraktilnu, vaskularnu i elektrofiziološku funkciju) izoliranog srca štakora i zamorčica te utvrditi razlike među vrstama.
2. Utvrditi i usporediti učinke ishemije i reperfuzije na parametre srčane funkcije izoliranog srca zamorčica i štakora.
3. Utvrditi i usporediti protektivne učinke intaktnog crnog vina na ishemijom-reperfuzijom uzrokovana oštećenja izoliranog srca zamorčica i štakora.

2.3. Biokemijska analiza vina

1. Izvršiti biokemijsku karakterizaciju crnog vina korištenog u studiji, s ciljem standardiziranja eksperimentalnih uvjeta i usporedivosti s drugim sličnim studijama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Crno vino i kemijske supstance

U ovoj studiji korišteno je crno vino „Vinagra“, berba 2005. godine, proizvedeno u vinariji „Brič“, Republika Slovenija. Odabrano je kao vino iz ekološkog vinograda u kojem se vinova loza uzgaja sukladno europskim normama o ekološkoj proizvodnji vina.

Za provođenje istraživanja na izoliranom srcu i aortnim prstenovima korištene su sljedeće supstance: NaCl, NaHCO₃, Na piruvat, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄, CaCl₂, glukoza, manitol (Kemika, Zagreb, Hrvatska), inzulin, heparin (Hospitalia, Zagreb, Hrvatska), noradrenalin (NA), acetilkolin (Ach), L-nitro arginin metil ester (L-NAME), indometacin, klotrimazol, natrijev nitroprusid (NNP), tetraetilamonij (TEA), 16-oktadecinoična kiselina (ODYA), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države). Sve kemikalije korištene u biokemijskoj analizi vina, osim Folin-Ciocalteu reagensa (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švicarska), bile su od istog proizvođača (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države).

Sve otopine korištenih tvari svakodnevno su pripremane neposredno prije izvođenja pokusa. Većina farmakoloških agensa je otopljena u Krebs-Henseleitovoj otopini. Indometacin, klotrimazol i ODYA su otapani u DMSO-u, tako da maksimalna koncentracija otapala u organskom bazenčiću ne prelazi koncentraciju od 1 ‰ koja se smatra biološki neaktivnom.

3.2. Pokusne životinje

Za izradu ove studije koristili su se štakori, mužjaci soja Wistar i zamorčići iz Sveučilišne nastambe za pokusne životinje u Splitu.

3.3. Biokemijska analiza crnog vina

3.3.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta crnog vina

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta crnog vina koristila se FRAP (*eng.* ferric reducing antioxidant power) metoda (105). Metoda se temelji na određivanju sposobnosti ispitivanog uzorka za redukciju Fe^{3+} u Fe^{2+} . Novonastali Fe^{2+} spaja se sa 2,4,6-Tri (2-piridil)-s-triazinom (TPTZ). Nastali Fe^{2+} -TPTZ kompleks apsorbira svjetlost pri 593 nm.

Postupak mjerenja: u kivetu spektrofotometra dodano je 2250 μl FRAP reagensa (mješavina sljedećih otopina: 1. 300 mmol/l octenog pufera pH 3,6, 2. 10 mmol/l TPTZ otopljenog u 40 mmol/l HCl, 3. 20 mmol/l $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; u omjeru 10:1:1) i izmjerena je apsorbancija pri 593 nm. Nakon toga je u kivetu dodano 75 μl ispitivanog vina (razrijeđenog u omjeru 1:10 sa H_2O) i 225 μl H_2O . Nakon 4 minute latencije, opet je izmjerena apsorbancija pri 593 nm. Dobivene vrijednosti (razlike između apsorbancija u 4. i 0. minuti) su se izražavale u ekvivalentima troloksa (sintetskog i vodotopljivog analoga vitamina E). Kalibracijski pravac troloksa (koncentracija prema apsorbanciji) svakodnevno se izrađivao primjenom troloksa (koncentracije 0, 250, 500, 1000 i 2000 $\mu\text{mol/l}$).

3.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu koristila se metoda po Folin-Ciocalteu (106). Metoda se temelji na oksidaciji fenolnih skupina dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta. Fenolne skupine se oksidiraju do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i

volframfosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje. Intenzitet obojenja mjeri se određivanjem apsorbancije pri 765 nm.

Postupak mjerenja: u odmjernu tikvicu od 50 ml dodano je 0,5 ml ispitivanog vina, 30 ml H₂O i 2,5 ml Folin – Ciocalteu reagensa. Nakon 1 minute, u otopinu je dodano 7,5 ml 20% (w/v) otopine natrij karbonata (Na₂CO₃) te je dopunjeno destiliranom vodom do oznake od 50 ml. Nakon inkubacije od 2 sata, na sobnoj temperaturi očita se apsorbancija pri 765 nm. Dobivene vrijednosti su se izražavale u ekvivalentima galne kiseline. Kalibracijski pravac galne kiseline (koncentracija prema apsorbanciji) svakodnevno se izrađivao primjenom galne kiseline (koncentracije 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/l).

3.3.3. Određivanje koncentracije katehina u crnom vinu

Za određivanje koncentracije katehina u crnom vinu koristili smo metodu sa vanilinom. Vanilinski test je specifičan za flavan-3-ole i proantocijanine koji imaju jednu vezu na 2,3 poziciji i posjeduju slobodnu metahidroksi grupu na B prstenu. Katehin, kao glavni reaktant u vinu ulazi u kemijsku reakciju s vanilinom što rezultira obojenjem otopine koje se može kvantificirati. Kao standard je korišten monomerni flavan-3-ol, katehin (107, 108).

Postupak mjerenja: u odmjernu tikvicu od 25 ml uzme se 10 ml uzorka (crno vino razrijeđeno u omjeru 1:10), 10 ml apsolutnog HCl-a i 5 ml vanilina te se ostavi stajati 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga u prve tri spektrofotometrijske kivete ulijemo 2 ml gore pripremljenog alikvot uzorka, dok u preostale dvije kivete ulijemo 2 ml razrijeđenog crnog vina (1/10) te očitamo apsorbanciju na 500 nm. Dobivene vrijednosti (razlike između apsorbancije alikvot uzorka i uzorka razrijeđenog crnog vina) su se izražavale u ekvivalentima katehina. Kalibracijski pravac katehina (koncentracija prema

apsorbanciji) svakodnevno se određivao primjenom katehina (koncentracije 0, 10, 30, 50, 100 µg/ml).

3.3.4. Određivanje koncentracije flavonoida i neflavonoida u crnom vinu

Za određivanje koncentracije flavonoida i neflavonoida koristili smo metodu taloženja s formaldehidom (109, 110). Formaldehid reagira s C-6 ili C-8 pozicijom na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima također na C-6 ili C-8 poziciji. Pri tome nastaju kondenzirane molekule koje se uklone filtriranjem. Ostatak neflavonoidnih fenola određuje se po Folin-Ciocalteu metodi za ukupne fenole. Razlika ukupnih fenola i neflavonoida daje količinu flavonoida.

Flavonoidi (mg GAE/l) = Ukupni fenoli (mg GAE/l) – Neflavonoidi (mg GAE/l)

Postupak mjerenja: u tikvicu od 50 ml doda se 5 ml vina, 5 ml 1:4 klorovodične kiseline (HCl) i 2,5 ml otopine formaldehida. Otopinu ostaviti stajati 24 sata na sobnoj temperaturi nakon čega se filtrira. Kondenzirane molekule se uklone filtracijom, a preostale fenolne spojeve (neflavonoide) u otopini određujemo pomoću gore navedene metode po Folin-Ciocalteu.

3.3.5 Određivanje koncentracije antocijana u crnom vinu

Za određivanje koncentracije antocijana u crnom vinu koristili smo metodu izbjeljivanja s bisulfitom (111). Metoda određivanja antocijana temelji se na principu da se HSO₃⁻ ion veže na antocijane na položaju 2' te tako prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik.

Postupak mjerenja: u veću epruvetu se ulije 1 ml vina nakon čega se u istu epruvetu dodaje 1 ml 96%-tnog etilnog alkohola u 0,1%-tnoj HCl i 20 ml 2%-tne HCl. Sve se dobro promiješa i sadržaj se podijeli u 2 epruvete. U prvu

epruvetu se stavi 10 ml reakcijske smjese i doda 4 ml 15 %-tne otopine natrijevog bisulfita (A_1). U drugu epruvetu se stavi 10 ml reakcijske smjese i doda 4 ml H_2O (A_2). Nakon 20 minuta mjeri se apsorbancija na 520 nm valne duljine. Količina antocijana se izračunava prema standardu malvidin-3-glukozidu (mg/l) i to prema sljedećoj formuli:

$$c \text{ (mg/l)} = (A_2 - A_1) \times 582$$

Sva biokemijska mjerenja su učinjena na UV-VIS spektrofotometru («Specord 200», Analytik Jena GmbH, Jena, Njemačka), opremljenim s držačem za 6 kiveta i termostatiranom pumpom. Sva mjerenja su rađena u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

3.4. Mjerenja vazodilatacije na izoliranim aortalnim prstenovima

Kao izvor izoliranih vaskularnih prstenova korištena je torakalna aorta štakora, mužjaka soja Wistar i zamorčića 3-4 mjeseca starosti, mase 300 ± 20 grama. Nakon anestezije životinje (i.p. 1 g/kg t.t. uretana), učini se torakotomija, preparira torakalna aorta, disecira te prenese u preparativni bazenčić sa hladnom i oksigeniranom Krebs–Henseleitovom otopinom. Sastav otopine u mmol/l: 120 NaCl; 4,8 KCl; 1,2 KH_2PO_4 ; 2,5 CaCl_2 ; 1,2 MgSO_4 ; 25,5 NaHCO_3 ; 10 glukoze i 0,02 EDTA (112). Nakon pažljivog čišćenja masnog i vezivnog tkiva, aorta se reže na prstenove širine 3-4 mm. Prstenove se zatim namiješta u organske bazenčiće (20 ml zapremine) sa Krebs – Henseleitovom otopinom koja se kontinuirano zagrijava i oksigenira ($t=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,4$). Dvije paralelne čelične žice provuku se kroz lumen prstena, od kojih se jedna fiksira za dno organskog bazenčića, a druga koncem poveže na pretvarač vlačne sile, radi mjerenja tonusa žilnog prstena. Pretvarač sile se spaja na pojačalo i na analogno/digitalni pretvarač, što omogućuje kontinuirani grafički prikaz tijekom pokusa na ekranu računala.

Nakon ispiranja i perioda stabilizacije u Krebs-Henseleitovoj tekućini prstenovi se tri puta izlažu KCl-u u koncentraciji od 60 mM. Nakon toga prstenovi se prekontrahiraju s kontrolnom dozom NA (aortalni prstenovi štakora 10^{-7} mol/l, aortalni prstenovi zamorčića 10^{-6} mol/l) ili sa 30 mM otopinom kalij klorida. Kada se postigne stabilni plato kontrakcije, očuvanost endotela se testira s Ach (aortalni prstenovi štakora 10^{-6} mol/l, aortalni prstenovi zamorčića 10^{-5} mol/l). Relaksacija se izražava kao postotak smanjenja vazokonstrukcije uzrokovane noradrenalinom, odnosno KCl-om. Dijelu prstenova se nježnim rotiranjem preko zakrivljenih operativnih škara mehanički odstranio endotel.

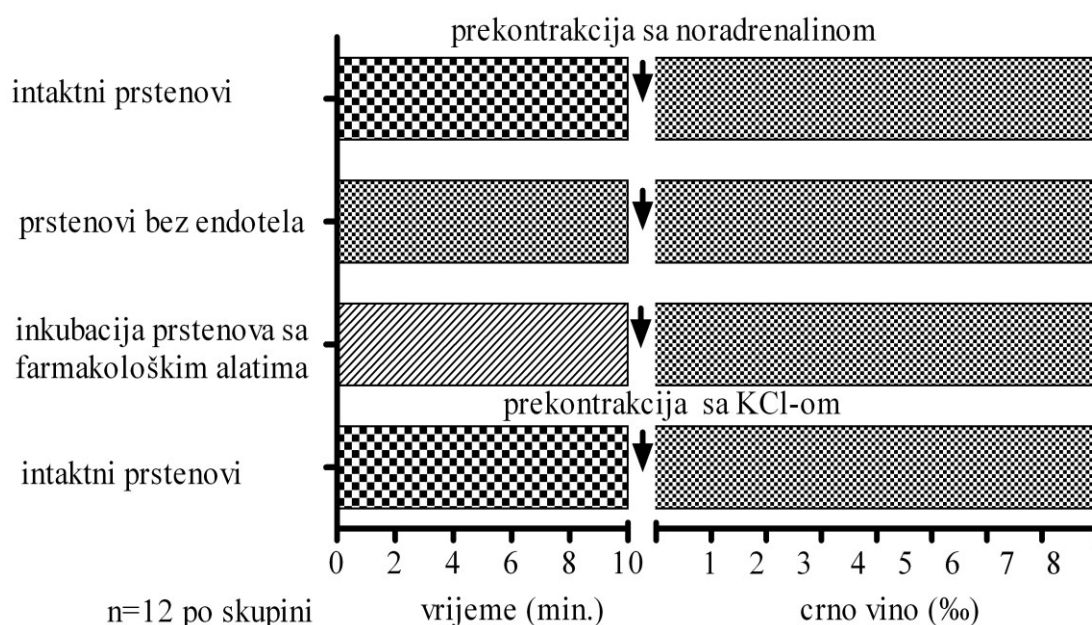


Slika 8. Shema sustava za izolirane aortne prstenove

Nakon stabilizacije prstenova i kontrole endotela, prstenovi prekontrahirani s NA ili KCl-om podvrgnuti su jednom od sljedećih protokola:

- I. Za određivanje osjetljivosti glatkih mišića krvnih žila štakora i zamorčića na NO, ogoljeni prstenovi su bili izloženi kumulativnoj dozi (10^{-10} do 10^{-4} M) NNP.
- II. Za određivanje uloge endotela u crnim vinom uzrokovanoj vazodilataciji, intaktni i ogoljeni prstenovi su bili izloženi kumulativnoj dozi (1 do 8‰) crnog vina.

- III. Za određivanje mehanizama vazodilatacije, prije izlaganja kumulativnoj dozi (1 do 8‰) crnog vina, intaktni prstenovi su 10 minuta inkubirani s: inhibitorom NO-sintetaze, L-NAME-om (300 μmol/l), inhibitorom ciklooksigenaze - indometacinom (10 μmol/l), inhibitorom citokroma P450 - klotrimazolom (10 μmol/l), primijenjeni pojedinačno ili u kombinaciji.
- IV. Za određivanje uloge produkata citokroma P450 i K⁺ kanala u crnim vinom uzrokovanoj vazodilataciji, prije izlaganja kumulativnoj dozi (1 do 8‰) crnog vina, intaktni prstenovi su 10 minuta inkubirani sa 16-oktadecinoičnom kiselinom (ODYA) i tetraetilamonijem (TEA).
- V. Za određivanje hiperpolarizirajuće komponente u endotel-ovisnoj vazodilataciji crnim vinom, dio aortnih prstenova bio je prekontrahiran sa 30 mM KCl-om i izložen kumulativnoj dozi (1 do 8‰) crnog vina.



Slika 9. Shema protokola pokusa na izoliranim aortnim prstenovima.

3.5. Mjerenja na modelu izoliranog srca

Koristili smo zamorčiče i štakore, mužjake soja Wistar, 3-4 mjeseca starosti, mase 300 ± 20 grama. Nakon anestezije intraperitonealnom aplikacijom 1 g/kg t.t. uretana i 1000 i.j. heparina izvodila se torakotomija, a potom ekstirpacija i retrogradna perfuzija srca. Sva srca su perfundirana filtriranom modificiranom Krebs-Henseleitovom otopinom na konstantnom perfuzijskom tlaku od 50 mmHg, mjereno na razini aortne kanule. Sastav perfuzata u mmol/l: NaCl 118, NaHCO₃ 25, Na piruvat 2, KH₂PO₄ 1.2, KCl 4.6, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.5, glukoza 11 (89). Temperatura otopine je 37°C, a pH od 7,35 do 7,45. Koronarni protok smo mjerili ultrazvučnim mjerачem smještenim u liniji koronarnog utoka. Tlak u lijevoj klijetki mjerio se izovolumetrijskim pretvaračem spojenim na lateks balon ispunjen tekućinom, koji se kroz otvor na lijevom atriju te kroz mitralnu valvulu uvukao u lijevu klijetku i fiksirao. Atrijski i ventrikulski elektrogram pratili su se preko dva para bipolarnih srebrnih elektroda, koji su subepikardno postavljeni na desnu pretklijetku i desnu klijetku. Iz elektrograma se određivala srčana frekvencija, ritam i atrijsko-ventrikulsko (AV) vrijeme provođenja. Perfuzijski tlak otopine se, radi provjere, kontinuirano mjerio mjerачem u razini srca.

Tlak otopljenog O₂ i pH perfuzijske otopine mjerio se u određenim vremenskim točkama pomoću mjerачa plinova i elektrolita u otopini („acidobazni uređaj“) (Rapidlab 348 pH/Blood Gas Analyzer, Bayer Corporation, East Walpole, MA, Sjedinjene Američke Države). Uzorak perfuzata se uzimao prilikom utoka u srce („arterijski“ perfuzat) i odljeva iz srca („venski“ perfuzat), temeljem čega se određivala količina dopremljenog i utrošenog kisika u srcu. Prikupljanje perfuzata iz koronarnog sinusa, tj. odljeva, vršilo se cjevčicom

uvedenom u desnu klijetku kroz ušće plućne arterije, uz prethodno podvezanu gornju i donju šuplju venu.

