

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Goran S. Janković

**ISPITIVANJE MEHANIZMA
VAZODILATATORNOG DEJSTVA
(-)-EPIKATEHINA I PROCIJANIDINA B2 NA
IZOLOVANOJ UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ
ARTERIJI I VENI SAFENI ČOVEKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Goran S. Janković

**MECHANISMS UNDERLYING THE
VASORELAXANT EFFECT OF (-)-EPICATECHIN
AND PROCYANIDIN B2 ON THE HUMAN
INTERNAL MAMMARY ARTERY AND HUMAN
SAPHENOUS VEIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakologiju, Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

MENTOR:

Dr Aleksandra Novaković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Slađana Šobajić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Nina Japundžić Žigon, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr Nataša Bogavac, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

U Beogradu, _____

Zahvalnica i posveta

Kao prvo, veliku i iskrenu zahvalnost želim da izrazim svom mentoru *prof. dr Aleksandri Novaković* na podršci tokom studija, te na konkretnim i korisnim savetima prilikom izrade doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegici *Mariji Marinko*, koja me je bezrezervno podržavala tokom izrade doktorske disertacije. Hvala joj ogromno na divnoj dugogodišnjoj saradnji.

Takođe, zahvalnost dugujem i članovima komisije na trudu koji su uložili za pregledavanje disertacije i konstruktivnim savetima koji su doprineli poboljšanju kvaliteta ove disertacije.

I na kraju, ali ne po važnosti već naprotiv, veliku zahvalnost dugujem svojoj budućoj supruzi *Milici* na ogromnom razumevanju i moralnoj podršci tokom izrade ove disertacije. Ona me je i više nego motivisala da put istraživanja na doktorskim studijama privedem uspešno kraju. Ovom predivnom biću posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

Ono što nikada ne bi trebali zaboraviti je neizmerna ljubav, pažnja i podrška koju smo dobijali od roditelja. Zato želim da jedno ogromo HVALA na svemu kažem roditeljima *Vukici* i *Savi*.

Ispitivanje mehanizma vazodilatatornog dejstva (-)-epikatehina i procijanidina B2 na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka

SAŽETAK

Dugotrajan i umeren unos namirnica bogatih polifenolima je u obrnutoj korelaciji sa rizikom od razvoja ateroskleroze. *In vitro*, na animalnim modelima, kao i u kratkoročnim kliničkim studijama, pokazano je da antiaterogenom delovanju flavanola značajno doprinose antioksidativni i antiinflamatorni efekat, kao i pozitivan uticaj na endotelnu funkciju. Pored toga, značajnu ulogu u kardioprotektivnom efektu flavanola ima i vazorelaksantno delovanje, pokazano na više tipova animalnih krvnih sudova.

Cilj ove studije bio je da se ispita mehanizam vazorelaksantnog dejstva dva flavanola, (-)-epikatehina i procijanidina B2 na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni.

Neiskorišćeni segmenti ispitivanih krvnih sudova uzimani su od pacijenata tokom bajpas operacija. Ispitivanje je rađeno u kupatilu za izolovane organe. Preparati sa i bez endotela prekontrahovani su fenilefrinom nakon čega su konstruisane koncentracijski-zavisne krive relaksacije sa ili bez prisustva različitih blokatora/inhibitora ili njihovih kombinacija.

Naši rezultati su pokazali da (-)-epikatehin i procijanidin B2 prouzrokuju snažnu koncentracijski-zavisnu relaksaciju ispitivanih krvnih sudova. Delovanje (-)-epikatehina je endotel-nezavisno, a efekat procijanidina B2 u značajnoj meri zavisan od prisustva intaktnog endotela i aktivacije azot-monoksid (NO)/ciklični gvanozin monofosfatnog (cGMP) puta. Različiti tipovi kalijumovih (K^+) kanala, i to voltažno zavisni (K_V), ATP-zavisni (K_{ATP}) i Ca^{2+} -zavisni (K_{Ca}) su uključeni u mehanizam dejstva (-)-epikatehina i procijanidina B2. Vazorelaksantnom delovanju obe supstance značajno doprinosi i uticaj na promet ekstra- i intracelularnog Ca^{2+} .

S obzirom da funkcionalno stanje endotela i glatkih mišićnih ćelija značajno utiče na postoperativnu prohodnost graftova, primena (-)-epikatehina i procijanidina B2, čije kardioprotektivno dejstvo uključuje poboljšanje endotelne funkcije i vazorelaksantno dejstvo, može imati veoma značajnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja.

Ključne reči: flavanoli, (-)-epikatehin, procijanidin B2, vazorelaksacija, humana unutrašnja torakalna arterija, humana vena safena, NO, K^+ kanali, promet Ca^{2+}

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

Mechanisms underlying the vasorelaxant effect of (-)-epicatechin and procyanidin B2 on human internal thoracic artery and human saphenous vein

ABSTRACT

It has been observed a strong negative correlation between long-term and moderate intake of polyphenol-rich foods and the atherosclerosis development. The various animal models, *in vitro* assays and short-term clinical studies have demonstrated flavanols antiatherogenic activity owing to their antioxidant, anti-inflammatory and endothelial protective function. Certainly, vasorelaxant activities, documented on several types of blood vessels of animal origin, greatly contribute to their cardioprotective effects.

The principal aim of this study was to investigate the mechanism of vasorelaxant effect of (-)-epicatechin and procyanidin B2 on isolated human internal thoracic artery and human saphenous vein.

Discarded segments of the internal thoracic artery and saphenous vein were collected from patients undergoing coronary artery bypass grafting. The investigation was performed in an isolated organ bath. The preparations with and without endothelium were precontracted with phenylephrine, followed by construction of concentration-response curves in the presence or absence of different blockers/inhibitors or their combinations.

Our results showed that (-)-epicatechin and procyanidin B2 cause a strong concentration-dependent relaxation of the examined blood vessels. The action of (-)-epicatechin is endothelium-independent, and the effect of procyanidin B2 is significantly dependent on the presence of intact endothelium and activation of the nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway. Different types of potassium (K^+) channels, voltage-gated (K_V), ATP-gated (K_{ATP}) and Ca^{2+} -gated (K_{Ca}) are involved in the mechanism of action of (-)-epicatechin and procyanidin B2. The vasorelaxant effect of both substances is significantly contributed by the influence on the turnover of extra- and intracellular Ca^{2+} .

Given that the functional state of the endothelium and smooth muscle cells significantly affects the postoperative grafts patency, using (-)-epicatechin and procyanidin B2, whose cardioprotective effect includes improvement of endothelial function and vasorelaxant effect, could play a very significant role in the prevention of cardiovascular disease

Key words: flavanols, (-)-epicatechin, procyanidin B2, vasorelaxation, human internal thoracic artery, human saphenous vein, nitric oxide, potassium channels, calcium turnover.