Osim izravno mjerenih parametara srčane funkcije, neizravno smo izračunavali sljedeće parametre:

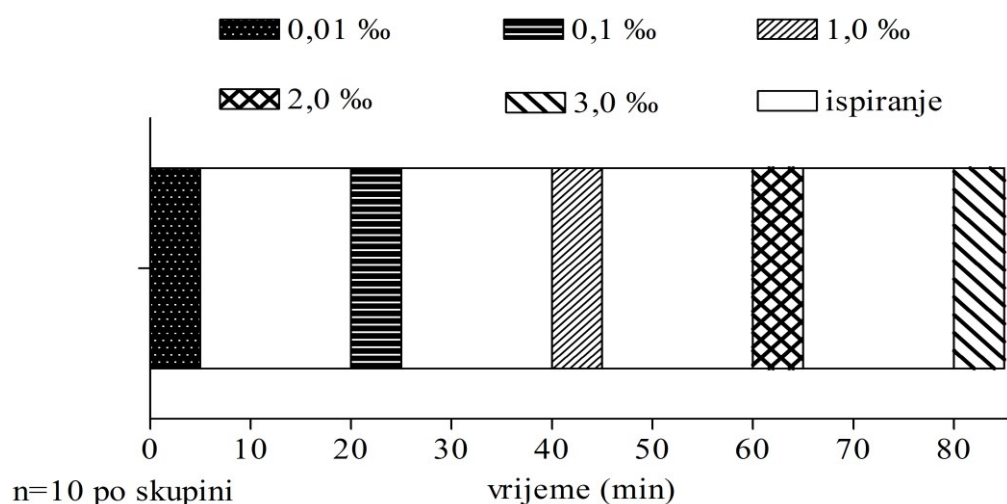
Količina dopremljenog kisika (DO₂) = arterijski pO₂ x topljivost O₂ x koronarni protok

Potrošnja kisika (MVO₂) = topljivost O₂ x koronarni protok x (arterijski pO₂ - venski pO₂)

Omjer između dopreme i potrošnje kisika = DO₂/MVO₂

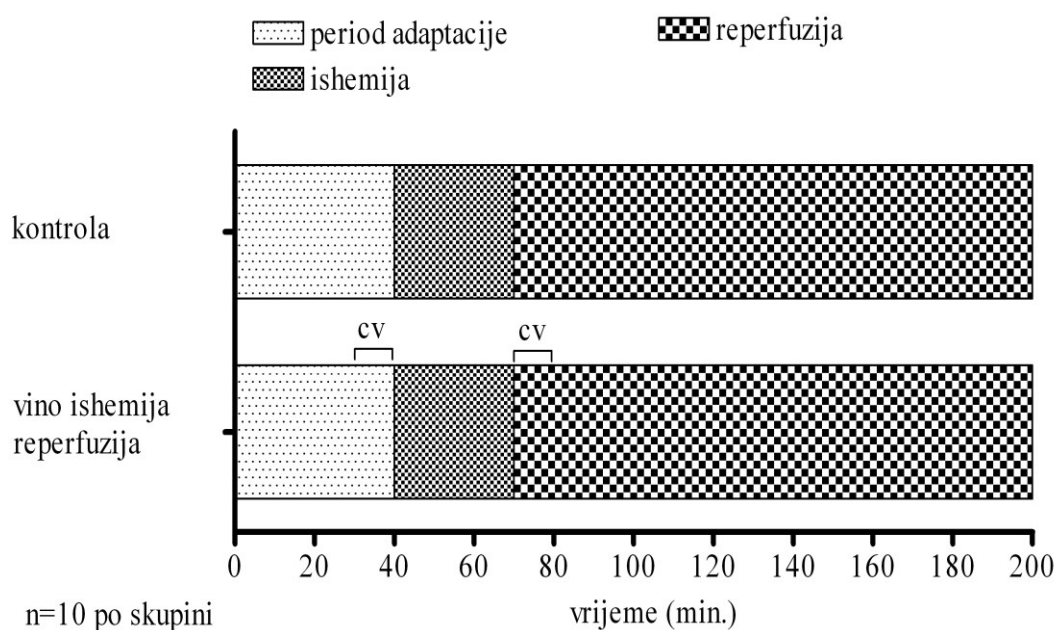
Relativna srčana učinkovitost = frekvencija srca x pulsni tlak / MVO₂

Istraživanje na izoliranom srcu podijeljeno je u dva dijela. U prvom dijelu smo istražili učinke crnog vina na parametre srčane funkcije izoliranog srca štakora i zamorčića u bazalnim uvjetima. Vino je primjenjivano u dozi od 0,01 do 3 ‰ tijekom 5 minuta, uz vrijeme „ispiranja“ od 15 minuta prije sljedeće doze vina.

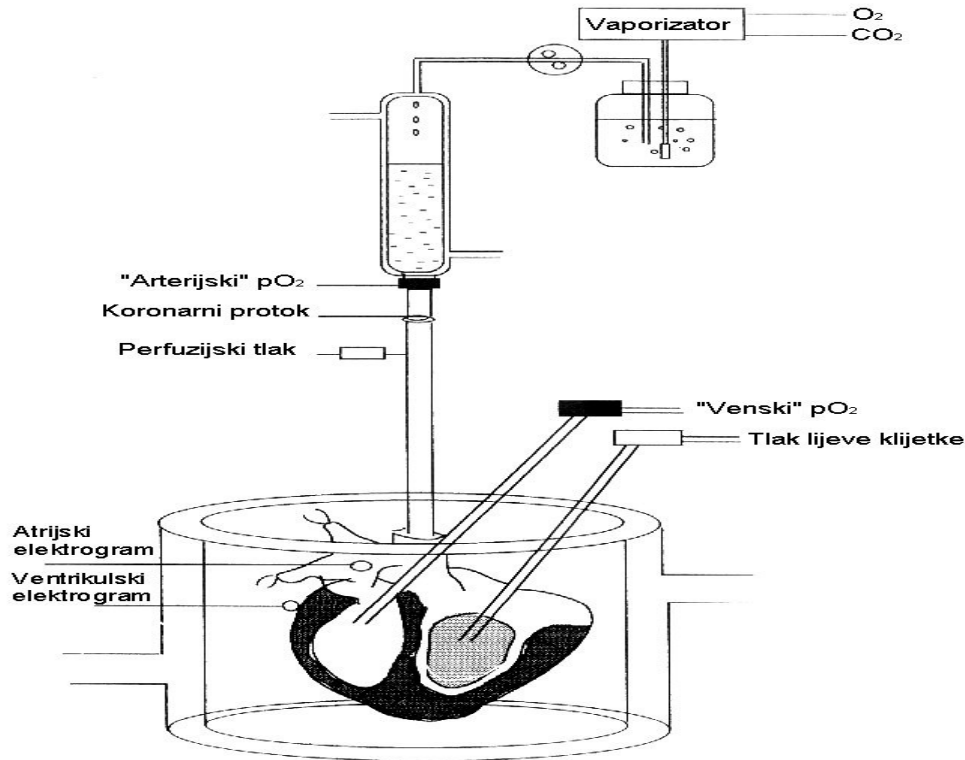


Slika 10. Shema protokola pokusa o izravnim, o dozama ovisnim učincima vina na parametre srčane funkcije u bazalnim uvjetima.

U drugom dijelu studije na izoliranom srcu, istražili smo moguće zaštitne učinke crnog vina protiv ishemijsko-reperfuzijskih oštećenja. Studija je izvedena na 40 srca podijeljenih u 4 skupine (n=10 po skupini). Prve dvije skupine činilo je po 10 srca zamorčića i štakora koja su nakon perioda stabilizacije bila podvrgnuta 30 minutnoj ishemiji nakon čega je slijedila reperfuzija. Treću i četvrtu skupinu također je činilo po 10 srca štakora i zamorčića, koja su za razliku od prve dvije skupine bila izložena tijekom 10 minuta, prije i poslije ishemije, crnom vinu u koncentraciji od 1 ‰. Koncentracija vina od 1‰ je odabrana jer se pokusima u bazalnim uvjetima pokazala kao najmanja koncentracija vina koja radi maksimalni učinak. Srca iz sve 4 skupine su praćena kroz period reperfuzije u trajanju od 120 minuta.



Slika 11. Shema protokola pokusa na izoliranom srcu, učinci ishemije i reperfuzije na parametre srćane funkcije i zaštitni učinci crnog vina (CV).



Slika 12. Langendorffov model izoliranog, retrogradno perfundiranog srca.

3.6. Statističke metode

Podaci su analizirani statističkim programima GraphPad InStat i GraphPad Prism, verzija 4.00 za Windows, GrafPad Software (San Diego, CA, Sjedinjene Američke Države, www.graphpad.-com). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Od statističkih testova koristila se jednosmjerna ANOVA za ponavljana mjerenja (statističke razlike unutar skupine) i dvosmjerna ANOVA za ponavljana mjerenja (statističke razlike između skupina). Kao dodatni test koristili smo Bonferoni test. Za statističku procjenu trajanja aritmija koristio se neparni t test. Razlike srednjih vrijednosti se smatraju statistički značajnim za vjerojatnost $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Biokemijska analiza vina

Vrijednosti ukupne količine polifenola, flavonoida, neflavonoida, katehina, antocijana i antioksidacijskog kapaciteta crnog vina korištenog u ovome istraživanju prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, neflavonoida, katehina, antocijana i antioksidacijski kapacitet crnog vina korištenog u istraživanju.

| | |
|--|--------------|
| Antioksidacijski kapacitet crnog vina (FRAP) (mmol/TE) | 13,51 ± 0,63 |
| Ukupna količina polifenola (mgGAE/l) | 3537,50 ± 45 |
| Flavonoidi (mg/l) | 3131,00 ± 38 |
| Neflavonoidi (mg/l) | 406,51 ± 12 |
| Katehini (mg/l) | 1133,84 ± 28 |
| Antocijani (mg/l) | 715,41 ± 16 |

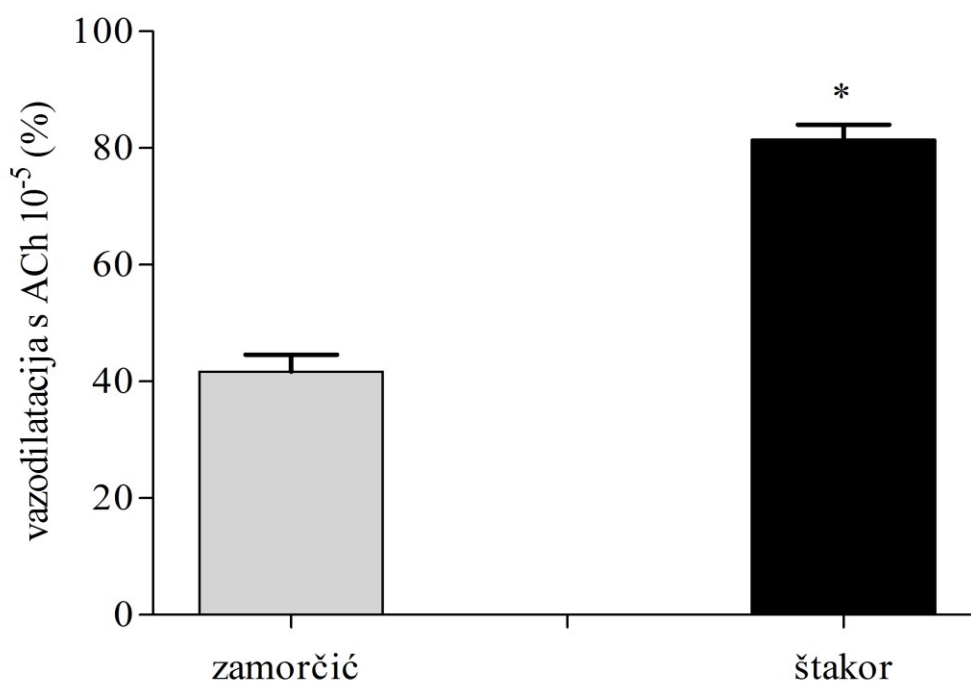
ET - ekvivalent troloksa

EGK - ekvivalent galne kiseline

FRAP *eng.* - ferric reducing antioxidant power

4.2. Izolirani aortni prstenovi štakora i zamorčiča

Bazalna napetost izoliranih aortnih prstenova zamorčiča i štakora nakon izlaganja NA nije se značajno razlikovala i iznosila je $19,18 \pm 3,22$ mN u zamorčiča, odnosno $21,61 \pm 1,47$ mN u štakora. Kontrolna vazodilatacija aortnih prstenova s Ach (10^{-5} M) značajno se razlikovala između aortnih prstenova zamorčiča i štakora. Maksimalna relaksacija (E_{max}) u aorti zamorčiča iznosila je $42,68 \pm 1,22\%$, a u aorti štakora $84,34 \pm 1,46\%$ (Slika 13.).

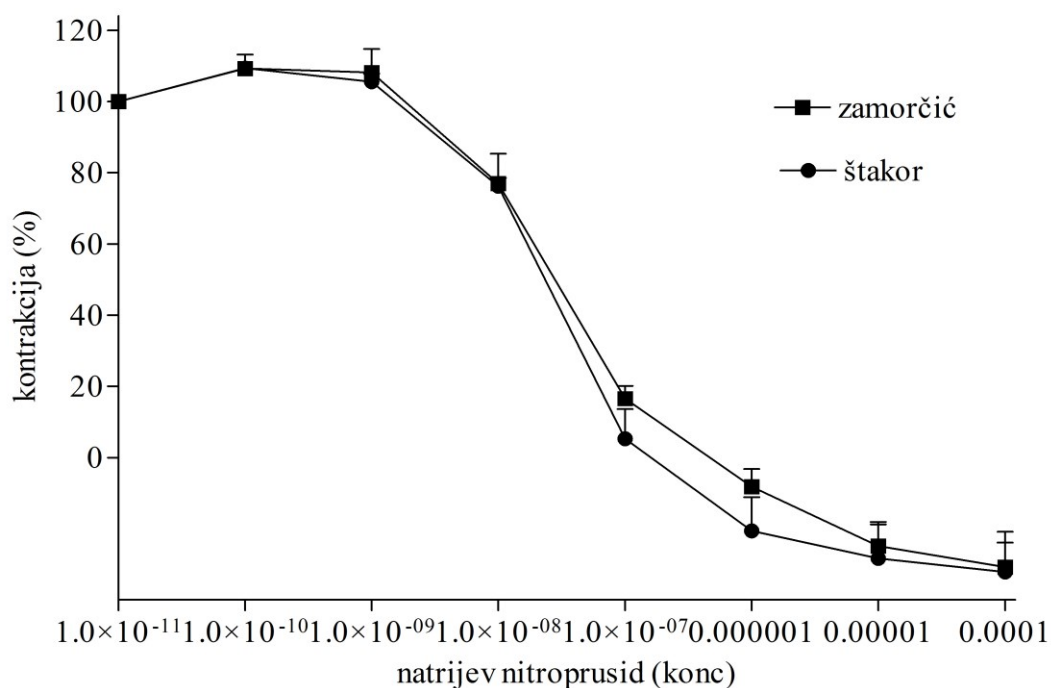


Slika 13. Razlike u vazodilatacijskom odgovoru na acetilkolin (Ach) (10^{-5} M) između intaktnih aortnih prstenovima štakora i zamorčiča, prethodno kontrahiranih noradrenalinom (NA).

n=12 prstenova po skupini

* $p < 0,05$ u odnosu na aortu zamorčiča

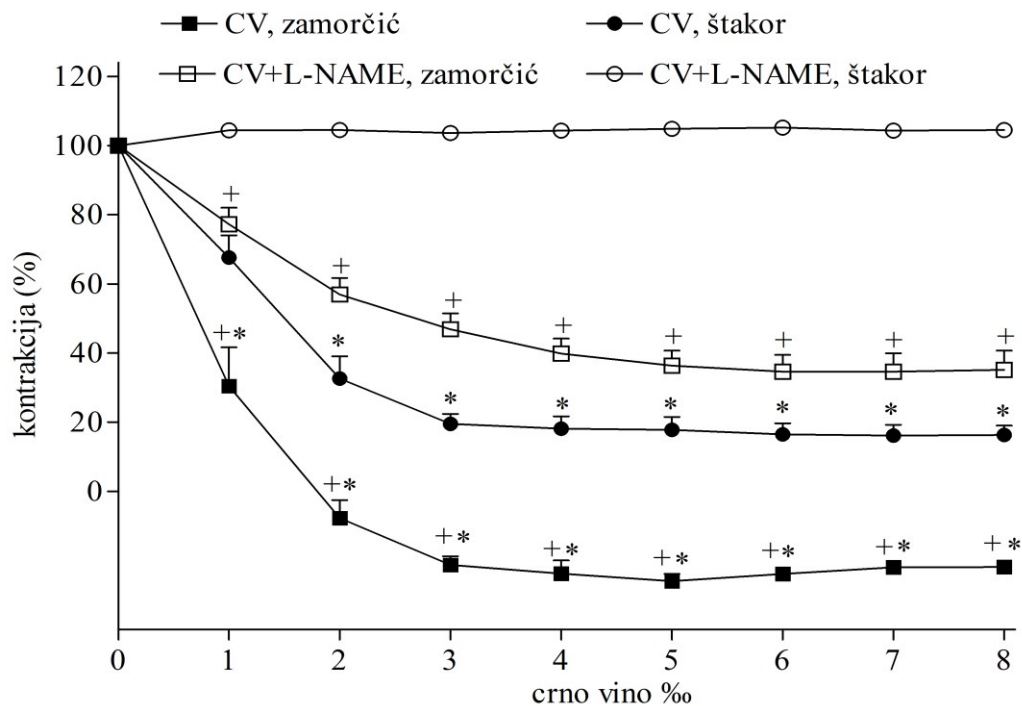
Nasuprot intaktnim prstenovima, razlika u osjetljivosti glatkih mišića aorte na NNP između zamorčića i štakora nije postojala. Kumulativne doze NNP (10^{-10} do 10^{-4} M) uzrokovale su gotovo identičnu vazodilataciju ogoljenih aortnih prstenova štakora i zamorčića. Koncentracija NNP potrebna za maksimalni vazodilatacijski učinak (E_{max}) odnosno 50% tog učinka, efektivna (djelotvorna) koncentracija (EC_{50}), u aortnim prstenovima zamorčića iznosile su $117,38 \pm 1,25\%$, odnosno $723,93 \pm 7,38$ nM. E_{max} i EC_{50} aortnih prstenova štakora iznosila je $115,17 \pm 3,16\%$, odnosno $754,06 \pm 5,74$ nM (Slika 14.).



Slika 14. Vazodilatacijski učinci kumulativnih doza natrijeva nitroprusida u aortnim prstenovima zamorčića i štakora kojima je odstranjen endotel. Vazodilatacijski učinak izražen je kao postotak smanjenja kontrakcije izazvane primjenom noradrenalina.

n = 12 prstenova po skupini

Primjena samog etanola u koncentracijama koje se postižu u organskim bazenčićima nakon primjene vina (0,14 - 1,12‰) nije uzrokovala mjerljivi vazodilatacijski odgovor u aornim prstenova zamorčića i štakora (rezultati nisu prikazani). Međutim, crno vino uzrokuje snažnu o dozi ovisnu vazodilataciju aornih prstenova zamorčića koja je značajno veća od vazodilatacije acetilkolinom (10^{-5} M). Nadalje, vazodilatacijski odgovor aornih prstenova zamorčića na vino je značajno veći nego onaj u aornim prstenovima štakora. E_{max} aornih prstenova zamorčića iznosio je $126,01 \pm 2,11\%$, a u štakora $83,89 \pm 3,11\%$. Inkubacija prstenova sa L-NAME-om, inhibitorom NO-sintetaze, u potpunosti je inhibirala učinak vina u aornim prstenovima štakora dok je vazodilatacija aornih prstenova zamorčića reducirana za oko 50% (Slika 15.).



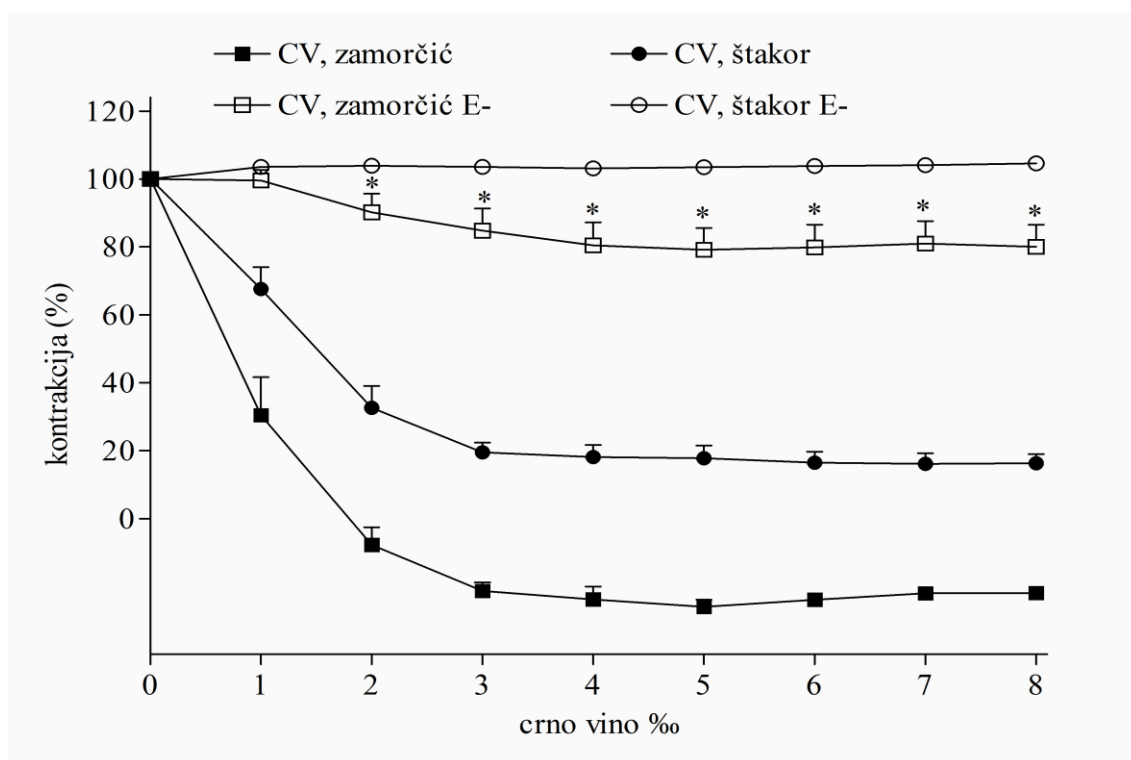
Slika 15. Vazodilatacijski učinci crnog vina (CV) u aornim prstenovima zamorčića i štakora. Inkubacija prstenova štakora sa 300 $\mu\text{mol/l}$ L-nitro arginine metil esterom (L-NAME) u potpunosti je inhibirala vazodilatacijski učinak crnog vina dok je u aornim prstenovima zamorčića vazodilatacijski odgovor umanjen za približno 50%. Vazodilatacijski učinak izražen je kao postotak smanjenja kontrakcije izazvane primjenom noradrenalina.

n=12 prstenova po skupini

* $p < 0,05$ u odnosu na prstenove inkubirane sa L-NAME-om

+ $p < 0,05$ u odnosu na aortne prstenove štakora

Odstranjivanje endotela s aornih prstenova štakora u potpunosti je blokiralo vazodilatacijski učinak crnog vina, za razliku od aornih prstenova zamorčića u kojima je vazodilatacijski odgovor na vino dijelom očuvan nakon odstranjenja endotela (Slika 16.).



Slika 16. Vazodilatacijski učinci crnog vina (CV) u intaktnim i ogoljenim (E-) prstenovima zamorčića i štakora. Vazodilatacijski učinak izražen je kao postotak smanjenja kontrakcije izazvane primjenom noradrenalina.

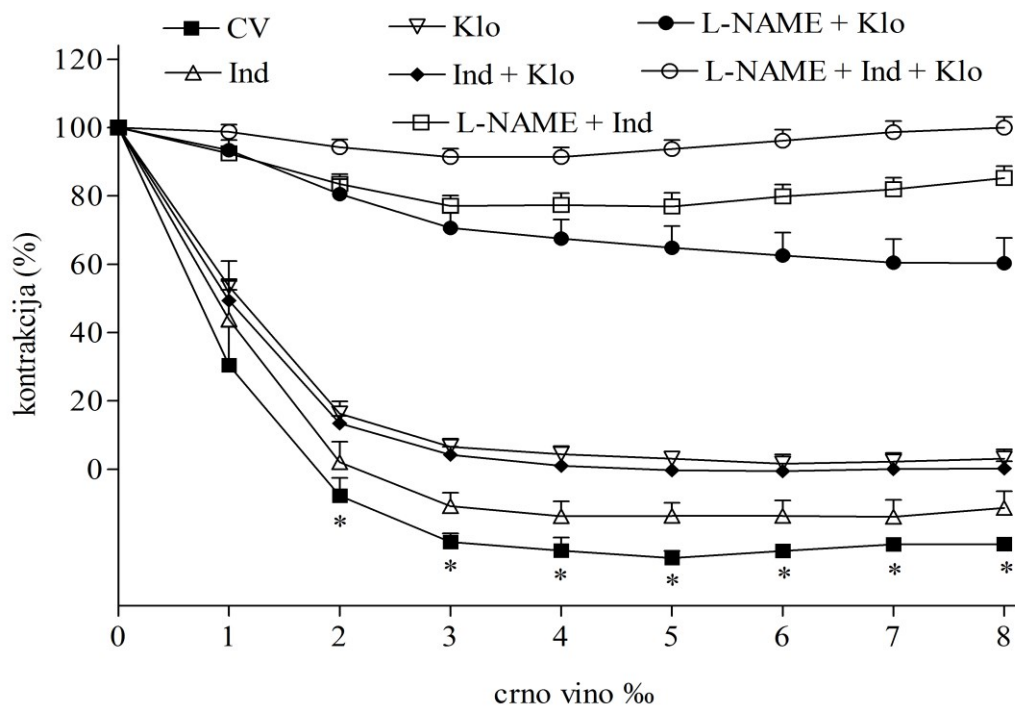
n=12 prstenova po skupini

* $p < 0,05$ u odnosu na ostale skupine

Za istraživanje mehanizama ostatne vazodilatacije koja perzistira i nakon inkubacije prstenova sa L-NAME-om, aortni prstenovi zamorčića dodatno su izlagani indometacinu, klotrimazolu, njihovoj kombinaciji, sa ili bez L-NAME.

Inkubacija aortnih prstenova zamorčića s indometacinom, inhibitorom ciklooksigenaze, nesignifikantno je reducirala vazodilatacijski odgovor na vino. E_{max} prstenova inkubiranih s indometacinom smanjena je za 10-ak posto i iznosila je $113,88 \pm 4,93\%$. Klotrimazol, neselektivni inhibitor enzima citokroma P450, reducirao je vazodilatacijski odgovor aortnih prstenova zamorčića na crno vino za 21% i E_{max} je iznosila $99,37 \pm 2,73\%$. Inkubacija aortnih prstenova zamorčića s kombinacijom indometacina i klotrimazola smanjila je vazodilatacijski učinak crnog vina u jednakoj mjeri kao i sami klotrimazol. E_{max} je iznosila $100,57 \pm 1,67 \%$.

Kombinacija L-NAME i indometacina smanjila je vazodilatacijski učinak vina za oko 80% u odnosu na netretirane prstenove, i E_{max} iznosila je $23,08 \pm 3,97\%$. Kombinacija L-NAME i klotrimazola reducirala je vazodilatacijski učinak vina za oko 70%, E_{max} je iznosila $41,64 \pm 7,38\%$. Tek je kombinacija L-NAME, indometacina i klotrimazola izazvala potpunu blokadu vazodilatacijskog odgovora na vino (Slika 17.).

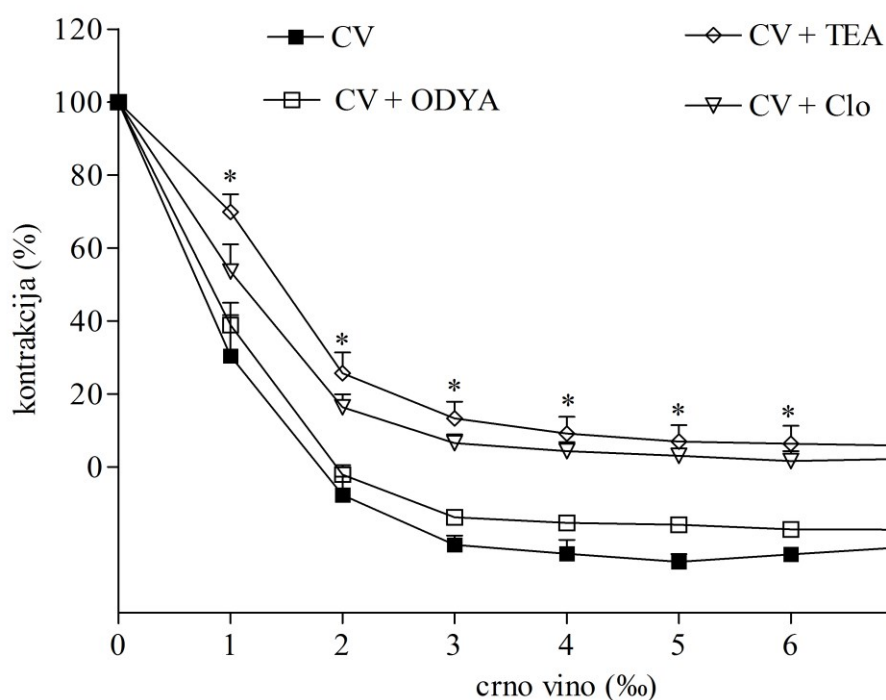


Slika 17. Vazodilatacijski učinci crnog vina (CV) u aornim prstenovima zamorčića koji su inkubirani s indometacinom (Ind), klotrimazolom (Klo), njihovom kombinacijom, sa ili bez L-nitro arginine metil estera (L-NAME). Vazodilatacijski učinak izražen je kao postotak smanjenja kontrakcije izazvane primjenom noradrenalina.

n=12 prstenova po skupini

*p<0,05 u odnosu na ostale skupine, osim skupine s indometacinom

Budući da je klotrimazol neselektivni inhibitor enzima citokroma P450 i ujedno blokator K^+ kanala koji neovisno mogu posredovati u vazodilatacijskom odgovoru, prstenove zamorčića dodatno smo izložili 16-oktadecinoičnoj kiselini (ODYA) kao selektivnom inhibitoru enzima citokroma P450 i tetraetilamoniju (TEA) kao nespecifičnom blokatoru K^+ kanala. Izlaganje prstenova ODYA-i nije mijenjalo vazodilatacijski učinak vina, dok je izlaganje prstenova TEA-i reduciralo vazodilatacijski odgovor na vino slično kao klotrimazol (Slika 18.).

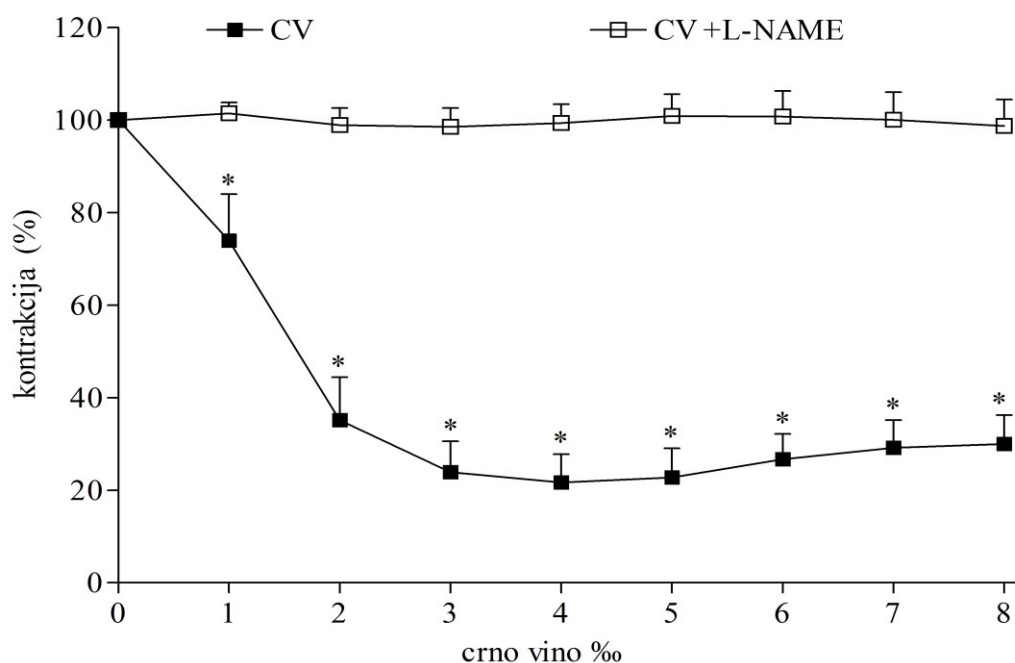


Slika 18. Vazodilatacijski učinci crnog vina (CV) u aornim prstenovima zamorčića inkubiranih sa 16-oktadecinoičnom kiselinom (ODYA), tetraetilamonijem (TEA) i klotrimazolom (Clo). Vazodilatacijski učinak izražen je kao postotak smanjenja kontrakcije izazvane primjenom noradrenalina.

n=12 prstenova po skupini

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu

Bazalna napetost intaktnih aornih prstenova zamorčica izloženih 30 mM koncentraciji kalij-klorida (KCl) iznosila je $20,18 \pm 3,22$ mN i nije se značajno razlikovala od bazalne napetosti prstenova prekontrahiranih NA (10^{-6} M). U aornim prstenovima zamorčica prekontrahiranih KCl-om, crno vino uzrokovalo je o dozi ovisnu vazodilataciju, uz E_{max} $78,31 \pm 6,09\%$. Dodavanje L-NAME aornim prstenovima zamorčica prekontrahiranih KCl-om, u potpunosti je spriječilo vazodilatacijski odgovor na vino (Slika 19.).



Slika 19. Vazodilatacijski učinci crnog vina (CV) u aornim prstenovima zamorčica koji su prekontrahirani s kalijevim kloridom (30 mM). L-nitro arginin metil ester (L-NAME) (300 μ mol/l) u potpunosti inhibira vazodilatacijski učinak vina. Vazodilatacijski učinak izražen je kao postotak smanjenja kontrakcije izazvane kalijevim kloridom (30 mM).