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmacology

SADRŽAJ

UVOD.....	1
ATEROSKLEROZA.....	1
Patofiziologija.....	3
Kardiovaskularna oboljenja kao posledica ateroskleroze.....	2
ISHEMIJSKA BOLEST SRCA	2
<i>Stabilna angina</i>	<i>2</i>
<i>Akutni koronarni sindrom</i>	<i>2</i>
BOLEST PERIFERNIH ARTERIJA	2
ATEROSKLEROZA BAJPAS GRAFTOVA	3
Prevenција ateroskleroze i uloga polifenola	4
POLIFENOLI.....	4
FLAVONOIDI	5
FLAVANOLI.....	6
Kliničke studije sa namirnima bogatim flavanolima	7
(-)-EPIKATEHIN.....	7
Najznačajniji izvori	8
Farmakokinetika.....	8
Biološki efekti.....	9
<i>Antioksidativni efekat</i>	<i>9</i>
<i>Antiinflamatorni efekat.....</i>	<i>10</i>
<i>Antiaterogeni efekat</i>	<i>11</i>
<i>Uticaj na glikemijski status</i>	<i>12</i>
<i>Antiagregacioni efekat</i>	<i>12</i>
<i>Antihipertenzivni efekat</i>	<i>13</i>
<i>Uticaj na endotelnu (dis)funkciju.....</i>	<i>13</i>
<i>Vazodilatatorno delovanje</i>	<i>13</i>
PROCIJANIDIN B2	14
Najznačajniji izvori	14
Farmakoinetika.....	14
Biološki efekti.....	15
<i>Antioksidativni efekat</i>	<i>16</i>

<i>Antiinflamatorni efekat</i>	16
<i>Antiaterogeni efekat</i>	17
<i>Antiagregacioni efekat</i>	17
<i>Antihipertenzivni efekat</i>	17
<i>Vazodilatatorno delovanje</i>	18
MEHANIZMI VAZODILATACIJE JEDINJENJA DOBIJENIH IZ BILJAKA	18
MEHANIZMI VAZODILATACIJE	19
Relaksacija posredovana faktorima poreklom iz endotela	20
AZOT MONOKSID	20
<i>Produkcija i oslobađanje NO</i>	20
<i>Mehanizam relaksacije posredovan NO</i>	20
PROSTACIKLIN	21
ENDOTEL-ZAVISNI HIPERPOLARIŠUĆI FAKTOR	21
Regulacija tonusa uticajem na promet Ca^{2+} u glatkoj muskulaturi	21
Regulacija tonusa uticajem na K^+ kanale krvnih sudova	22
KLASIFIKACIJA K^+ KANALA	22
<i>Voltažno-zavisni K^+ kanali (K_V)</i>	23
<i>Ca^{2+}-zavisni K^+ kanali (K_{Ca})</i>	24
<i>Ulazno-ispravljački K^+ kanali (K_{IR}) i ATP-zavisni K^+ kanali (K_{ATP})</i>	25
HUMANI BAJPAS GRAFTOVI KAO MODEL ZA ISPITIVANJE VAZORELAKSANTNOG DELOVANJA	25
CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
MATERIJAL I METODE	29
PRIPREMA TKIVA	30
EKSPERIMENTALNI PROTOKOL	30
STATISTIČKA ANALIZA	31
EKSPERIMENTALNE SUPSTANCE	32
REZULTATI	33
VAZODILATATORNO DEJSTO (-)-EPIKATEHINA	34
Efekat (-)-epikatehina na izolovanoj humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji prekontrahovanoj fenilefrinom	34
Ispitivanje mehanizma vazodilatatornog dejstva (-)-epikatehina na izolovanoj humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji	34

<i>Uticaj različiti blokatora K^+ kanala na relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije i vene savene prekontrahonu fenilefrinom</i>	35
<i>Efekat (-)-epikatehina na influks ekstracelularnog Ca^{2+} u glatke mišićne ćelije</i>	39
<i>Efekat (-)-epikatehina na oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} u glatkim mišićnim ćelijama</i>	41
VAZODILATATORNO DEJSTVO PROCIJANIDINA B2	42
Efekat procijanidina B2 na izolovanoj humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji prekontrahovanoj fenilefrinom	42
Ispitivanje mehanizma vazodilatatornog dejstva prociajnidina B2 na izolovanoj humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji	42
<i>Uloga različitih komponenti cGMP puta i prostaciklina u relaksaciji unutrašnje torakalne arterije i vene safene prouzrokovanoj procijanidinom B2</i>	43
<i>Uticaj različiti blokatora K^+ kanala na relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije i vene savene prekontrahonu fenilefrinom</i>	47
<i>Efekat procijanidina B2 na oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} u glatkim mišićnim ćelijama</i>	52
<i>Efekat procijanidina B2 na efluksestracelularnog Ca^{2+} u glatke mišićne ćelije</i>	52
DISKUSIJA	56
VAZODILATATORNI EFEKAT (-)-EPIKATEHINA	57
VAZODILATATORNI EFEKAT PROCIJANIDINA B2	62
OSNOVNE RAZLIKE U VAZODILATATORNOM DEJSTVU (-)-EPIKATEHINA I PROCIJANIDINA B2 NA HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKANOJ ARTERIJI	67
ZAKLJUČCI	69
LITERATURA	70

UVOD

Bolesti srca i krvnih sudova su već decenijama unazad vodeći uzrok obolevanja, radne nesposobnosti, i prevremene smrtnosti (pre 65. godine), kako u razvijenim zemljama, tako i u onima u razvoju. Na početku 20. veka od kardiovaskularnih bolesti umirao je tek svaki 10 stanovnik, da bi se na početku 21. veka, usled nove faze tzv. „epidemiološke tranzicije“, taj broj povećao za 30% (WHO, 2020). Kao jedan od najznačajnijih uzroka razvoja ovih bolesti je patološki proces koji se naziva ateroskleroza.

ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je difuzno oboljenje arterijskih krvnih sudova koje zahvata sva vaskularna korita i karakteriše se zadebljanjem i otvrdnućem arterijskog zida. Primarno nastaje u intimi abdominalne aorte, njenim velikim i širokim ograncima, arterijama za donje ekstremitete, kao i koronarnim i cerebralnim arterijama (Schaftenaar i sar., 2016).