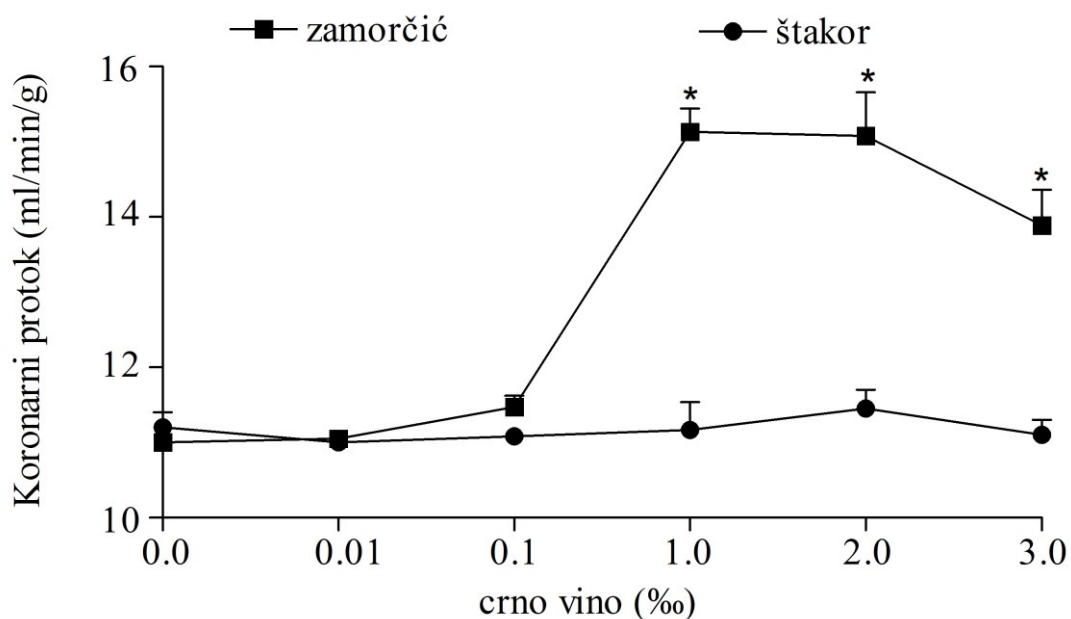
n=12 prstenova po skupini

* $p < 0,05$ u odnosu skupinu izloženu L-NAME-i

4.2. Izolirana srca štakora i zamorčića

4.2.1 Učinci vina na parametre srčane funkcije u bazalnim uvjetima

Bazalne vrijednosti koronarnog protoka u izoliranim srcima zamorčića bile su $10,92 \pm 1,04$ ml/min/g, a u štakora $11,16 \pm 1,32$ ml/min/g te se nisu statistički razlikovale. Izlaganje srca vinu uzrokovalo je statistički značajno povećanje koronarnog protoka na izoliranom srcu zamorčića. Maksimalne vrijednosti protoka iznosile su $15,27 \pm 1,24$ ml/min/g, a izazvala ga je primjena vina u koncentraciji od 1 ‰. U štakorskim srcima, vino nije izazvalo povećanje koronarnog protoka (Slika 20.).

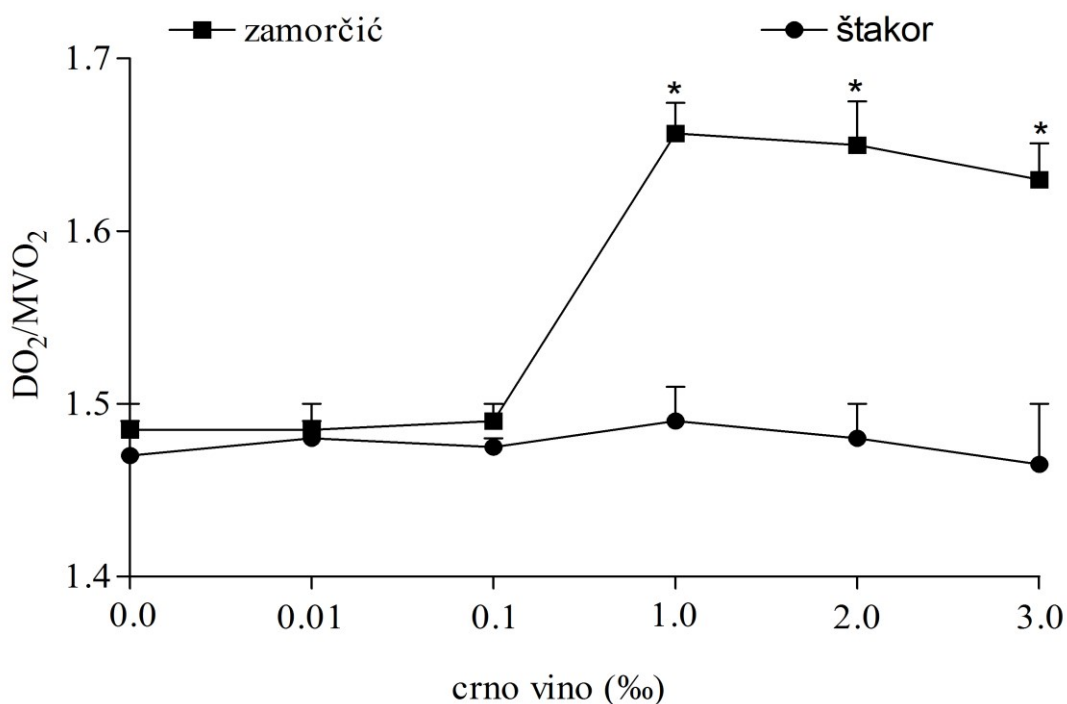


Slika 20. Izravni učinci različitih koncentracija vina (0,01 – 3,0 ‰) na koronarni protok izoliranog srca zamorčića i štakora.

n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na srca štakora

Razlike u vazodilatacijskom odgovoru na vino između srca zamorčića i štakora, vidljive su i u omjeru dopreme i potrošnje kisika (DO_2/MVO_2). Zabilježen je značajno veći DO_2/MVO_2 u srcu zamorčića nego u srcu štakora. Maksimalne vrijednosti DO_2/MVO_2 iznosile se $1,66 \pm 0,06$, a izazvala ga je primjena vina u koncentraciji od 1 ‰. U štakorskim srcima, vino nije izazvalo značajnije povećanje DO_2/MVO_2 (Slika 21.).



Slika 21. Razlike u učincima različitih koncentracija vina (0,01 – 3,0 ‰) na omjer dopreme i potrošnje kisika (DO_2/MVO_2) u izoliranom srcu zamorčića i štakora.

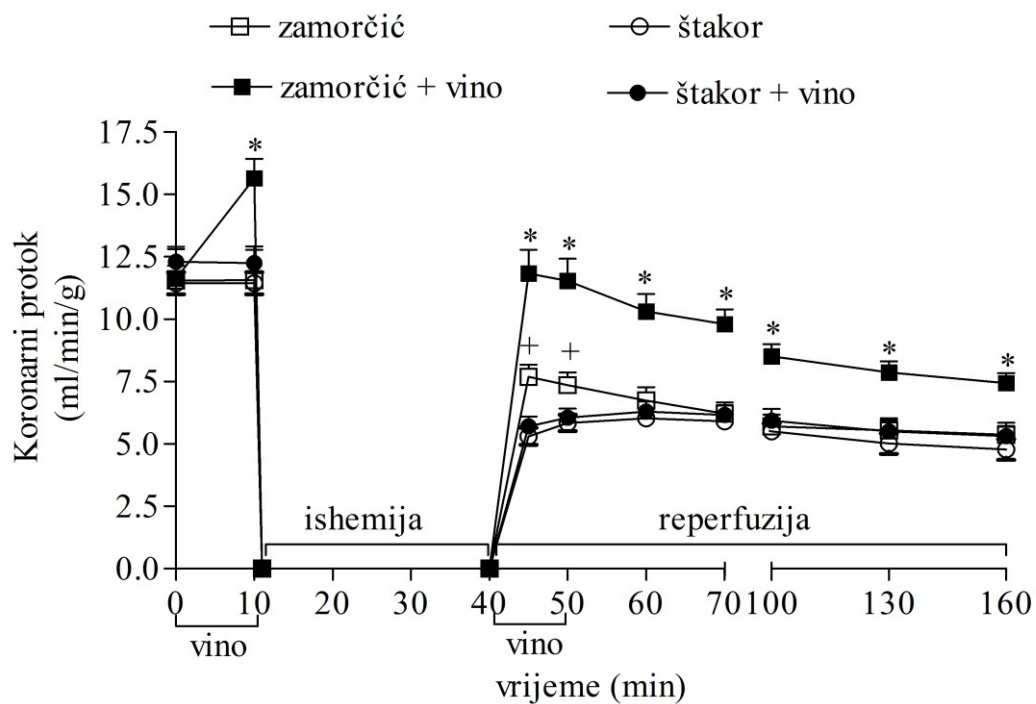
n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na srca štakora

Nasuprot značajnim vazodilatacijskim učincima, primjena vina u koncentraciji od 0,01 – 3,0 ‰ nije uzrokovala značajne promjene u drugim parametrima srčane funkcije kao što su srčana frekvencija, AV vrijeme provođenja i kontraktilna funkcija.

4.2.2. Učinci vina na parametre srčane funkcije u uvjetima ishemije i reperfuzije

Početne vrijednosti koronarnog protoka u srcima podvrgnutim ishemiji i reperfuziji, sa i bez izlaganja vinu nisu se razlikovale, kako unutar tako i među vrstama. Vrijednosti protoka u srcima štakora podvrgnutih ishemiji-reperfuziji bez izlaganja vinu iznosile su $11,44 \pm 0,98$ ml/min/g, a u srcima izloženim vinu $12,11 \pm 0,77$ ml/min/g. Dok su vrijednosti protoka u srcima zamorčića podvrgnutih ishemiji-reperfuziji bez izlaganja vinu iznosile $11,56 \pm 0,51$ ml/min/g, a u srcima izloženim vinu su iznosile $11,63 \pm 0,54$ ml/min/g. Kao i u pokusima na srcu u bazalnim uvjetima, izlaganje srca zamorčića vinu u koncentraciji od 1 ‰ uzrokovalo je statistički značajan porast koronarnog protoka koji je iznosio $15,89 \pm 1,24$ ml/min/g, dok u srcu štakora vino nije uzrokovalo značajne promjene koronarnog protoka. S nastupom reperfuzije u srcima zamorčića došlo je do značajno većeg porasta koronarnog protoka u odnosu na štakorska srca, posebno u srcima izloženim vinu. Prestankom primjene vina, došlo je do pada koronarnog protoka u srcima zamorčića, dok se u srcima štakora nije zabilježila promjena. Do kraja promatranog vremena reperfuzije koronarni protok u srcima zamorčića izlaganih vinu ostao je značajno veći (maksimalni protok $11,84 \pm 0,94$ ml/min/g) u odnosu na ostale skupine srca (maksimalni protok srca zamorčića bez izlaganja vinu $7,70 \pm 0,48$ ml/min/g, srca štakora izlagana crnom vinu $6,31 \pm 0,39$ ml/min/g, srca štakora bez izlaganja vinu $6,03 \pm 0,29$ ml/min/g) (Slika 22.).



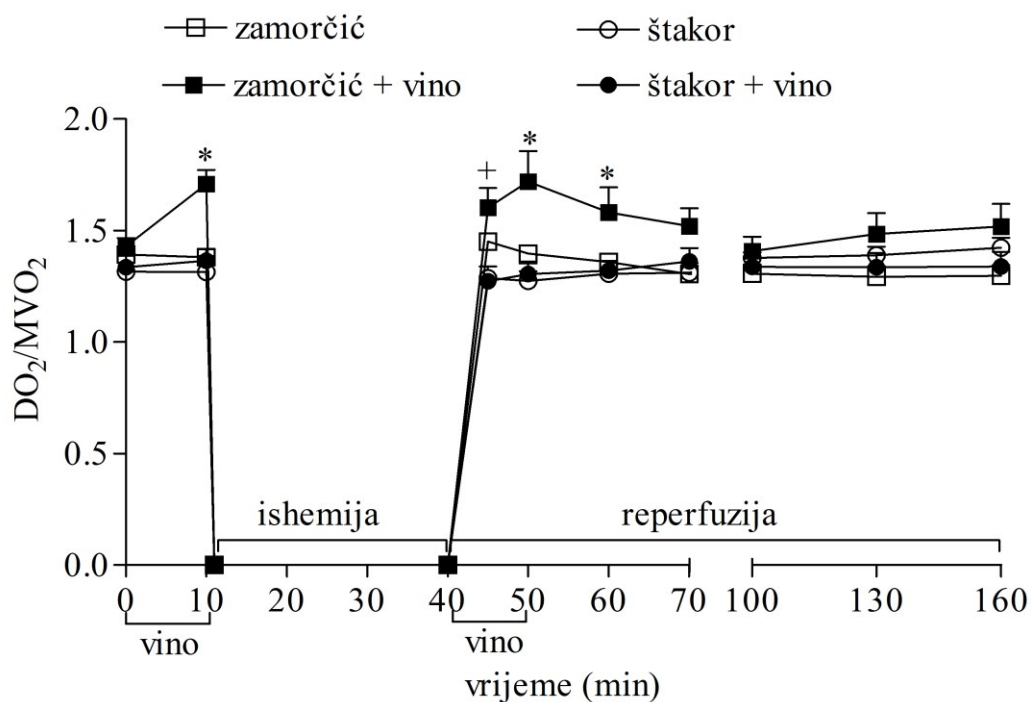
Slika 22. Koronarni protok srca zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1‰), prije, tijekom i poslije 30 minutne globalne ishemije.

n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na ostale skupine

+p<0,05 u odnosu na srca štakora

Bazalne vrijednosti omjera između dopreme i potrošnje kisika (DO_2/MVO_2) nisu se razlikovale između ispitivanih skupina. Izlaganje srca vinu dovelo je do statistički značajnog porasta omjera DO_2/MVO_2 u srcima zamorčića, ali ne i u srcima štakora. Vrijednosti DO_2/MVO_2 tijekom reperfuzije bile su povišene u skupini srca zamorčića koja su bila izložena vinu (Slika 23.).



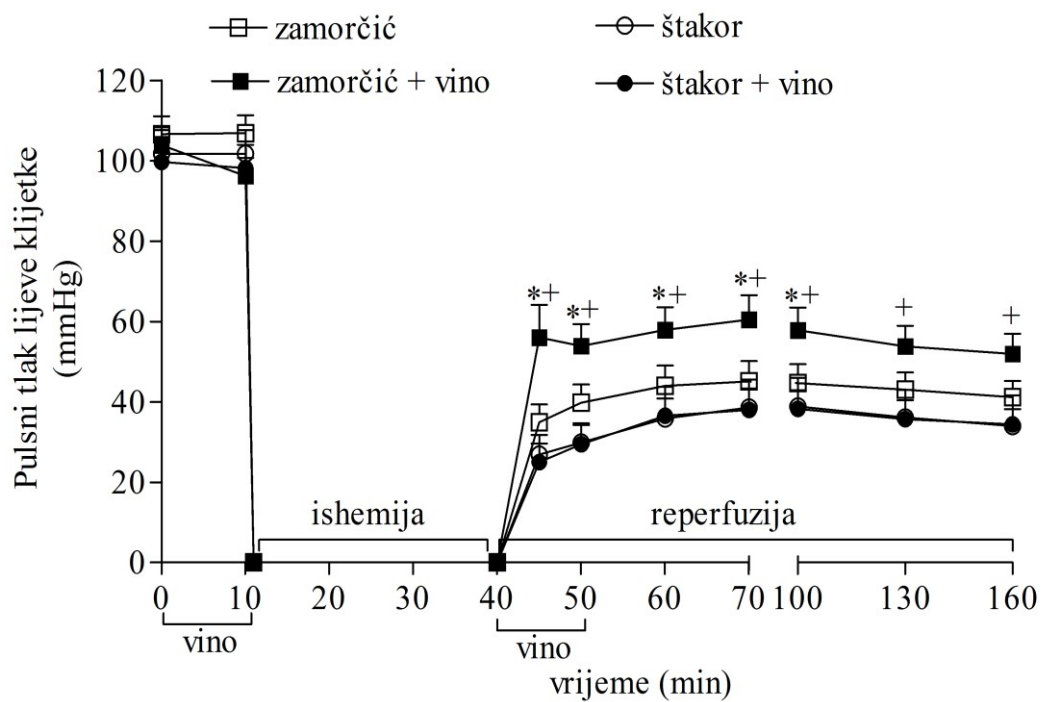
Slika 23. Omjer dopreme i potrošnje kisika (DO_2/MVO_2) srca zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1‰), prije, tijekom i poslije 30 minutne globalne ishemije.

n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na ostale skupine

+p<0,05 u odnosu na srca štakora

Kontrolne vrijednosti pulsno­g tlaka (razlika sistoličkog i dijastoličkog tlaka) lijeve klijetke nisu se razlikovale između srca zamorčića (izlaganih vinu $103,89 \pm 4,41$ mmHg, bez vina ($105,62 \pm 4,45$ mmHg) i štakora (izlaganih vinu $101,34 \pm 6,31$ mmHg, bez vina $103,7 \pm 5,92$ mmHg). Tijekom deset minutnog izlaganja srca zamorčića crnom vinu (1%) dolazi do pada pulsno­g tlaka lijeve klijetke za $7,22 \pm 2,30$ mmHg. Izlaganje srca štakora vinu nije značajno mijenjalo pulsni tlak lijeve klijetke. Ubrzo nakon početka ishemije dolazi do pada pulsno­g tlaka lijeve klijetke izoliranog srca obje vrste. Tijekom reperfuzije dolazi do rasta pulsno­g tlaka lijeve klijetke u svim skupinama. Najveći porast zabilježen je u srca zamorčića koja su bila izložena vinu i značajno se razlikovao u odnosu na srca zamorčića koja nisu bila izložena crnom vinu. Srca štakora izložena crnom vinu nisu pokazala bolji oporavak u odnosu na netretirana srca štakora. Pulsni tlak između netretiranih srca štakora i zamorčića nije se statistički razlikovao tijekom reperfuzije, iako je pulsni tlak srca zamorčića bio nešto veći. Tijekom 120 minuta reperfuzije maksimalni oporavak pulsno­g tlaka, prikazan kao postotak od kontrolnih vrijednosti je iznosio: 56 % za srca zamorčića izlagana vinu, 43 % za netretirana srca zamorčića, 39 % za srca štakora izlagan vinu i 38 % za netretirana srca štakora (Slika 24.).



Slika 24. Pulsni tlak lijeve klijetke srca zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1‰), prije, tijekom i poslije 30 minutne globalne ishemije.

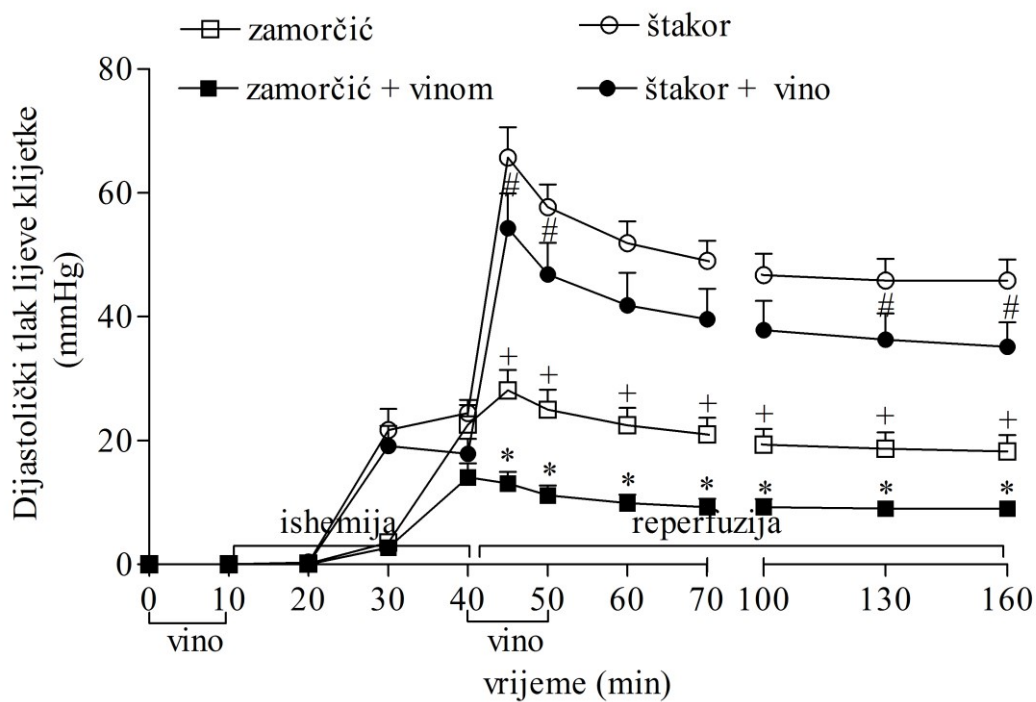
n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na netretirana srca zamorčića

+p<0,05 u odnosu na srca štakora

Bazalne vrijednosti dijastoličkog tlaka lijeve klijetke iznosile su 0 mm Hg za sve promatrane skupine. Izlaganje srca vinu nije izazvalo promjene vrijednosti dijastoličkog tlaka. Tijekom prvih 15-ak minuta ishemije, tlak lijeve klijetke održavao se na početnoj razini od 0 mm Hg, nakon čega je porastao u svim skupinama. Porast tlaka lijeve klijetke na kraju ishemije je bio značajno veći u skupinama koje nisu bile tretirane vinom.

S nastupom reperfuzije i uspostavom kontraktilne aktivnosti srca dolazi do daljnjeg povećanja dijastoličkog tlaka i taj porast je značajno veći u netretiranim skupinama. Statistički značajno veća kontraktura je zabilježena u srcima štakora. Makismalne vrijednosti dijastoličkog tlaka zabilježene su u 5. minuti reperfuzije i znosile su: $14,09 \pm 2,21$ mmHg za srca zamorčića izlagana vinu, $28,11 \pm 3,29$ mmHg za netretirana srca zamorčića, $54,29 \pm 5,61$ mmHg za srca štakora izlagana vinu i $65,71 \pm 4,87$ mmHg za netretirana srca štakora. Tijekom daljnje reperfuzije dijastolički tlak se smanjivao, ali dalje su održane razlike između skupina (Slika 25.).



Slika 25. Dijastolički tlak lijeve klijetke srca zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1‰), prije, tijekom i poslije 30 minutne globalne ishemije.

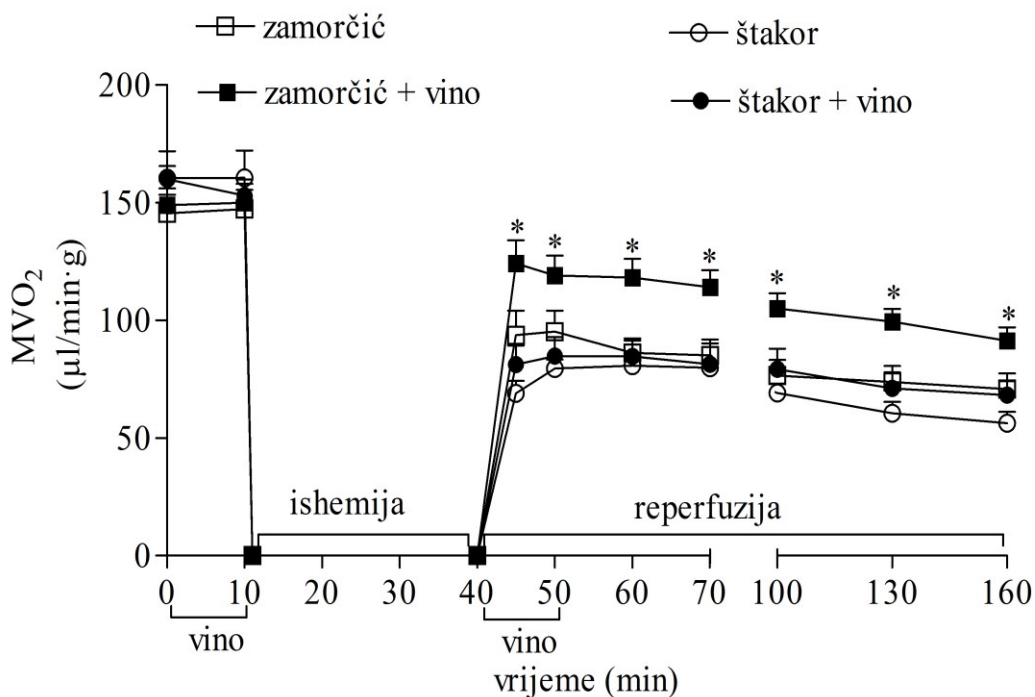
n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na ostale skupine

*p<0,05 u odnosu na srca štakora

#p<0,05 u odnosu na netretirana srca štakora

Bazalne vrijednosti potrošnje kisika (MVO_2) nisu se razlikovale između ispitivanih skupina. Deset minutno izlaganje srca crnom vinu nije uzrokovalo značajne promjene u potrošnji kisika. Tijekom reperfuzije srca zamorčića koja su bila izložena crnom vinu imala su značajno veću potrošnju kisika u odnosu na ostale skupine (Slika 26.).

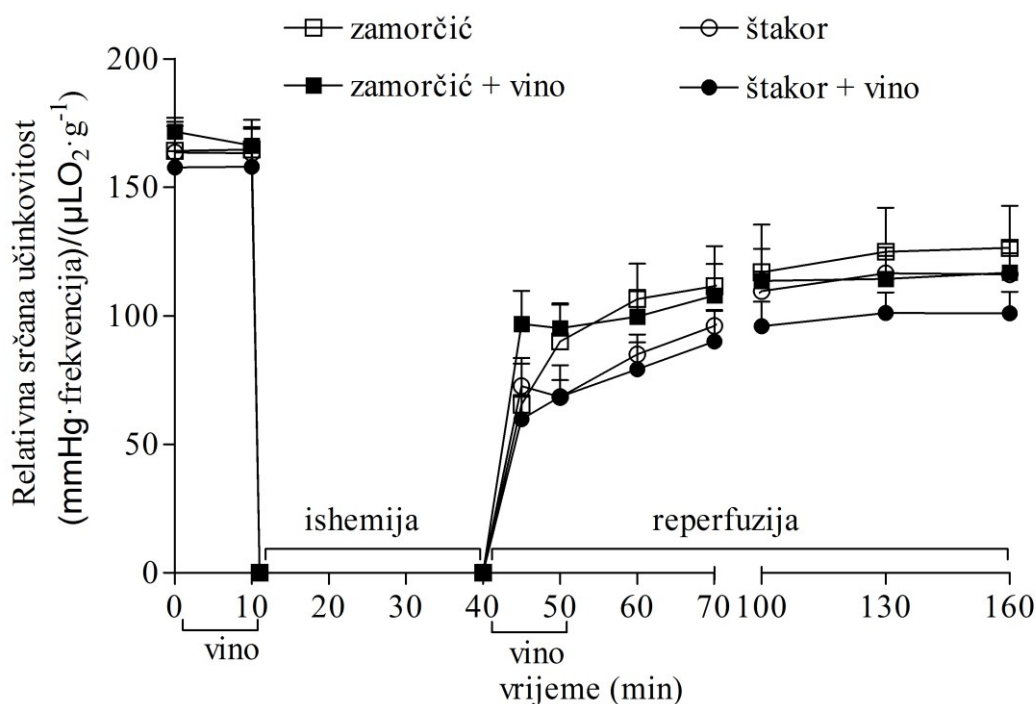


Slika 26. Potrošnju kisika (MVO_2) srca zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1%), prije, tijekom i poslije 30 minutne globalne ishemije.

n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na ostale skupine

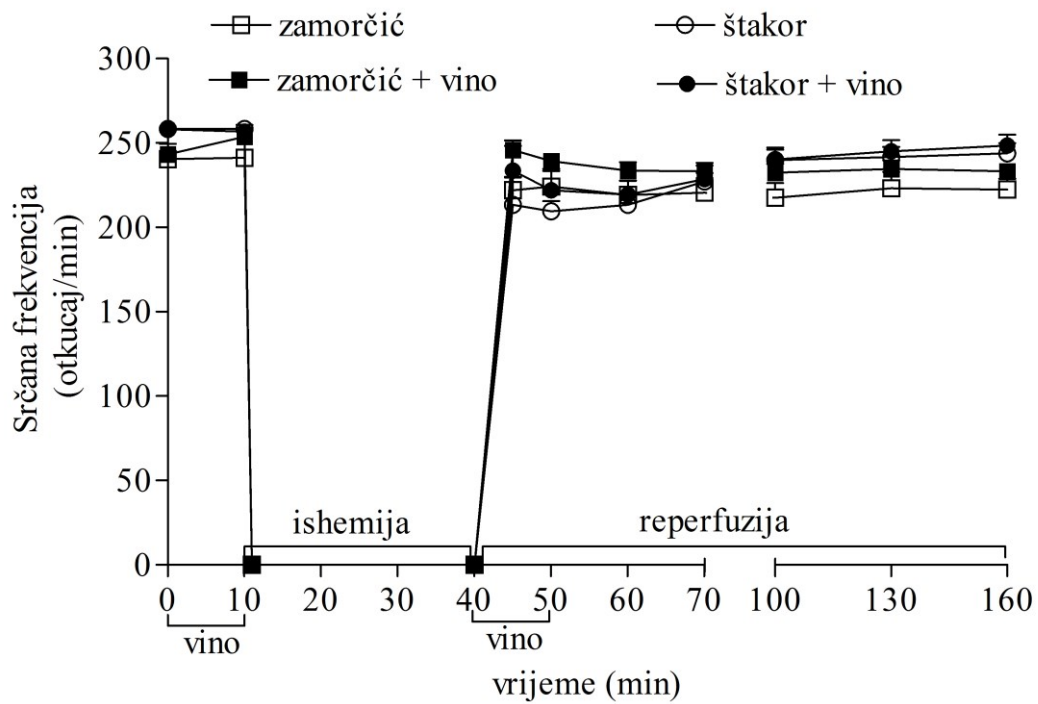
Relativna srčana učinkovitost nije se razlikovala između ispitivanih skupina na početku pokusa. Deset minutno izlaganje srca vinu nije dovelo do značajne promjene srčane učinkovitosti. Tijekom reperfuzije relativna srčana učinkovitost se smanjila u svim srcima te nije bilo razlike među skupinama (Slika 27.).



Slika 27. Relativna srčana učinkovitost srca zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1‰), prije, tijekom i poslije 30 minutne globalne ishemije. n=10 srca po skupini

Kontrolne vrijednosti frekvencije srca štakora (izlaganih vinu $256,74 \pm 3,90$, bez vina $258,28 \pm 3,49$) bile su nešto veće u odnosu na srca zamorčica (izlaganih vinu $243,36 \pm 6,19$, bez vina $240,38 \pm 4,41$). Nije postojala razlika u srčanoj frekvenciji između tretiranih i netretiranih srca iste vrste. Tijekom izlaganja srca vinu nije došlo do statistički značajne promjene srčane frekvencije, iako je tijekom izlaganja crnom vinu na srcima zamorčica zabilježeno blago ubrzanje srčane frekvencije za 5-6 %. Ventrikulska električna aktivnost se usporila s nastupom ishemije, da bi do 15. minute ishemije prestala u svim srcima.

Tijekom 20-ak minuta reperfuzije frekvencija se vratila na predishemijsku razinu u svim skupinama koje se međusobno nisu statistički razlikovale (Slika 28.).

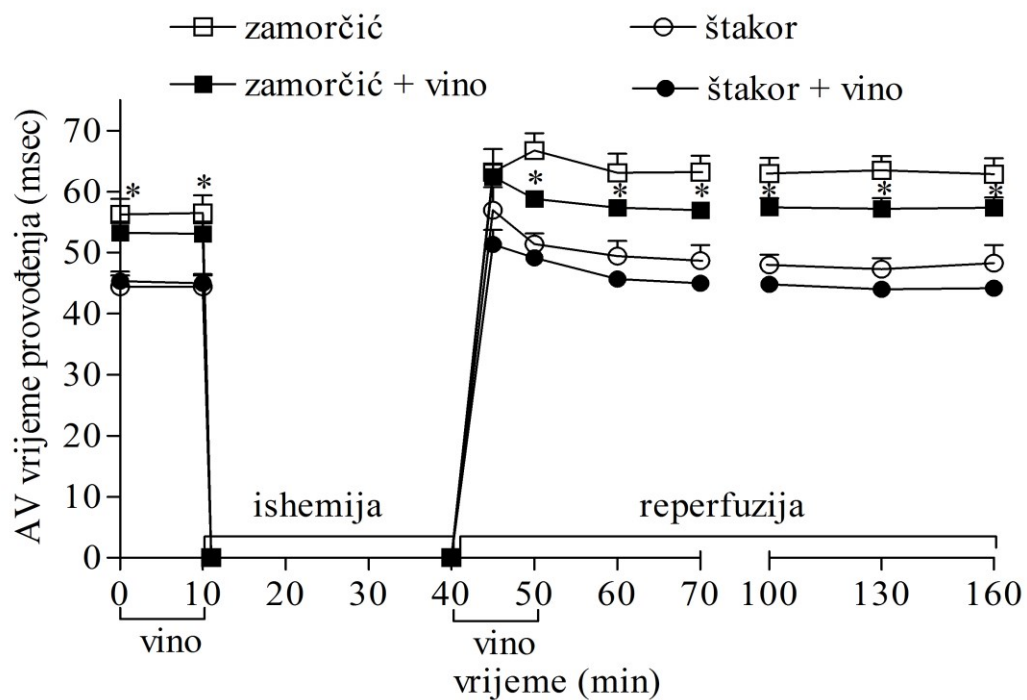


Slika 28. Frekvencija srca zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1‰), prije, tijekom i poslije 30 minutne globalne ishemije.

n=10 srca po skupini

Kontrolne vrijednosti A-V vremena provođenja u srcima štakora (izlaganih vinu $45,33 \pm 1,59$ msec, bez vina $44,43 \pm 1,81$ msec) bila su statistički značajno kraća u odnosu na srca zamorčića (izlaganih vinu $53,27 \pm 1,83$ msec, bez vina $54,25 \pm 2,61$ msec). Nije postojala značajna razlika u A-V vremenu provođenja između tretiranih i netretiranih srca iste vrste. S nastupom ishemije A-V vrijeme provođenja se produžilo te je došlo do pojave A-V bloka u svim ispitivanim skupinama.

Tijekom prvih 20 minuta reperfuzije A-V vrijeme provođenja vratilo se na početnu razinu kod skupina koje su prethodno tretirane crnim vinom. Netretirana srca obje vrste pokazala su tendenciju duljeg A-V vremena provođenja bez statističke značajnosti tijekom cijelog perioda reperfuzije (Slika 29.).