Patofiziologija

Ateroskleroza započinje oštećenjem endotela, kojem doprinosi više faktora rizika: hiperlipidemija, hipertenzija, pušenje, dijabetes, homocisteinemija, infekcije. Na mestu oštećenja dolazi do ulaska proteina iz plazme, naročito apoproteina B iz lipoproteinskih čestica male gustine (LDL, engl. *low-density lipoprotein*), te njihovog nagomilavanja u subendotelnom prostoru, gde podležu oksidaciji pod uticajem slobodnih kiseoničnih radikala (Faxon i sar., 2004). U daljem procesu dolazi do oslobađanja hemotaksičnih citokina koji privlače monocite iz plazme, dok endotelne ćelije aktiviraju adhezijske mehanizme (povećana ekspresija adhezivnih molekula kao što su vaskularni adhezivni molekul (VCAM-1, engl. *vascular cell adhesion molecule-1*), intracelularni adhezivni molekul (ICAM-1, engl. *intercellular adhesion molecule-1*) i E-selektin, što dovodi do značajne regrutacije i migracije monocita i T-limfocita u subendotelni prostor. Monociti se pod uticajem faktora stimulacije kolonija pretvaraju u makrofage, koje putem odgovarajućih receptora nakupljaju oksidovani LDL u sebi, pretvarajući se u penaste ćelije (Kujundžić i sar., 2003; Faxon i sar., 2004). Preuzimanje oksidovanog LDL u makrofage se odvija putem LDL-receptora, ali i preko posebnih "receptora-hvatača" ("*scavenger receptors*") koji za pomenute čestice imaju veoma veliki afinitet.

Na mestu oštećenja endotela smanjena je sinteza prostaciklina, što rezultira smanjenom vazodilatacijom i pojačanim nakupljanjem i agregacijom trombocita, koji luče tromboksan A2 i trombocitni faktor rasta (PDGF, engl. *platelet derived growth factor*). Ovaj faktor, uz još neke faktore rasta iz aktiviranih makrofaga, podstiče migraciju glatkih mišićnih ćelija iz medije u intimu, i njihovu proliferaciju. Dodatno, smanjena je sinteza još jednog dilatatornog agensa u endotelu, azot monoksida (NO), čime je još više potencirano dejstvo endotelina i tromboksana A2, kao vazokonstriktornih faktora. Napredovanjem procesa, broj penastih ćelija i količina slobodnih lipidnih čestica se rapidno uvećava, što ima za posledicu suženje lumena krvnog suda. Masne pruge (nakupine glatkih mišićnih ćelija, penastih ćelija i vezivnog tkiva) predstavljaju rani stupanj razvoja ateroskleroze, i u slučaju obnavljanja integriteta i funkcije endotela, ovaj proces može biti reverzibilan (Faxon i sar., 2004).

Međutim, ako se oštećenje endotela kontinuirano nastavi (faktori koji uzrokuju oštećenje su trajno/često prisutni), a dislipidemija, naročito hiperholesterolemija, ne popravi, patološki process postaje ireverzibilnog karaktera. Naime, dolazi do apoptoze penastih ćelija i oslobađanja faktora koji podstiču dalju proliferaciju glatko mišićnih ćelija i fibroblasta, koji u obliku kape prekrivaju lipidno jezgro. Pod uticajem faktora rasta, posebno transformišućeg faktora rasta-β (TGF-β, engl. *transforming growth factor*), u glatkim mišićnim ćelijama počinje sinteza kolagena, elastina i proteoglikana. Time prvobitno nastala lipidna struktura, sastavljena od penastih ćelija, postaje fibrolipidna, odnosno nastaje aterom ili plak, koji dalje može i kalcifikovati. Danas se zna da za kliničke komplikacije ateroskleroze nije toliko važna veličina ateroma, već njegov sastav. Mali ateromi se uglavnom sastoje od lipida i penastih ćelija, te imaju tanku vezivnu "kapu" koja je manje otporna na mehaničke pritiske, nestabilna

je pa lakše puca. Za razliku od njih, relativno veliki ateromi imaju deblju i čvršću "kapu" i sadrže manje lipida, stabilni su i retko pucaju. Čini se da su glavni uzrok pucanja kape nestabilnih ateroma metaloproteinaze (kolagenaze, elastaze) koje izlučuju makrofage pod dejstvom T limfocita (Faxon i sar., 2004).

Kardiovaskularna oboljenja kao posledica ateroskleroze

ISHEMIJSKA BOLEST SRCA

Ishemijsku bolest srca karakteriše nesklad između količine kiseonika koja se doprema cirkulacijom u miokard i njegove potrebe za kiseonikom. Najčešći uzrok ove bolesti je ateroskleroza jedne ili više epikardnih koronarnih arterija. Glavne kliničke manifestacije ishemijske bolesti srca su:

- stabilna angina pectoris (hronični klinički tok) i
- akutni koronarni sindrom – (AKS) (akutni klinički tok), koji obuhvata AKS sa ST elevacijom (STEMI infarkt) i AKS bez ST elevacije (NSTEMI infarkt i napad nestabilne angine).

Stabilna angina pectoris

Stabilna angina pectoris je klinički sindrom za koji je karakterističan anginozni bol koji traje 3-5 min, javlja se retrosternalno, širi se u grudi, vrat i levu ruku, i manifestuje se stezanjem i pritiskom ujednačenog intenziteta. Anginozni bol se javlja za vreme fizičkog napora ili emocionalnog stresa, i prolazi nakon odmora ili nitroglicerina datog sublingvalno. Patoanatomski supstrat stabilne angine je čvrst i stabilan aterosklerotski plak koji sužava koronarne arterije, pa one nisu u stanju da vazodilatacijom omoguće dovoljnu količinu kiseonika u uslovima povećanog zahteva. Faktori rizika za razvoj stabilne angine su identični onima već pomenutim u patogenezi ateroskleroze. U ciljeve lečenja, pored smanjivanja učestalosti ili potpunog nestanka simptoma, spadaju i prevencija pojave infarkta i smrtnog ishoda (Fox i sar., 2006).

Akutni koronarni sindrom

AKS je manifestacija ateroskleroze kojoj obično prethodi akutna tromboza, izazvana rupturom ili erozijom aterosklerotskog plaka, sa pratećom vazokonstrikcijom ili bez nje, uzrokujući iznenadno i kritično smanjenje u koronarnom protoku krvi. Uzroci aktivacije plaka su multifaktorijalni, uključujući građu i geometriju plaka, kao i lokalne i sistemske faktore. Centralno mesto u nastanku napada nestabilne angine pectoris ima formiranje neokluzivnog tromba usled fisure ili rupture aterosklerotskog plaka. Pacijent se žali na tipične anginozne tegobe, koje se javljaju u miru ili pri minimalnom naporu, traju 15 do 20 minuta. Fizički nalaz je, uglavnom, neupadljiv, ali se mogu javiti znaci slični onima opisanim u stabilnoj angini (Rang i sar., 2016).