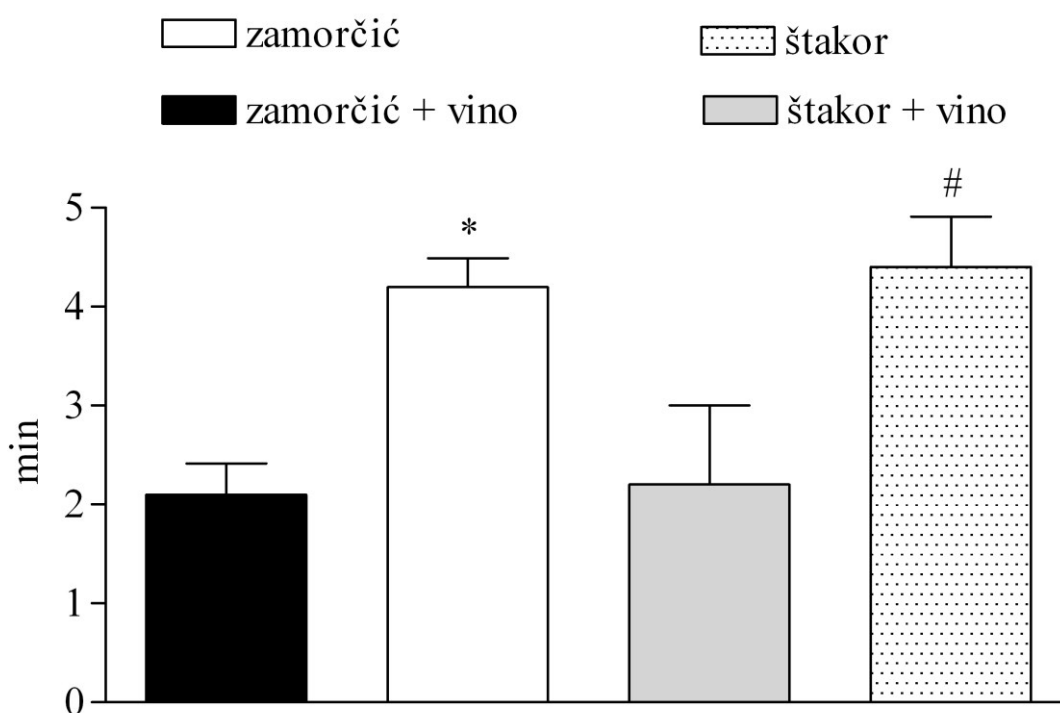


Slika 29. Atrioventrikularno (A-V) vrijeme provođenja srca zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1‰), prije, tijekom i poslije 30 minutne globalne ishemije.

n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na srca štakora

Tijekom početnog razdoblja, kao i tijekom primjene vina sva srca su bila u sinus ritmu. U početnoj fazi ishemije srca su zadržala sinus ritam, nakon čega se razvio A-V blok provođenja, a potom ventrikulski arrest. Tijekom reperfuzije najčešći poremećaj ritma bila je ventrikulska fibrilacija. Trajanje ventrikulske fibrilacije bilo je statistički značajno kraće u vinom tretiranim srcima obje vrste u odnosu na netretirana srca (Slika 30.).



Slika 30. Trajanje ventrikulske fibrilacije u srcima zamorčića i štakora, sa i bez izlaganja vinu (1‰), tijekom 120-minutne reperfuzije.

n=10 srca po skupini

*p<0,05 u odnosu na tretirana srca zamorčića

#p<0,05 u odnosu na tretirana srca štakora

5. RASPRAVA

5.1. Izolirani aortni prstenovi štakora i zamorčica

U prvom dijelu ove disertacije istražili smo i usporedili temeljne vazodilatacijske mehanizme crnog vina u izoliranim aortnim prstenovima zamorčica i štakora, dva životinjska modela koja se najčešće koriste u *in vitro* kardiovaskularnim istraživanjima.

Crno vino je poznati izravni vazodilatator i dobar predstavnik hrane i biljnih ekstrakta bogatih polifenolima s dokazanom vazodilatacijskom aktivnošću (27, 33). Međutim, do sada nisu istraživani vazodilatacijski učinci crnog vina na istom tipu krvnih žila dobivenih od različitih životinjskih modela u istim eksperimentalnim uvjetima.

Iz rezultata vidljiva je snažna antioksidacijska i vazodilatacijska aktivnost crnog vina korištenog u ovom istraživanju, iako su koncentracije u kojima je primjenjivano (1 – 8 ‰) usporedive sa drugim studijama. Tome vjerojatno doprinosi visoka koncentracija polifenola koja je značajno veća u odnosu na prosječna vina korištena u drugim studijama (48). Burns je pokazao jaku korelaciju između vazodilatacije, antioksidativnog kapaciteta i količine polifenola u crnom vinu (113). Zbog velike varijabilnosti u sastavu vina i posljedičnoj biološkoj aktivnosti, rezultati studija ovakvog tipa su teški za uspoređivanje. Prema tome, da bi ovakve studije bile usporedive, potrebno je učiniti bazičnu biokemijsku karakterizaciju korištenog vina.

Ključni nalazi ovog dijela disertacije su sljedeći: crno vino uzrokuje snažniju vazodilataciju izoliranih aortnih prstenova zamorčica nego štakora, inkubacija aortnih prstenova štakora sa L-NAME-om, inhibitorom NO sintetaze,

u potpunosti inhibira vazodilatacijski odgovor na vino dok je u aortalnim prstenovima zamorčica vazodilatacija samo djelomično inhibirana. Navedeni rezultati pokazuju bitnu razliku u vazodilatacijskim mehanizmima crnog vina između aorte zamorčica i štakora.

Umjerena razlika u vazodilatacijskim učincima crnog vina između ove dvije vrste zabilježena je i u aortalnim prstenovima kojima je odstranjen endotel. Vazodilatacijski odgovor na vino u aortalnim prstenovima štakora s odstranjenim endotelom u potpunosti je bio inhibiran dok je u aortalnim prstenovima zamorčica vazodilatacijski odgovor na vino bio donekle sačuvan. Takva endotel neovisna rezidualna relaksacija, je vjerojatno posredovana vinskim polifenolima (33). Nekoliko studija pokazalo je da polifenoli mogu inhibirati fosfodiesterazu cikličkih nukleotida što rezultira povećanjem razine cAMP-a i c-GMP-a, koji mogu uzrokovati endotel neovisnu vazodilataciju krvnih žila (114, 115). Slično kao i u nekoliko drugih studija, u aortalnim prstenovima štakora L-NAME-a je prevenirala vazodilatacijski odgovor na vino što pokazuje središnju ulogu NO-a u tome procesu (28, 30).

Za istraživanje mehanizama rezidualne, NO neovisne vazodilatacije, nakon inkubacije sa L-NAME-om aortalni prstenovi zamorčica su dodatno izloženi indometacinu, klotrimazolu i njihovoj kombinaciji.

Inkubacija aortalnih prstenova zamorčica s indometacinom je neznačajno smanjila vazodilatacijski odgovor na vino u odnosu na kontrolnu vazodilataciju. U aortalnim prstenovima kunića (29) i mezenterijalnim krvnim žilama štakora (39) indometacin također nije značajno ometao vazodilatacijski učinak crnog vina. Vazodilatacijska aktivnost PGI₂ uvjetovana je prisutnošću specifičnih receptora na stanicama glatkih mišića krvnih žila (13). Prema tome, u žilama koje nemaju

takve receptore PGI₂ ne doprinose endotel-ovisnoj vazodilataciji. Aktivacija takvih receptora rezultira hiperpolarizacijom glatkomišićnih stanica i vazodilatacijom koja može biti posredovana aktivacijom nekoliko različitih tipova K⁺ kanala (116). Međutim, kada smo kombinirali indometacin i L-NAME-u, vazodilatacijski učinak crnog vina je reduciran za 80%, što pokazuje sinergistički učinak ova dva agensa. Zaista, dokazano je da PGI₂ mogu olakšati oslobađanje NO-a iz endotelnih stanica (16) i obrnuto, procijanidini iz vina stimuliraju aktivnost COX i produkciju PGI₂ kroz NO-ovisne puteve (31).

Klotrimazol, imidazolski antimikotik, inhibitor enzima citokroma P450 i blokator K⁺ kanala ovisnih o kalciju (MaxiK, BK) smanjio je vazodilatacijski učinak vina za 25%. To pokazuje da je vazodilatacijski učinak vinom posredovan produktima citokroma P450, kao što su epoksieikosatrienoične (EET) kiseline ili izravnim učincima vina na K⁺ kanale glatkih mišića aorte zamorčića (117). Budući da klotrimazol ne otkriva je li vazodilatacija posredovana izravnim učincima vina na K⁺ kanale ili neizravnim učincima EET kiselina na K⁺ kanale, aortne prstenove zamorčića dodatno smo inkubirali s ODYA-om, selektivnim inhibitorom enzima citokroma P450 i tetraetilamonijem (TEA), nespecifičnim blokatorom K⁺ kanala. Izlaganje prstenova ODYA-i nije mijenjalo vazodilatacijski učinak vina, dok je izlaganje prstenova TEA-i reduciralo vazodilatacijski odgovor na vino slično kao klotrimazol. To ukazuje da vino svoje vazodilatacijske učinke u aorti zamorčića ostvaruje posredstvom K⁺ kanala dok EET kiseline nisu dio tog vazodilatacijskog mehanizma.

Dodavanje indometacina klotrimazolu nije uzokovalo daljnju redukciju vazodilatacijskog odgovora na vino u usporedbi sa samim klotrimazolom. To odgovara spoznaji da je relaksacija aorte zamorčića u odgovoru na aktivaciju

PGI₂ receptora uglavnom pripisana aktivaciji K⁺ kanala ovisnih o kalciju (118). Budući da klotrimazol također interferira s tim putem vazodilatacije, dodatni učinak indometacina nije zabilježen. Samo je kombinacija L-NAME, indometacina i klotrimazola prevenirala vazodilatacijski učinak vina u aornim prstenovima zamorčića.

Za određivanje doprinosa hiperpolarizirajućih endotel-ovisnih vazodilatatora, primarno EDHF-a, u vazodilataciji uzrokovanj vinom u aornim prstenovima zamorčića neki od prstenova su prekontrahirani sa 30 mM KCl-om i nakon toga izloženi vinu, sa i bez L-NAME. Koristili smo 30 mM koncentracije KCl-a zato jer je uzrokovana bazalna napetost izoliranih aornih prstenova obje vrste slična NA i zato što je pokazano da inhibira EDHF-om uzrokovanu relaksaciju i acetilkolinom uzrokovanu hiperpolarizaciju žila zamorčića (119, 120).

U prstenovima zamorčića koji su prethodno kontrahirani KCl-om vazodilatacija uzrokovana vinom bila je značajno manja (E_{max} 78,31 ± 6,09%) nego vazodilatacija u NA prekontrahiranim prstenovima (E_{max} 126,01 ± 2,11%). Ta razlika u vazodilatacijskom odgovoru na vino otprilike odgovara rezidualnoj, NO neovisnoj vazodilataciji aornih prstenova zamorčića nakon izlaganja L-NAME-i. Doista, inkubacija L-NAME-om prstenova prekontrahiranih KCl-om, u potpunosti inhibira vazodilatacijski učinak vina. To pokazuje da NO neovisna vazodilatacija uzrokovana vinom u aornim prstenovima zamorčića je vjerojatno posredovana EDHF-om i drugim mogućim endotel ovisnim vazodilatatorima čija aktivnost rezultira aktivacijom K⁺ struje.

Zaključno, ova studija je pokazala uključenost različitih putova u vinom uzrokovanj vazodilataciji u aorti zamorčića, nasuprot aorti štakora, u kojoj NO

igra glavnu ulogu. Osim toga, aorta zamorčica pokazuje veću osjetljivost na vino nego aorta štakora, za razliku od osjetljivosti na endogene medijatore kao što je Ach.

2. Izolirano srce štakora i zamorčiča

Crno vino je u bazalnim uvjetima pokazalo značajnije učinke na parametre srčane funkcije u izoliranim srcima zamorčiča nego u štakora. U uvjetima ishemije i reperfuzije zabilježeni su značajni protektivni učinci crnog vina na izolirana srca obje vrste, s tim da je zaštitna uloga vina u značajno većoj mjeri ostvarena u srcima zamorčiča.

Prije rasprave o učincima vina na izolirana srca štakora i zamorčiča, u bazalnim i u uvjetima globalne normotermijske ishemije i reperfuzije, te o razlikama među vrstama, potrebno je reći nešto o prednostima i nedostacima sustava za izolirano srce po Langendorffu.

Eksperimentalni model izoliranog srca, korišten u ovoj studiji, pruža prednost pred *in vivo* modelom jer omogućuje, pod stalnim i kontroliranim uvjetima, objektivno ispitivanje izravnog učinka neke tvari na samo srce izbjegavajući interferenciju promjenjivog volumnog i tlačnog opterećenja srca, kao i autonomnu i humoralnu, odnosno kompenzacijsku modifikaciju izvornog srčanog odgovora.

S druge strane, perfundiranjem srca kristaloidnom otopinom zaobilazi se uloga krvnih elemenata koji mogu imati značajnu ulogu u nastanku i opsegu ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja. Također, učinci neke tvari na izoliranom srcu ne moraju uvijek odgovarati učincima iste tvari na parametre srčane funkcije u *in vivo* uvjetima. Tijekom primjene različitih tvari u izolirano srce zaobilaze se putevi apsorpcije, transformacije i eliminacije što značajno može mijenjati učinak neke tvari tijekom primjene u *in vivo* uvjetima.

Naši rezultati nedvojbeno dokazuju da koronarne arterije i aorta zamorčiča imaju snažniji odgovor na vino nego iste žile štakora. Pojam

vazodilatacija se definira kao smanjenje otpora u krvnim žilama. Međutim, ispravnije je određivati vazodilatacijske učinke neke tvari na temelju omjera između količine dopremljenog i potrošenog kisika, odnosno temeljem smanjivanja arterijsko-venske razlike u koncentraciji kisika. Samo na ovaj način je moguće procijeniti jesu li promjene u protoku posljedica farmakološkog učinka ili se radilo o prilagodbi protoka zbog povećane ili smanjenje metaboličke potrebe miokarda (121). Budući da je na srcu zamorčića povećan koronarni protok, ali i omjer između dopreme i potrošnje kisika, sa sigurnošću se može potvrditi da je vino uzrokovalo aktivnu vazodilataciju koronarnih arterija i povećalo koronarni protok u srcu zamorčića bez povećanja metaboličkih potreba. Rezultati dosadašnjih istraživanja koja su se bavila učincima vina na koronarne krvne žile su nekonzistentni i kontradiktorni. Dokazano je da vazodilatacijski učinci vina ovise o vrsti i porijeklu vina kao i vrsti eksperimentalnog modela koji je korišten u istraživanju. Utvrđeno je da pojedina francuska i talijanska crna vina dilatiraju humane koronarne krvne žile, dok njemačka vina nisu uzrokovala vazodilataciju (30). Iste učinke vina na koronarnim arterijama štakora, kao u ovoj studiji, pokazali su Rending i njegov tim, gdje crno vino nije uzrokovalo vazodilataciju koronarnih žila štakora (44). Slični učinci polifenola iz vina kao na koronarnoj cirkulaciji zamorčića utvrđeni su na koronarnim krvnim žilama svinje (40).

Vazodilatacija i povećanje koronarnog protoka tijekom primjene vina u srce zamorčića može značajno doprinijeti smanjenju oštećenja srca koje uzrokuje ishemija i reperfuzija. Povećani koronarni protok tijekom prvih 10-ak minuta reperfuzije je mogao srcima zamorčića pomoći u bržem odstranjenju štetnih produkata metabolizma nastalih tijekom ishemije i početkom reperfuzije.

Pored toga, povećani koronarni protok u srcima zamorčića mogao je ubrzati izmjenu i eliminaciju viška elektrolita iz stanica, osobito Na^+ i Ca^{++} čije su koncentracije izrazito važne za stupanj ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja srca. Veća oštećenja tretiranih srca štakora u odnosu na tretirana srca zamorčića mogu se povezati sa izostankom vazodilatacije i povećanja koronarnog protoka u srcu štakora tijekom primjene vina, ali i nakon toga.

Bazalne vrijednosti kontraktilne snage izoliranog srca štakora i zamorčića u ovoj studiji nisu se statistički značajno razlikovale. U postishemijskom periodu tijekom reperfuzije izolirana srca zamorčića koja su bila tretirana crnim vinom pokazala su statistički značajno veći oporavak kontraktilne funkcije u odnosu na kontrolnu skupinu, ali i u odnosu na crnim vinom tretirana i netretirana srca štakora. Također, zabilježen je nešto bolji oporavak netretiranih srca zamorčića u odnosu na srca štakora.

Nekoliko je mogućih mehanizama kojima je crno vino smanjilo oštećenja izoliranog srca zamorčića. U uvodnom dijelu je rečeno kako su glavni razlozi ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja velika produkcija slobodnih kisikovih radikala i prekomjerno nakupljanje kalcija u stanici, pogotovo tijekom prve minute reperfuzije (49). Crno vino može djelovati na oba spomenuta patofiziološka mehanizma. Vino je snažni antioksidans koji može smanjiti oštećenja staničnih membrana i proteinskih struktura, odnosno ionskih izmjenjivača, što je važno za održavanje ionske homeostaze i posljedično kontraktilne i elektrofiziološke aktivnosti srca (122). Također, inhibirajući L tip kalcijских kanala, polifenoli mogu smanjiti nakupljanje kalcija u stanici i tako umanjiti oštećenja srca i potrošnju energije koja je neophodna tijekom nepovoljnih uvjeta (123). Za razliku od izoliranog srca zamorčića gdje je vino

imalo značajne protektivne učinke na oštećenja kontraktilne funkcije izoliranog srca nastala ishemijom i reperfuzijom, na srcu štakora nismo opazili takve učinke. Slično zapažanje na srcu štakora zabilježeno je u studiji Ranaiva i suradnika, gdje je pokazano da polifenoli iz vina smanjuju veličinu infarkta i oksidacijski stres izoliranog srca štakora, ali to nije značajno doprinijelo funkcionalnom oporavku srca nakon 30 minutne ishemije (124). Primjena crnog vina i polifenola u srce uzrokuje stvaranje i oslobađanje NO-a koji pokazuje mnogostruke učinke na srce (125). Osim vazodilatacijskog učinka, NO može utjecati i na kontraktilnost samog miokarda, iako mišljenja o tome nisu usuglašena. Ray i suradnici u svojoj studiji su pokazali da je upravo NO zaslužan za smanjenje oštećenja miokarda tijekom ishemijskog aresta srca štakora (92). Također, NO u srcu stupa u kemijsku reakciju s kisikovim radikalima te dolazi do stvaranja ONOO⁻ koji je čimbenik ishemijskog prekondicioniranja srca (126, 127). Osim navedenog, crno vino svojom antioksidacijskom aktivnošću također doprinosi ishemijskom prekondicioniranju (75). S druge strane, postoje studije na drugim eksperimentalnim vrstama u kojima je NO pokazao neželjene učinke (128). Na osnovu navedenog, NO ovisno o vrsti može imati dualistički učinak na oštećenja nastala ishemijom i reperfuzijom. U skladu s time su studije Uchiyame i Czarnowske u kojima su zabilježeni oprečni učinci NO-a na proces apoptoze kod srčanih stanica štakora i zamorčića. Tako NO potiče apoptozu kod kardiomiocita štakora dok u srcu zamorčića smanjuje i usporava programiranu staničnu smrt i propadanje kardiomiocita (83, 84). Navedeni rezultati mogu se primijeniti u tumačenju rezultata naše studije u kojoj su oštećenja kontraktilne funkcije srca zamorčića značajno manja kada se izlože crnom vinu u odnosu na srca štakora.