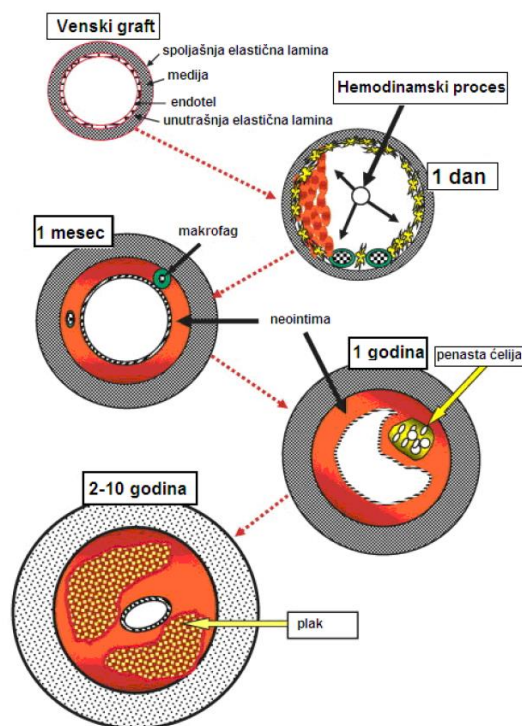
Prilikom potpune okluzije koronarne arterije trombom, dolazi do ireverzibilne ishemijske koja prelazi u nekrozu miokarda i klinički se manifestacije kao akutni infarkt miokarda sa trajnim oštećenjem srčanog mišića. Razlikujemo infarkt miokarda sa i bez ST elevacije, a diferencijalna dijagnoza se zasniva na izgledu EKG-a. (Rang i sar., 2016).

BOLEST PERIFERNIH ARTERIJA

Bolest perifernih arterija predstavlja razvoj ateroskleroze krvnih sudova donjih ekstremiteta sa posledičnom ishemijskom. Može se javiti u blažem obliku, i biti asimptomatska, ili se manifestovati u vidu intermitentnih klaudikacija. Teži oblik periferne vaskularne bolesti uzrokuje bol u mirovanju i atrofiju kože ekstremiteta, gubitak dlakavosti, cijanozu, ishemijske ulkuse i gangrenu (AHA, 2019).

ATEROSKLEROZA BAJPAS GRAFTOVA

Dva krvna suda koja se prevashodno koriste za autokoronarnu bajpas operaciju su humana unutrašnja torakalna arterija i humana vena safena. Arterijski graftovi imaju dugoročniju prohodnost u odnosu na venske. Histopatološke studije u 18% slučajeva pokazuju promene u venskom graftu odmah nakon operativnog lečenja (akutna tromboza), a u 20-50% slučajeva nakon 5 godina javljaju se značajne aterosklerotske promene (Dacey i sar., 2011; Vural i sar., 2001). U oko 40% slučajeva nakon 10 godina od operativnog zahvata venski graft je potpuno okludiran, i kod još 30% njih je ugrožen protok (Goldman i sar., 2004; Vural i sar., 2001). Kod venskog grafta aterosklerotske lezije su nestabilnije i podložne su pucanju, u njima se razvija veći tenzivni stres u odnosu na arterijski plak (Slika 1).



Slika 1. Ateroskleroza venskog grafta

Različito ponašanje unutrašnje torakalne arterije i vene safene u postoperativnom toku direktna je posledica njihove različite lokalizacije i fiziološke uloge, drugačije anatomske i histološke građe, i različite reaktivnosti na vazoaktivne supstance. Poznato je da je vena, u fiziološkim uslovima, uvek izložena nižem pritisku u odnosu na arteriju. Venski graft se u arterijskom toku mora adaptirati na novonastale hemodinamske uslove, što neminovno vodi njegovim bržim morfološkim promenama.

Jedan od ključnih razloga odsustva značajnih aterosklerotskih promena u arterijskom graftu, bar neko vreme nakon operativnog zahvata, je njegova histološka građa. Mišićni i elastično-mišićni delovi unutrašnje torakalne arterije su naročito odgovorni za hemodinamsku adaptabilnost, odnosno spazam koji se javlja u stanju smanjenog protoka krvi, ali i za sposobnost povećanja protoka u uslovima povećanih metaboličkih potreba srčanog mišića (Acar i sar., 1991; Sims i Gavin, 1990). Sa druge strane, vena safena je graft mišićnog tipa i samim tim podložna je intimalnoj hiperplaziji u dužem vremenskom periodu (Higami i sar., 2000; Louagie i sar., 1992).

Otpornost unutrašnje torakalne arterije razvoju ateroskleroze se objašnjava i njenim molekularnim i celularnim svojstvima, i to značajnom endotelnom produkcijom NO i signifikantno većom sintezom prostaciklina od vene safene (He i sar., 1986). Osim vazodilatatorne i antiagregacione funkcije, prostaciklin smanjuje proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i pozitivno utiče na metabolizam

holesterola (Deanfield i sar., 2007; Ku i sar., 1991). Takođe, mora se uzeti u obzir da tokom procesa preparisanja, prezervacije i pripreme vene safene dolazi do značajnog oštećenja protektivne funkcije endotela, što dodatno umanjuje oslobađanje relaksantnih faktora i povećava sklonost ka razvoju ateroskleroze (Fitzgibbon i sar., 1996).

Prevenција ateroskleroze i uloga polifenola

Prevenција ateroskleroze se deli na primarnu i sekundarnu. Primarna prevenција podrazumeva smanjenje ili potpuno eliminisanje faktora rizika za njen nastanak usvajanjem zdravih životnih navika (pravilna ishrana, fizička aktivnost, prestanak pušenja) ili pravilnim tretiranjem već postojećih bolesti koji su faktori rizika (hipertenzija, dijabetes, hiperlipidemije). Sekundarna prevenција se odnosi na zaštitu pacijenta od komplikacija njene manifestacije kakva je koronarna insuficijencija, a uključuje smanjenje faktora rizika promenom životnih navika (iako oštećenje već postoji), kao i uvođenje nekih lekova koji poboljšavaju prognozu (aspirin, inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACEi), statini).

Pre više od dve decenije, u okviru fenomena nazvanog "*francuski paradoks*", uočeno je da dugotrajno i umereno konzumiranje crvenog vina daje pozitivne efekte u preveniji ateroskleroze i njenih kliničkih manifestacija. Naime, brojni radovi i sprovedene epidemiološke studije su ukazale na postojanje jake negativne korelacije između povećane konzumacije crvenog vina i incidence koronarne bolesti srca ili ukupnog kardiovaskularnog rizika (Renaud i sar., 1992; Klatsky i Armstrong, 1993; Grønbaeck i sar., 1995). Istraživanja pokazuju da se ovo protektivno dejstvo crvenog vina delimično ostvaruje antioksidativnim delovanjem polifenola, kao njegovih esencijalnih sastojaka, ali i modulacijom endotelne funkcije i supresijom faktora koji uzrokuju nastanak ateroskleroze (Corder, 2002). Važan segment delovanja polifenola u preveniji ateroskleroze je i njihovo vazodilatatorno delovanje, čiji mehanizam nije još u potpunosti razjašnjen.

POLIFENOLI

Polifenoli predstavljaju sekundarne biljne metabolite koji nisu uključeni u normalan rast i razvoj biljke, ali su važni za njen opstanak i interakciju sa okolinom (Downing i sar., 2017). Imaju ulogu u zaštiti biljaka od ultravioletnog (UV) zračenja, patogena i fizioloških oštećenja. Veoma često daju ukus i boju hranjivim namirnicama u kojima se nalaze (Chuang i McIntosh, 2011; Middleton i sar., 2000).

Najznačajniji izvori polifenola su karanfilić (15,188 mg polifenola/100 g), sušena nana (11,96 mg/100 g) i zvezdasti anis (5,46 mg/100 g). U značajnim količinama se nalaze i u kakao prahu (3,5 mg/100 g), crnoj ribizli (758 µg/100g), kupinama i jagodama (oko 250 µg/100 g) (Manach i sar., 2010).

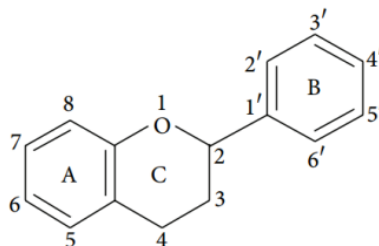
Jedan od najznačajnijih bioloških efekata polifenola je njihovo antioksidativno delovanje, koje je i do 5 puta veće od onoga koje poseduju vitamin C i E (Dixon i Pasinetti, 2010; Jorgensen, 1995). Antioksidativni efekat polifenola može biti direktan, izražen kao neposredno hvatanje slobodnih kiseoničnih radikala (Fenercioglu i sar., 2001; Fuhrman i Aviram, 2001) ili indirektan, koji se ostvaruje potenciranjem ćelijskog sistema detoksifikacije ili inhibiranjem enzima implementiranih u genuz slobodnih radikala (Samanta i sar., 2011). Drugi važni efekti polifenola su: antiagregacijsko, hipolipemično delovanje, poboljšavanje endotelne funkcije i stabilizacija aterosklerotskog plaka (Pandey i Rizvi, 2009). Pokazuju vazodilatatorni, endotel-zavisni i endotel-nezavisni efekat (Saponara i sar., 2006), kao i antihipertenzivno delovanje (Machha i Mustafa, 2005; Peng i sar., 2005; Sarr i sar., 2006). Na osnovu velikog broja sprovedenih studija možemo reći da polifenoli imaju značajnu ulogu u zaštiti našeg organizma od razvoja maligniteta, kardiovaskularnih i neuroloških oboljenja (Fröjdö i sar, 2008).

Glavna hemijska karakteristika polifenola je prisustvo hidroksilnih grupa na aromatičnim prstenovima. Na osnovu broja fenolnih prstenova i načina na koji se oni međusobno povezuju, mogu se podeliti u dve velike grupe: flavonoide i neflavonoidne polifenole.

FLAVONOIDI

Flavonoidi su biljni pigmenti, sintetisani iz fenilalanina. Uglavnom se uočavaju kao boje cvetnih latica i fluoresciraju pod UV svetlom (Havsteen, 2002). U biljkama imaju ulogu antioksidanasa, antimikrobnih agenasa, fotoreceptora, vizuelnih atraktora ili repelenata.

Predstavljaju najobimniju klasu polifenola, i do danas je otkriveno više od 6000 različitih predstavnika. Odlikuju se C6-C3-C6 strukturom, sastoje se od dva aromatična prstena (prstenovi A i B) povezana oksigenizovanim heterociklom (prsten C) (Slika 2).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida.

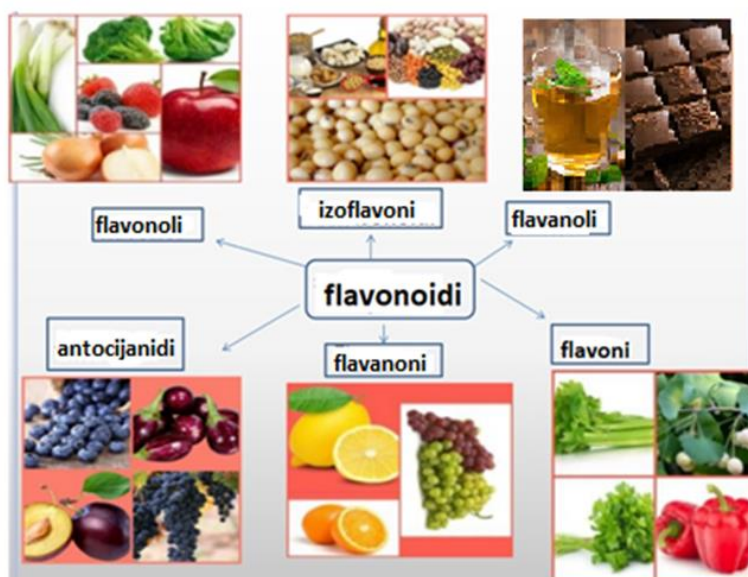
Od opisane centralne strukture polaze različiti bočni lanci, čija struktura i pozicija omogućava podelu flavonoida u nekoliko podgrupa (Slika 3):

- 1) flavoni (apigenin, luteolin) koji se nalaze u ceralijama;
- 2) flavonoli (kemferol, kvercetin) koji se nalaze u luku, brokolima i praziluku;
- 3) izoflavoni (diadzein, genistein) koji se nalaze u soji i produktima od soje;
- 4) flavanoni/flavanoli (hesperin, naringenin, astilbin, engeletin) koji se nalaze u citrusnom voću, origanu i vinu;
- 5) flavanoli (katehin, (-)-epikatehin, epigalokatehin..) koji se nalaze u zelenom čaju, crvenom vinu i čokoladi.
- 6) antocijanidi (pelargonidin, cianidin, andmalvidin), koji se nalaze u crvenom vinu i bobičastom voću.

Prosečan dnevni unos flavonoida je oko 21,2 mg, a najzastupljeniji flavonoid u ishrani je kvercetin (15,4 mg/dan) (Lin, 2007). Međutim, najčešće je procena dnevnog unosa ovih jedinjenja vrlo teška i neprecizna, s obzirom da postoji velika varijabilnost u sadržaju flavonoida u različitim namirnicama, pa čak i u istim namirnicama uzgajanim i pripremanim na drugačiji način (Manach i sar, 2004). Unos određenih podtipova i specifičnih flavonoida može biti značajniji od ukupne količine unetih flavonoida (Hollman i Katan, 1999). Pored toga, postoje i velike razlike u bioraspoloživosti različitih predstavnika i njihovih oblika.