U uvodu je opisan značaj unutarstaničnih enzima koji mogu biti antioksidansi i prooksidansi, među kojima se posebno ističe ksantin oksidoreduktaza. Utvrđeno je da se u izoliranom srcu zamorčića nalazi manja količina ksantin oksidoreduktaze nego u izoliranom srcu štakora (81, 82). Tijekom ishemije dolazi do konverzije ksantin oksidoreduktaza u oksidazu koja sudjeluje u stvaranju kisikovih radikala. Nameće se logičan zaključak da manja količina tog enzima u srcu zamorčića tijekom ishemije i reperfuzije rezultira manjom produkcijom slobodnih radikala pa tako i manjim oštećenjem srca zamorčića nego srca štakora.

Primjena vina nije dovela do promjena u dijastoličkom tlaku. Petnaestak minuta od nastupa globalne ishemije u svim srcima došlo je do očekivanog povećanja tlaka unutar lijeve klijetke kao posljedica razvoja ishemijskih kontraktura. Porast unutarstanične koncentracije kalcija u ishemiji i reperfuziji značajno doprinosi nastanku srčanih kontraktura dok manjak ATP-a sprječava relaksaciju srčane muskulature. Također, ATP je u stanici potreban i za izbacivanje Ca^{++} iz citosola nasuprot koncentracijskog gradijenta što dodatno pogoduje razvoju kontraktura (129). U srcima zamorčića i štakora koja su izložena vinu došlo je do značajno manjeg razvoja srčanih kontraktura tijekom ishemije i reperfuzije u odnosu na kontrolna srca. Manjoj kontrakturi srca izloženih vinu može doprinijeti izravna inhibicija Ca^{++} i neizravno blokada Na^+ kanala uzrokovana polifenolima iz vina (123, 130). Inhibicijom L tipa kanala vino može smanjiti ulazak Ca^{++} iz izvanstaničnog prostora te neizravno oslobađanje Ca^{++} iz unutarstaničnih skladišta. Blokada Na^+ kanala smanjuje ulazak Na^+ u stanicu, što ima za posljedicu smanjenje aktivnosti Na^+/Ca^{++} izmjenjivača, a što opet doprinosi smanjenju koncentracije Ca^{++} u stanici. Razvoj ishemijskih

kontraktura u srcima štakora bio je više izražen i slabije preveniran vinom u odnosu na srca zamorčica. Jedno od mogućih obrazloženja ovakvih rezultata jest razlika u profilu i kinetici L tipa Ca^{++} kanala između štakora i zamorčica (80).

Struja Ca^{++} koji ulazi u stanicu putem L tipa kanala okidač je za oslobađanje kalcija iz SR, čiji doprinos ukupnoj količini Ca^{++} u citosolu je daleko veći od onoga koji ulazi izvana. Utvrđeno je da je u SR kardiomiocita zamorčica deponirana manja količina Ca^{++} nego u kardiomiocitima štakora (77, 78). Važnost deponiranog Ca^{++} je još značajnija u uvjetima ishemije i reperfuzije jer se Ca^{++} ubrzano otpušta iz unutarstaničnih skladišta, koja su oštećena i nisu u mogućnosti zadržati Ca^{++} . Također, utvrđeno je da je kardiomiocitima zamorčica potrebna puno veća količina izvanstaničnog Ca^{++} , kao pokretača oslobađanja Ca^{++} deponiranog u SR, nego što je to slučaj u kardiomiocitima štakora.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ izmjenjivač također ima značajnu ulogu u održavanju homeostaze Ca^{++} u stanici, odnosno pomaže ionskim crpkama u eliminaciji Ca^{++} iz stanice (55). Manjoj kontrakturi srca zamorčica i općenito njihovom boljem postishemijskom oporavku može doprinijeti veća aktivnost i gustoća $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ izmjenjivača u odnosu na štakorska srca (77). Naime, u eliminaciji Ca^{++} iz citosola, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ izmjenjivač ima značajno veću ulogu u srcu zamorčica nego u srcu štakora, a što posebno važno može biti u uvjetima ishemije i reperfuzije (79).

Sama kontraktura miokarda tijekom ishemije i reperfuzije može uzrokovati značajna oštećenja kontraktilnog aparata. Tijekom hiperkontrakture dolazi do izrazitog naprezanja kontraktilnih niti i pucanja mišićnih vlakana što

uzrokuje ireverzibilna oštećenja srčanog mišića, a time i razvoj slabije kontraktilne snage tijekom reperfuzije.

Početne vrijednosti srčane frekvencije i AV vremena provođenja su bile značajno brže u srcima štakora nego u srcima zamorčića. Dokazano je da u nastanku akcijskog potencijala u sinusatrijskom čvoru sudjeluju brojne ionske struje i da se one značajno razlikuju među vrstama. Različita aktivnost ionskih kanala kod različitih eksperimentalnih vrsta značajno mijenja trajanje akcijskog potencijala pa tako i AV vrijeme provođenja i srčanu frekvenciju (131). Tijekom zaravni akcijskog potencijala inaktivacija Ca^{++} struje u kardiomiocitima zamorčića je sporija nego u štakora. To pak dovodi do produženja trajanja akcijskog potencijala i srčanog ciklusa u zamorčića, što rezultira sporijom frekvencijom i AV vremenom provođenja (80).

Tijekom reperfuzije crno vino je značajno smanjilo trajanje ventrikulske fibrilacije u srcima objiju vrsta. Poremećaji srčanog ritma su čest pratilac ishemijsko-reperfuzijskih oštećenja miokarda i uvjetovani su višestrukim čimbenicima, od kojih stvaranje slobodnih kisikovih radikala i prekomjerno unutarstanično nakupljanje Ca^{++} igra najvažniju ulogu (53, 132). Veza između ventrikulske fibrilacije tijekom reperfuzije i slobodnih radikala je potvrđena u nekoliko studija gdje je primjenom različitih antioksidansa uspješno smanjena incidencija i trajanje srčanih aritmija (99, 133). Tijekom ishemije i reperfuzije također dolazi do oštećenja ionskih kanala te ostalih struktura stanične membrane. Poseban problem predstavlja nakupljanje Ca^{++} u mitohondrijima što dovodi do njihova oštećenja i smanjene sposobnosti stvaranja ATP-a. Stanična hipoenergoza i membransko oštećenje dovode do gubitka ionske homeostaze, što rezultira oscilirajućim depolarizacijama i pojavom akcijskih potencijala

različitih trajanja s posljedičnom disperzijom refraktornih perioda. Srčano tkivo postaje elektrofiziološki nestabilno i pogodno za nastanak različitih srčanih aritmija. Slobodni radikali peroksidacijom lipidne membrane stanice i oštećenjem ionskih kanala dodatno narušavaju ionsku homeostazu, a time i srčanu elektrofiziološku stabilnost. Prethodno spomenuti mehanizmi kojima vino reducira količinu Ca^{++} u stanici mogu očitito doprinijeti i manjoj učestalosti aritmija tijekom reperfuzije (123, 134). Zanimljivo je još spomenuti da različiti polifenoli iz vina pokazuju o uporabi ovisnu blokadu Na^+ kanala. To znači da selektivnije djeluju na kardiomiocite pri većim frekvencijama, kada su Na^+ kanali češće u fazi inaktivacije, i tako doprinose smanjenju poremećaja ritma tijekom reperfuzije (130). Crno vino korišteno u ovome istraživanju izrazito je bogato polifenolima, što je vjerojatan razlog njegove kardioprotektivne učinkovitosti. Doista, slični učinci na učestalost i trajanje aritmija zabilježeni su u studijama u kojima su kao kardioprotektori korišteni pojedini polifenoli ili frakcije crnog vina (89, 99).

Tijekom reperfuzije srca zamorčića koja su bila izložena vinu trošila su najveću količinu kisika. S obzirom na značajan oporavak kontraktilne funkcije, koronarnog protoka i elektrofizioloških parametara u srcima zamorčića koja su bila izložena vinu takav rezultat je očekivan i logičan. Za lakše razumijevanje opisanih rezultata i procjene svrhovitosti potrošnje energije odredili smo relativnu srčanu učinkovitost u svim skupinama. Rezultati su pokazali da je potrošnja kisika bila sukladna izvršenom radu te da ishemija-reperfuzija nije dovela do značajnog raspredanja između potrošnje kisika i stvaranja energije.

Na kraju se može zaključiti da postoje značajne razlike u učincima crnog vina na izolirano srce štakora i zamorčića u bazalnim uvjetima. Utvrđene razlike

pokazale su se značajnim u različitosti odgovora izoliranih srca u uvjetima globalne ishemije i reperfuzije. Prema tome, rezultati istraživanja na izoliranim srcima koja su porijeklom od različitih eksperimentalnih vrsta trebali bi se tumačiti odvojeno i s oprezom, pogotovo kad se istražuju učinci kompleksnih tvari kao što je crno vino.

6. ZAKLJUČCI

6.1. Izolirani aortni prstenovi štakora i zamorčića

1. Aortni prstenovi zamorčića pokazuju snažniji vazodilatacijski odgovor na crno vino nego aortni prstenovi štakora.
2. Vazodilatacijski učinak crnog vina u aornim prstenovima štakora uglavnom ovisi o dušikovom oksidu dok u aornim prstenovima zamorčića u vazodilataciji sudjeluju i drugi medijatori.

6.2. Izolirano srce štakora i zamorčića

1. Crno vino pokazuje značajnije učinke na parametre srčane funkcije izoliranog srca zamorčića nego štakora.
2. Nije utvrđena razlika u osjetljivosti izoliranog srca štakora i zamorčića na uvjete normotermijske globalne ishemije.
3. Vino ostvaruje u puno većoj mjeri protektivne učinke protiv ishemijsko-reperfuzijskih oštećenja izoliranih srca zamorčića nego u štakora.

7. SAŽETAK

U prvom dijelu studije istražili smo i usporedili vazodilatacijske mehanizme crnog vina u izoliranoj aorti štakora i zamorčića. Acetilkinolin uzrokuje snažniju vazodilataciju aortnih prstenova štakora prethodno kontrahiranih noradrenalinom nego u zamorčića, dok je vazodilatacijski učinak crnog vina veći u aortnim prstenovima zamorčića. L-nitro arginin metil ester (L-NAME) u potpunosti inhibira vazodilatacijski učinak vina u aorti štakora dok je u aorti zamorčića učinak vina reduciran za samo 50%. Za istraživanje mehanizama ostatne, L-NAME-a rezistentne vazodilatacije, aortne prstenove zamorčića dodatno smo izložili indometacinu, klotrimazolu i njihovoj kombinaciji. Indometacin je neznačajno reducirao vazodilatacijski učinak vina, dok je u kombinaciji sa L-NAME-om imao sinergistički učinak i smanjio vazodilataciju za 80 %. Nakon izlaganja klotrimazolu, vazodilatacijski učinak vina je smanjen za 25%, a dodavanje indometacina nije uzrokovalo daljnje smanjenje vazodilatacije. Samo kombinacija L-NAME, indometacina i klotrimazola je u potpunosti inhibirala vazodilatacijski učinak vina. Vazodilatacija uzrokovana vinom, u KCl-om prekontrahiranim aortnim prstenovima zamorčića bila je značajno manja (E_{max} 78.31±6.09%) nego vinom uzrokovana vazodilatacija u noradrenalinom prekontrahiranim prstenovima zamorčića (E_{max} 126.01±2.11%). L-NAME-a je u potpunosti inhibirala vazodilatacijski učinak vina u KCl-om prekontrahiranim aortnim prstenovima zamorčića.

Zaključno, vazodilatacijski odgovor na vino u aorti zamorčića posredovan je s više različitih mehanizama, za razliku od štakorske aorte gdje je vazodilatacijski odgovor posredovan samo NO-om.

U drugom dijelu studije istražili smo i usporedili učinke crnog vina na izolirana srca štakora i zamorčića, u bazalnim i uvjetima globalne ishemije i reperfuzije. Vino (0,01 – 3,0 ‰) uzrokuje značajnu vazodilataciju koronarnih arterija u srcu zamorčića što se očituje u nerazmjernom povećanju dopreme kisika u odnosu na potrebe. U srcu štakora primjena vina nije dovela do promjene u promatranim parametrima srčane funkcije. Trideset minutna ishemija u jednakoj mjeri oštećuje funkciju srca zamorčića i štakora. Vino (1‰) smanjuje ishemijsko-reperfuzijska oštećenja srca zamorčića i štakora, ali su protektivni učinci značajno veći u srcu zamorčića. Maksimalni oporavak pulsog tlaka u odnosu na kontrolne vrijednosti iznosio je: 56% za srca zamorčića izlagana vinu, 43% za netretirana srca zamorčića, 39% za srca štakora izlagana vinu i 38% za netretirana srca štakora. Kontraktura miokarda bila je veća u srcu štakora koju je vino reduciralo u izoliranim srcima obje vrste. Srca zamorčića izlagana vinu imala su veći koronarni protok, prije $15,89 \pm 1,24$ ml/min/g i poslije $11,84 \pm 0,94$ ml/min/g ishemije, u odnosu na ostale skupine koje se nisu značajno razlikovale i u kojih je iznosio prije ishemije $11,54 \pm 0,91$ ml/min/g, a poslije $6,64 \pm 0,89$ ml/min/g. Vino je također u većoj mjeri skratilo trajanje ventrikulske fibrilacije tijekom reperfuzije u srcima zamorčića nego u srcima štakora.

Zaključno, rezultati izravnih kardiovaskularnih učinaka vina na modelu izoliranih srca i aorte zamorčića i štakora upućuju na značajne razlike među vrstama, kako u bazalnim uvjetima, tako i u odgovoru na vino i uvjete ishemije i reperfuzije. Prema tome, nekritična ekstrapolacija rezultata s jedne vrste na drugu može biti pogrešna. O tome treba osobito misliti kada se radi o složenim

tvarima kao što je vino, koje svoje učinke ostvaruje kroz multiple farmakološke putove.

8. SUMMARY

In the first part of this study we examined and compared mechanisms of the red wine (RW) induced vasorelaxation in guinea pig (GP) and rat aorta. Acetylcholine-induced relaxation of norepinephrine-precontracted aortic rings was stronger in rat than in GP aorta while RW-induced vasorelaxation was stronger in GP aorta. L-nitro arginine methyl ester (L-NAME) abolished RW-induced vasorelaxation in rat aorta, while in GP aorta it was only reduced by 50%. To examine mechanisms of the L-NAME-resistant relaxation, GP aortic rings were additionally exposed to indomethacin, clotrimazole, and their combination. Indomethacin insignificantly reduced RW-induced relaxation, but in combination with L-NAME the relaxation was synergistically decreased (80%). After clotrimazole the relaxation was reduced by 25% and addition of indomethacin caused no further reduction. Only the combination of L-NAME, indomethacin, and clotrimazole prevented RW-induced vasorelaxation. RW-induced vasorelaxation in KCl-precontracted GP rings was significantly smaller (E_{\max} 78.31±6.09%) than the relaxation induced by RW in norepinephrine-precontracted rings (E_{\max} 126.01±2.11%). L-NAME in KCl-precontracted GP rings prevented RW-induced vasorelaxation.

In conclusion, different pathways are involved in the RW- induced vasorelaxation in GP aorta, in contrast to rat aorta, in which NO plays main role.

In the second part of this study the effects of red wine on isolated rats and guinea pigs hearts were examined and compared in basal conditions and after global ischemia and reperfusion. Wine (0,01 – 3,0‰) induced a significant vasodilatation of coronary arteries in guinea pig heart that resulted in a disproportional increase of oxygen supply compared to demand. In rat heart, appliance of wine did not change observed parameters of heart function. Ischemia equally damaged both rat and guinea pig heart function. Wine (0,01 ‰) decreased ischemia-reperfusion injury of guinea pig and rat hearts, but protective effects were considerably bigger in guinea pig hearts. A maximal recovery of developed pressure compared to baseline values was: 56 % for guinea pigs hearts exposed to wine, 43 % for untreated guinea pig hearts, 39 % for rat hearts exposed to wine and 38 % for untreated rat hearts. The contracture of myocardium was bigger in rat heart and wine reduced contracture in both species. The guinea pig hearts exposed to wine had bigger coronary flow, before $15,89 \pm 1,24$ ml/min/g and $11,84 \pm 0,94$ ml/min/g after ischemia, in contrast to the other groups that did not differ mutually, their coronary flow was before $11,54 \pm 0,91$ ml/min/g, and $6,64 \pm 0,89$ ml/min/g after ischemia. Also, in guinea pig hearts wine markedly reduced duration of ventricular fibrillation during reperfusion than in rat heart.

In summary, the results of direct cardiovascular effects of wine on guinea pig and rat isolated hearts and aorta showed major differences between species in both, basic and ischemia-reperfusion conditions. Therefore, the uncritical extrapolation of the results from one species to another could be misleading. That should be kept in mind, especially in for complex substances, such as wine, whose effects are achieved trough multiple pharmacological pathways.

9. POPIS LITERATURE

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288(5789):373-6.
2. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327(6122):524-6.
3. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1993;28:97-9.
4. Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 1994;23(6 Pt 2):1141-7.
5. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994;368(6474):850-3.
6. Persson PB, Baumann JE, Ehmke H, Nafz B, Wittmann U, Kirchheim HR. Phasic and 24-h blood pressure control by endothelium-derived relaxing factor in conscious dogs. *Am J Physiol* 1992;262(5 Pt 2):H1395-400.
7. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(9):3375-8.
8. Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J* 2003;67(7):572-5.
9. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991;21(4):361-74.
10. Bunting S, Moncada S, Vane JR. The effects of prostaglandin endoperoxides and thromboxane A₂ on strips of rabbit coeliac artery and certain other smooth muscle preparations [proceedings]. *Br J Pharmacol* 1976;57(3):462P-463P.
11. Parfenova H, Hsu P, Leffler CW. Dilator prostanoid-induced cyclic AMP formation and release by cerebral microvascular smooth muscle cells: inhibition by indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272(1):44-52.
12. Parkington HC, Tonta MA, Coleman HA, Tare M. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* 1995;484 (Pt 2):469-80.

13. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 1994;46(2):205-29.
14. Halushka PV, Mais DE, Morinelli TA. Thromboxane and prostacyclin receptors. *Prog Clin Biol Res* 1989;301:21-8.
15. Delpy E, Coste H, Gouville AC. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol* 1996;119(3):471-8.
16. Shimokawa H, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol* 1988;95(4):1197-203.
17. Weigert AL, Martin PY, Niederberger M, Higa EM, McMurtry IF, Gines P, et al. Endothelium-dependent vascular hyporesponsiveness without detection of nitric oxide synthase induction in aortas of cirrhotic rats. *Hepatology* 1995;22(6):1856-62.
18. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23(12):1082-90.
19. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18(7):252-6.
20. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23(8):374-80.
21. Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol* 1992;445:355-67.
22. Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1996;119(5):959-64.
23. Hozumi T, Fukuta H, Suzuki H. Comparison of the relaxing actions of acetylcholine and substance P in smooth muscle of the guinea-pig aorta. *J Smooth Muscle Res* 1997;33(2):67-77.
24. Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988;95(4):1165-74.

25. Van de Voorde J, Leusen I. Effect of histamine on aorta preparations of different species. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1984;268(1):95-105.
26. Curin Y, Andriantsitohaina R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep* 2005;57 Suppl:97-107.
27. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 1993;265(2 Pt 2):H774-8.
28. Andriambeloston E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol* 1997;120(6):1053-8.
29. Cishek MB, Galloway MT, Karim M, German JB, Kappagoda CT. Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits. *Clin Sci (Lond)* 1997;93(6):507-11.
30. Flesch M, Schwarz A, Bohm M. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol* 1998;275(4 Pt 2):H1183-90.
31. Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci* 2003;73(22):2883-98.
32. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen P, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26(1):90-5.
33. Andriambeloston E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, et al. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr* 1998;128(12):2324-33.
34. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, et al. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 2004;500(1-3):299-313.
35. Andriambeloston E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33(2):248-54.
36. de Gaetano G, Cerletti C. Wine and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11(4 Suppl):47-50.

37. Derek D PD, German JB. Endothelial cell basal PGI₂ release is stimulated by wine in vitro: one mechanism that may mediate the vasoprotective effects of wine. *J Nutr Biochem* 1997;647-51.
38. Aldini G, Yeum KJ, Carini M, Krinsky NI, Russell RM. (-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents oxidative damage in both the aqueous and lipid compartments of human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302(2):409-14.
39. de Moura RS, Miranda DZ, Pinto AC, Sicca RF, Souza MA, Rubenich LM, et al. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44(3):302-9.
40. Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(2):371-7.
41. Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, et al. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 2001;414(6866):863-4.
42. Liu JC, Chen JJ, Chan P, Cheng CF, Cheng TH. Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. *Hypertension* 2003;42(6):1198-205.
43. Zhao X, Gu Z, Attele AS, Yuan CS. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J Ethnopharmacol* 1999;67(3):279-85.
44. Rendig SV, Symons JD, Longhurst JC, Amsterdam EA. Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38(2):219-27.
45. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52(4):673-751.
46. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 2002;18(1):75-81.
47. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20(7):933-56.
48. Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:21-36.

49. Fox KA, Bergmann SR, Sobel BE. Pathophysiology of myocardial reperfusion. *Annu Rev Med* 1985;36:125-44.
50. Yellon DM, Downey JM. Current research views on myocardial reperfusion and reperfusion injury. *Cardioscience* 1990;1(2):89-98.
51. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990;82(3):723-38.
52. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982;66(6):1146-9.
53. Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16(6):497-518.
54. Jennings RB, Shen AC. Calcium in experimental myocardial ischemia. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1972;1:639-55.
55. Glitsch HG, Reuter H, Scholz H. The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J Physiol* 1970;209(1):25-43.
56. Grinwald PM. Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: influence of extracellular sodium. *J Mol Cell Cardiol* 1982;14(6):359-65.
57. Grinwald PM, Brosnahan C. Sodium imbalance as a cause of calcium overload in post-hypoxic reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19(5):487-95.
58. Liu XK, Engelman RM, Iyengar J, Cordis GA, Das DK. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery during cardioplegic arrest. A possible role of Na(+)-Ca²⁺ exchange. *Ann N Y Acad Sci* 1991;639:471-4.
59. Harper IS, Bond JM, Chacon E, Reece JM, Herman B, Lemasters JJ. Inhibition of Na⁺/H⁺ exchange preserves viability, restores mechanical function, and prevents the pH paradox in reperfusion injury to rat neonatal myocytes. *Basic Res Cardiol* 1993;88(5):430-42.
60. Mandel F, Kranias EG, Grassi de Gende A, Sumida M, Schwartz A. The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 1982;50(2):310-7.
61. Gao WD, Liu Y, Marban E. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation* 1996;94(10):2597-604.

62. Schaffer SW, Roy RS, McMord JM. Possible role for calmodulin in calcium paradox-induced heart failure. *Eur Heart J* 1983;4 Suppl H:81-7.
63. Elz JS, Nayler WG. Contractile activity and reperfusion-induced calcium gain after ischemia in the isolated rat heart. *Lab Invest* 1988;58(6):653-9.
64. Blaustein AS, Schine L, Brooks WW, Fanburg BL, Bing OH. Influence of exogenously generated oxidant species on myocardial function. *Am J Physiol* 1986;250(4 Pt 2):H595-9.
65. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 1984;2(8411):1095.
66. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1620-4.
67. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17(2):145-52.
68. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312(3):159-63.
69. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol* 1997;58(2):95-117.
70. Kukreja RC, Janin Y. Reperfusion Injury: Basic Concepts and Protection Strategies. *J Thromb Thrombolysis* 1997;4(1):7-24.
71. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 1973;32(8):1870-4.
72. Bagchi M, Prasad MR, Engelman RM, Das DK. Effects of free radicals on the fluidity of myocardial membranes. *Free Radic Res Commun* 1989;7(3-6):375-80.
73. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol* 1988;12(1):239-49.
74. Goldhaber JI, Weiss JN. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. *Hypertension* 1992;20(1):118-27.
75. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47(3):446-56.

76. Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, et al. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;61(3):414-26.
77. Sham JS, Hatem SN, Morad M. Species differences in the activity of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger in mammalian cardiac myocytes. *J Physiol* 1995;488 (Pt 3):623-31.
78. Terracciano CM, MacLeod KT. Measurements of Ca²⁺ entry and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content during the cardiac cycle in guinea pig and rat ventricular myocytes. *Biophys J* 1997;72(3):1319-26.
79. Bers DM, Bassani JW, Bassani RA. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann N Y Acad Sci* 1996;779:430-42.
80. Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflugers Arch* 2000;439(5):588-99.
81. Janssen M, Tavenier M, Koster JF, de Jong JW. In vitro and ex vivo xanthine oxidoreductase activity in rat and guinea-pig hearts using hypoxanthine or xanthine as substrate. *Biochim Biophys Acta* 1993;1156(3):307-12.
82. Janssen M, van der Meer P, de Jong JW. Antioxidant defences in rat, pig, guinea pig, and human hearts: comparison with xanthine oxidoreductase activity. *Cardiovasc Res* 1993;27(11):2052-7.
83. Czarnowska E, Kurzelewski M, Beresewicz A, Karczmarewicz E. The role of endogenous nitric oxide in inhibition of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39(2):179-80.
84. Uchiyama T, Otani H, Okada T, Ninomiya H, Kido M, Imamura H, et al. Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(8):1049-61.
85. Paskvalin M, Khatler JC. Species differences in the effects of an endogenous inotropic factor (EIF) on the myocardium and aortic smooth muscle. *Life Sci* 1997;61(14):1361-9.
86. Galinanes M, Hearse DJ. Species differences in susceptibility to ischemic injury and responsiveness to myocardial protection. *Cardioscience* 1990;1(2):127-43.
87. Boban M, Stowe DF, Buljubasic N, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Direct comparative effects of isoflurane and desflurane in isolated guinea pig hearts. *Anesthesiology* 1992;76(5):775-80.

88. Isaka M, Sakuma I, Shiiya N, Fukushima S, Nakai K, Kitabatake A, et al. Experimental study of the relationship between perfluoro-octyl bromide emulsion and norepinephrine release in reperfusion arrhythmia: isolated guinea pig heart model. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2008;14(6):363-8.
89. Modun D, Music I, Katalinic V, Salamunic I, Boban M. Comparison of protective effects of catechin applied in vitro and in vivo on ischemia-reperfusion injury in the isolated rat hearts. *Croat Med J* 2003;44(6):690-6.
90. Mokni M, Limam F, Elkahoui S, Amri M, Aouani E. Strong cardioprotective effect of resveratrol, a red wine polyphenol, on isolated rat hearts after ischemia/reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys* 2007;457(1):1-6.
91. Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, Obad A, et al. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis* 2008;197(1):250-6.
92. Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999;27(1-2):160-9.
93. Binsack R, Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, White CR, Darley-Usmar V, et al. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(3):434-43.
94. Korkina LG, Afanas'ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol* 1997;38:151-63.
95. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74(4):418-25.
96. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232(1):164-8.
97. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200(2):248-54.
98. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91(3C):31S-38S.
99. Pataki T, Bak I, Kovacs P, Bagchi D, Das DK, Tosaki A. Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *Am J Clin Nutr* 2002;75(5):894-9.

100. Fantinelli JC, Schinella G, Cingolani HE, Mosca SM. Effects of different fractions of a red wine non-alcoholic extract on ischemia-reperfusion injury. *Life Sci* 2005;76(23):2721-33.
101. Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31(6):1289-97.
102. Sato M, Ray PS, Maulik G, Maulik N, Engelman RM, Bertelli AA, et al. Myocardial protection with red wine extract. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35(2):263-8.
103. Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Effect of Ethanol on Red Wine Tannin - Protein (BSA) Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997;45(8):3148-3151.
104. Sadilova E, Carle R, Stintzing FC. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(12):1461-1471.
105. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239(1):70-6.
106. Singleton VL RJ, Jr. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 1965;16:144-158.
107. Sun B R-S. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998;46:4267-4274.
108. Amerine MA, Ough CS. Methods for analysis of must and wines. Cap.7. Phenolic compounds 1980.
109. Amerine MA, Ough, C.S. Methods for analysis of musts and wines. 1980.
110. Kramling TE, Singleton, V.L. An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1969;20:86-92.
111. Ribereau-Gayon P, Stonestreet E. Determination of anthocyanins in red wine. *Bull Soc Chim Fr* 1965;9:2649-52.
112. Boban M, Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Salamunic I, et al. Red wine induced modulation of vascular function: separating the role of polyphenols, ethanol, and urates. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47(5):695-701.

113. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J Agric Food Chem* 2000;48(2):220-30.
114. Alvarez E, Campos-Toimil M, Justiniano-Basaran H, Lugnier C, Orallo F. Study of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by (-)-epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. *Br J Pharmacol* 2006;147(3):269-80.
115. Komasa N, Lugnier C, Stoclet JC. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1991;104(2):495-503.
116. Tanaka Y, Yamaki F, Koike K, Toro L. New insights into the intracellular mechanisms by which PGI₂ analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-protein mediated-activation of MaxiK channel. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2004;2(3):257-65.
117. Hu S, Kim HS. Activation of K⁺ channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur J Pharmacol* 1993;230(2):215-21.
118. Yamaki F, Kaga M, Horinouchi T, Tanaka H, Koike K, Shigenobu K, et al. MaxiK channel-mediated relaxation of guinea-pig aorta following stimulation of IP receptor with beraprost via cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2001;364(6):538-50.
119. Fukuta H, Koshita M, Yamamoto Y, Suzuki H. Inhibition of the endothelium-dependent relaxation by 18beta-glycyrrhetic acid in the guinea-pig aorta. *Jpn J Physiol* 1999;49(3):267-74.
120. Yajima K, Nishiyama M, Yamamoto Y, Suzuki H. Inhibition of endothelium-dependent hyperpolarization by endothelial prostanoids in guinea-pig coronary artery. *Br J Pharmacol* 1999;126(1):1-10.
121. Hoffman JI. Maximal coronary flow and the concept of coronary vascular reserve. *Circulation* 1984;70(2):153-9.
122. Lopez-Velez M, Martinez-Martinez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43(3):233-44.
123. Chen WP, Su MJ, Hung LM. In vitro electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy of resveratrol, a red wine antioxidant. *Eur J Pharmacol* 2007;554(2-3):196-204.

124. Ralay Ranaivo H, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols induce hypotension, and decrease cardiac reactivity and infarct size in rats: involvement of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 2004;142(4):671-8.
125. Bhat KPL, Kosmeder JW, 2nd, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antioxid Redox Signal* 2001;3(6):1041-64.
126. Qiu Y, Rizvi A, Tang XL, Manchikalapudi S, Takano H, Jadoon AK, et al. Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 2):H2931-6.
127. Beckman JS. Ischaemic injury mediator. *Nature* 1990;345(6270):27-8.
128. Sumeray MS, Rees DD, Yellon DM. Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32(1):35-42.
129. Koretsune Y, Marban E. Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: relative roles of $[Ca^{2+}]_i$ elevation and ATP depletion. *Am J Physiol* 1990;258(1 Pt 2):H9-16.
130. Wallace CH, Baczko I, Jones L, Fercho M, Light PE. Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols. *Br J Pharmacol* 2006;149(6):657-65.
131. Satoh H. Sino-atrial nodal cells of mammalian hearts: ionic currents and gene expression of pacemaker ionic channels. *J Smooth Muscle Res* 2003;39(5):175-93.
132. Bernier M, Hearse DJ, Manning AS. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1986;58(3):331-40.
133. Woodward B, Zakaria MN. Effect of some free radical scavengers on reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17(5):485-93.
134. Liew R, Stagg MA, MacLeod KT, Collins P. The red wine polyphenol, resveratrol, exerts acute direct actions on guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 2005;519(1-2):1-8.

10. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja: 21. listopada 1975. godine, Jajce.

Obrazovanje

Škola za zdravstvene tehničare, Medvedgradska 55., Zagreb, 1990. – 1994. godine.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru, doktor medicine, 1997. – 2003. godine.

Medicinski fakultet u Sveučilišta u Splitu, poslijediplomski studij iz Temeljnih i kliničkih znanosti, 2005. – 2007. godine.

Iskustvo u nastavi

Znanstveni novak – asistent, Katedra za farmakologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru, 2004. –

Sudjelovanje u projektima

Izvantjelesno očuvanje srca, znanstvenoistraživački projekt (0216012) – suradnik

Kardiovaskularni učinci vina i njegovih sastojaka (216-2160547-0537) – suradnik

Sudjelovanje na kongresima

Kongres epidemiologa Bosne i Hercegovine, Neum, 1999. godine – poster.

4. hrvatski kongres farmakologa s međunarodnim sudjelovanjem, Split, 2004. godine.

Replacing animal use in teaching in Balkan University, Beograd, 2005. godine.

5. hrvatski kongres farmakologa i 2. kongres fiziologa s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, 2007. godine – poster.

Profesionalno iskustvo

Laborant, Opća bolnica Jajce, 1995. – 1997. godine.

Pripravnički staž, Opća bolnica Jajce, 2003. – 2004. godine.

Znanstveni novak – asistent, Katedra za farmakologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru, 2004 –

Specijalizant Kliničke farmakologije i toksikologije, Klinička bolnica Mostar, 2007. –

Članstvo u znanstvenim i strukovnim organizacijama

Hrvatsko društvo farmakologa

Popis radova citiranih u Current Contents:

1. **Brizić, I.**, Modun, D., Vuković, J., Budimir, D., Katalinić, V., and Boban, M. 2009. Differences in Vasodilatory Response to Red Wine in Rat and Guinea Pig Aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*.
2. Mudnić, I., Modun, D., **Brizić, I.**, Vuković, J., Generalić, I., Katalinić, V., Bilušić, T., Ljubenković, I., and Boban, M. 2009. Cardiovascular effects in vitro of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca*, L.) leaves. *Phytomedicine*.
3. Lukšić, B., **Brizić, I.**, Lang Balija, M., Modun, D., Čulić, V., Halassy, B., Salamunić, I., and Boban, M. 2008. Dose dependent effects of standardized nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) venom on parameters of cardiac function in isolated rat heart. *Comparative Biochemistry & Physiology. Toxicology & Pharmacology: Cbp* 147:434-440.
4. Modun, D., Musić, I., Vuković, J., **Brizić, I.**, Katalinić, V., Obad, A., Palada, I., Dujčić, Z., and Boban, M. 2008. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis* 197:250-256.
5. Boban, M., Modun, D., Musić, I., Vuković, J., **Brizić, I.**, Salamunić, I., Obad, A., Palada, I., and Dujčić, Z. 2006. Red wine induced modulation of vascular function: separating the role of polyphenols, ethanol, and urates. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 47:695-701.