Flavonoidi se povezuju sa širokim spektrom efekata povoljnih za zdravlje i danas se smatraju veoma važnim komponentama u raznovrsnim nutritivnim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim proizvodima. Literaturni podaci svedoče o antioksidativnom, antiinflamatornom, antialergijskom, antikarcinogenom i posebno, kardioprotektivnom dejstvu (Middleton i sar., 1998). Antioksidativnim i antiinflamatornim delovanjem flavonoida potencijalno se može objasniti i ispoljavanje vazodilatatornog, antitrombotičkog, antiapoptotskog i antiaterogenog efekta (Dell'Agli i sar., 2004; Pérez-Vizcaíno i sar., 2002; Schroeter i sar., 2006), što je direktno povezano sa smanjenjem kardiovaskularnog rizika. Pokazana je inverzna korelacija između ishrane obogaćene flavonoidima i stope smrtnosti usled ishemijske bolesti srca kod starijih muškaraca (Hertog i sar, 1994), ukupne

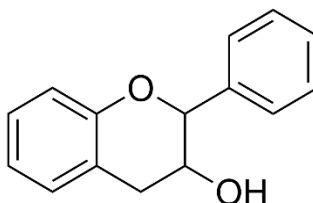
koncentracije holesterola u plazmi kod žena u postmenopauzi (Arai i sar., 2000), ili incidence demencije kod starijih (Commengenes i sar., 2000).



Slika 3. Shematski prikaz podele flavonoida i njihovih najznačajnijih izvora.

FLAVANOLI

Najobimnija i najzastupljenija klasa monomernih flavanola su flavan-3-oli, koji se karakterišu C6-C3-C6 strukturom i hidroksilnom grupom na položaju tri prstena C (Slika 4).



Slika 4. Osnovna struktura flavanola

Katehin, (-)-epikatehin, galokatehin, epigalokatehin i njihovi estri sa galnom kiselinom su najznačajniji predstavnici ove grupe. Pored monomernih oblika, flavan-3-ole nalazimo i u formi oligomera (od dimera do dekamera) ili polimera (od dekamera na dalje). Oligomerni oblici formirani isključivo međusobnim povezivanjem katehinskih ili (-)-epikatehinskih jedinica C4-C8 ili C4-C6 vezom nazivaju se procijanidini. U zavisnosti od tipa veze između monomernih jedinica i njihovog broja, procijanidini mogu biti dosta raznovrsni i veoma različitih serija (npr. A, B, C). Najčešći predstavnici su dimeri serije B, a najmanje zastupljeni procijanidini serije A. Čak i manje promene u izomerizaciji, tipu vezivanja monomera i stepenu polimerizacije mogu imati veliki uticaj na biološko delovanje ovih molekula. Dodatno, metabolizam može dovesti do stvaranja sekundarnih jedinjenja koja mogu biti odgovorna za posmatranu biološku aktivnost.

Namirnice bogate flavanolima su neprženi kakao prah (261 mg/100 g), crna čokolada (129 mg/100 g), zeleni čaj (65 mg/100 ml), jabuke (36 mg/100 g) i crveno vino (*Cabernet Sauvignon*) (18 mg/100 ml) (Aprotosoie i sar., 2006).

Pored antioksidativnih svojstava, flavanoli deluju i na snižavanje krvnog pritiska, poseduju antiagregacioni, antiinflamatorni i antiaterogeni efekat, poboljšavaju endotelnu funkciju i lipidni status, i pokazuju antikarcinogena svojstva (Aprotosoie i sar., 2006).

U okviru evropske epidemiološke prospektivne studije pokazana je jaka inverzna korelacija između povećanog unosa crne čokolade i rizika od pojave fatalnih kardiovaskularnih događaja (Buijse i sar., 2006). Peters i sar. (2001) sprovodeći meta analizu 17 studija u kojima je ispitivana povezanost unosa zelenog čaja i pojave ishemijske bolesti srca, pokazuju da se unosom 3 šolje crnog ili zelenog čaja dnevno smanjuje rizik pojave ishemijske bolesti srca za 11%.

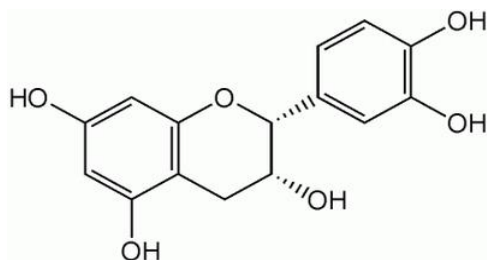
Kliničke studije sa namirnicama bogatim flavanolima

U nekoliko manjih i kratkoročnih kliničkih studija praćen je efekat namirnica koje obiluju flavanolima (kakao praha, crne čokolade ili zelenog čaja) na endotelnu funkciju, krvni pritisak, lipidni i glikemijski status i aktivnost trombocita, i pritom su dobijeni sledeći rezultati:

- ✓ Studije sprovedene na zdravim i osobama sa hiperlipidemijom pokazale su da kakao prah konzumiran svakodnevno tokom 4 nedelje redukuje nivo LDL holesterola i povećava nivo lipoproteinskih čestica velike gustine (HDL, engl. *high-density lipoprotein*) kod obe populacije (Baba i sar., 2007).
- ✓ Konzumiranje 100 g crne čokolade dnevno (88 mg flavanola), tokom 15 dana, smanjuje insulinsku rezistenciju nezavisno od prisustva komorbiditeta kao što je hipertenzija (Arranz i sar., 2013).
- ✓ Grassi i sar. (2005) pokazuju da je unos crne, ali ne i mlečne bele čokolade, povezan sa smanjenjem sistolnog krvnog pritiska kod zdravih osoba i hipertenzivnih pacijenata sa dijabetesom kao komorbiditetom. Taubert i sar. (2007), proučavajući efekat uključivanja crne čokolade bogate flavanolima kao dela uobičajene ishrane kod pacijenata sa prvim stadijumom hipertenzije tokom 18 nedelja, pokazuju smanjenje sistolnog pritiska u proseku za $2,9 \pm 1,6$ mm Hg, a dijastolnog za $1,9 \pm 1,0$ mm Hg.
- ✓ Geleijnse i sar. (2003) u Rotterdam studiji, gde je ispitivan razvoj ateroskleroze aorte putem rentgenskog merenja kalcifikovanih depozita u njenom abdominalnom delu, pokazuju da je kod dobrovoljaca koji su konzumirali 125-250 mL (1-2 čaše) zelenog čaja dnevno, verovatnoća pojave plaka bila duplo manja. U slučaju konzumiranja dvostruko veće količine čaja dnevno (više od četiri šolje), verovatnoća se smanjila za oko 70%.
- ✓ Nakaci i sar. (2000), u svojoj studiji sa preko 9000 ispitanika, pokazuju da konzumiranje 10 čaša zelenog čaja dnevno smanjuje kardiovaskularni mortalitet kod oba pola.

(-)-EPIKATEHIN

Jedan od najznačajnijih flavanola, koji je bio i predmet našeg istraživanja, je (-)-epikatehin. Strukturno, sastoji se od dva aromatična prstena povezana oksigenovanim heterociklom sa 4-hidroksil grupom (Slika 5).



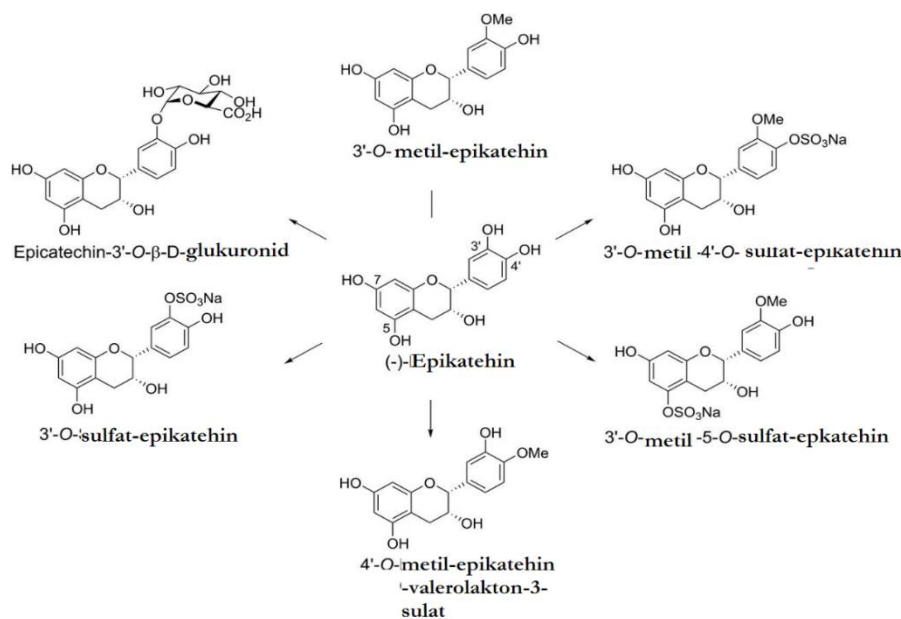
Slika 5. Struktura (-)-epikatehina.

Najznačajniji izvori

(-)-Epikatehin je prisutan u kakau (>35%), zelenom čaju (28%), jabukama (24%) i crnom vinu (15%) (Sies i sar., 2012). U neprženom zrnu kakaa, (-)-epikatehin predstavlja najzastupljeniji flavanoid (oko 2/3 svih flavanoida). Pečenjem zrna, ovaj flavanol delimično epimerizuje u (-)-katehin, međutim i pored toga (-)-epikatehin ostaje dominantni flavanol i u svim kakao proizvodima (Kirch i sar., 2014).

Farmakokinetika

Kao i kod ostalih bioaktivnih molekula, aktivnost flavanola na molekularnom nivou u ciljnom tkivu u velikoj meri zavisi od njihove bioraspoloživosti. Direktno je zavisna od stepena apsorpcije, intenziteta presistenskog metabolizma, volumena distribucije i puteva ekskrecije. Imajući ovo u vidu, od velike je važnosti proučiti farmakokinetički profil monomernih i oligomernih flavanola. Podaci iz animalnih i kliničkih studija pokazuju da su monomerni oblici dosta stabilni tokom tranzita kroz kiselu sredinu želuca (Rios i sar., 2002; Spencer i sar., 2000). Pri *per os* aplikovanju ekstrakta semena grožđa, koji je sadržao (-)-epikatehin, ali i njegove oligomere, u tankom i debelom crevu pacova detektovano je prisustvo samo monomera i odgovarajućih dimernih oblika (Tsang i sar., 2005).



Slika 6. Metabolički produkti (-)-epikatehina.

U tankom crevu, (-)-epikatehin podleže glukuronidaciji i, delimično, metilovanju (Kuhnle i sar., 2000; Piskula i Terao, 1998). U jetri se nastavlja dalja glukuronidacija, metilacija i sulfatacija, tako da se finalno u sistemske cirkulaciji čak 90% aplikovanog (-)-epikatehina nalazi u vidu konjugovanog metabolita, a samo jedan mali deo u vidu početnog jedinjenja. Najznačajniji metabolit detektovan u plazmi je 4'-O-metilepikatehin-7-β-D-glukuronid (Piskula i Terao, 1998) (Slika 6). Prema nekim autorima, glukuronidacija (-)-epikatehina je od izuzetne važnosti, jer samo u toj formi se ovaj flavanol može transportovati do ciljnog mesta. U suprotnom, ostaje vezan za albumine plazme, što predstavlja neaktivnu formu. Dokazano je i da prolazi krvno-moždanu barijeru, pa se posledično distribuira i u moždano tkivo (Faria i sar., 2008). To čini pomoću P-glikoproteina (PgP) i transportera za organske katjone. Ukupna koncentracija (C_{TOT}) u plazmi aplikovanog (-)-epikatehina, zajedno sa metabolitima, je od nekoliko desetina do nekoliko stotina μM (Baba i sar., 2000; Holt i sar., 2002; Rein i sar., 2000). U skladu sa tim je i rezultat jedne studije da dva sata nakon unosa 40 g, odnosno 80 g crne čokolade, koncentracija (-)-epikatehina u plazmi iznosi 0,35 mM, odnosno 0,68 mM (Richelle i sar., 1999). Ovaj monomerni flavanol se na kraju ekskretuje putem urina i žuči.

Biološki efekti

Postoje podaci koji pokazuju da potencijalni kardioprotektivni efekti hrane bogate flavanolima potiču, bar delom, od (-)-epikatehina (Gómez-Guzmán i sar., 2012; Schroeter i sar., 2006). Na animalnim modelima i u *in vitro* studijama demonstrirano je da izolovani (-)-epikatehin prevenira i usporava razvoj hipertenzije, poboljšava endotelnu funkciju, smanjuje vaskularni oksidativni stres i proinflamatorni status, kao i insulinsku rezistenciju (Galleano i sar., 2013; Gómez-Guzmán i sar., 2012; Litterio i sar., 2012; Vazquez-Prieto i sar., 2012).

Do sada, prema našim saznanjima, nije sprovedena nijedna dugoročna klinička studija u kojoj bi se ispitao preventivni uticaj (-)-epikatehina na stopu javljanja velikih kardiovaskularnih događaja. U nekoliko kratkoročnih studija, pokazana je pozitivna korelacija između koncentracije (-)-epikatehina u krvi ispitanika i dilatacije brahijalne arterije posredovane povećanim protokom krvi, koja predstavlja direktni pokazatelj endotelne funkcije (Schroeter i sar., 2006). Takođe, u studijama koje su ispitivale uticaj izolovanog (-)-epikatehina na insulinsku rezistenciju kod ispitanika sa normalnom i prekomernom telesnom masom pokazano je povećanje postprandijalnog katabolizma lipida, i to indukcijom β-oksidacije. Ispitanici su pokazali značajno niže postprandijalne koncentracije glukoze i triglicerida, a efekat je bio izraženiji kod ispitanika sa prekomernom telesnom masom (Dower i sar., 2015; Gutierrez-Salmean i sar., 2014).

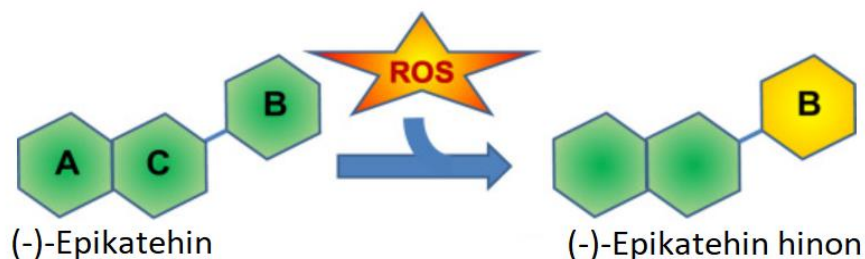
Mehanizmi kojima (-)-epikatehin ostvaruje svoje kardiorotektivno dejstvo su mnogobrojni i biće detaljnije objašnjeni u daljem tekstu.

Antioksidativni efekat

Reaktivne kiseonične vrste (ROS, engl. *reactive oxygen species*) su jako važne u fiziologiji aerobnih organizama. Aktivno učestvuju u normalnoj regulaciji ćelijskih signala, uključujući i one signale involvirane u adaptivne odgovore (Brigelius-Flohe i Flohe, 2011; Forman i sar., 2010). Veća i nekontrolisana proizvodnja slobodnih radikala vodi značajnoj oksidaciji ćelijskih komponenti i ireverzibilnom oštećenju ćelija/tkiva, što predstavlja mehanizam patofiziološkog procesa mnogih bolesti. (-)-Epikatehin, i njegovi oligomeri, pokazuju antioksidativnu sposobnost kako *in vitro*, tako i *in vivo* imajući u vidu da: (i) imaju takve hemijske strukture koje im omogućavaju direktno stupanje u reakciju sa slobodnim radikalima, pri čemu se generišu znatno manje reaktivni proizvodi (Bors i sar., 1990; Rice-Evans, 2001); (ii) suplementacija namirnicama bogatih flavanolima smanjuje nivo oksidacije u mnogim organima i tkivima (Koga i sar., 1999; Orozco i sar., 2003); (iii) je pokazan značajan benefit flavanola u patološkim stanjima koja su direktno povezana sa oksidativim stresom (Fraga i sar., 2005). Svoj antioksidativni efekat (-)-epikatehin može ostvariti direktno - hvatanjem

slobodnih radikala ili heliranjem metala koji pokreću slobodno radikalsku reakciju, ili indirektno - uticajem na faktore koji su fundamentalni za proizvodnju ovih aktivnih vrsta.

Mehanizam direktne neutralizacije slobodnih radikala (*scavenging*) (-)-epikatehinom može se prikazati sledećom reakcijom prikazanom na Slici 7:



Slika 7. Direktna neutralizacija slobodnih radikala (-)-epikatehinom.

Literaturni podaci pokazuju da su hidroksilne grupe ključna strukturna karakteristika flavanola odgovorna za neposrednu neutralizaciju ROS, pri čemu je antioksidativna aktivnost direktno proporcionalna broju i rasporedu hidroksilnih grupa (Jung i sar., 2005).

Flavanoli pokazuju i sposobnost maskiranja (heliranja) metalnih jona i tako onemogućavaju njihovo prooksidativno delovanje (Moridani i sar., 2003). Ovakav mehanizam antioksidativne zaštite je dosta karakterističan za (-)-epikatehin (Lotito i sar., 2000).

In vivo, direktan antioksidativni efekat značajan je i moguć samo u tkivima u kojima (-)-epikatehin dostiže koncentracije koje su reda nekoliko stotina μM , kao što je slučaj, pre svega, u digestivnom traktu. Uzimajući u obzir redukcionni potencijal (-)-epikatehina sa jedne, i nisku μM koncentraciju koju postiže u krvi i, pogotovo, u tkivima, ovaj flavanol *in vivo* najverovatnije ostvaruje indirektno antioksidativno delovanje. Ono se manifestuje u vidu inhibicije faktorom nekroze tumora α (TNF- α , engl. *tumor necrosis factor*) - indukovane aktivacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze, ili u vidu povećanja genske ekspresije za nuklearni faktor eritriod 2 (Nrf 2), što bi posledično dovelo do većeg stvaranja određenih antioksidativnih enzima (NADPH:hinon reduktaze, hem oksigenaze i gama-glutamilcistein sintetaze) (Gomez-Guzman i sar., 2012; Koppenol i sar., 1992).

Antiinflamatorni efekat

Inflamacija je multifaktorijalni ćelijski odgovor koji je veoma važan za održavanje homeostaze u organizmu. Ona se javlja kada postoji oštećenje tkiva ili u slučaju prisustva patogena i drugih iritirajućih agenasa. U toku inflamacije dolazi do drastičnog porasta polimorfonuklearnih leukocita i monocita i oslobađanja inflamatornih medijatora, kao što su prostaglandini i citokini. Inflamacija se dešava lokalno, u pogođenom tkivu, i u idealnom slučaju vodi ka potpunom oporavku. Međutim, u određenim slučajevima, usled neadekvatne regulacije, dolazi do širenja inflamacije i oštećenja susednih tkiva što vodi razvoju hroničnih inflamatornih bolesti. Svoj antiinflamatorni efekat (-)-epikatehin ostvaruje posredstvom sledećih mehanizama:

Direktna inhibicija sinteze medijatora inflamacije. Primećeno je da postoji direktna korelacija između povećanog dijetarnog unosa flavanola i niske koncentracije cisteinil leukotriena i prostaglandina u plazmi (Mehrinfar i Frishman, 2008). Ovo je od strane autora objašnjeno uticajem flavanola na metabolizam arahidonske kiseline. U skladu sa tim su i rezultati *in vitro* studije Mao i sar. (2000), u kojoj je pokazana sposobnost (-)-epikatehina da dozno-zavisno inhibira humanu rekombinantnu 5-lipoksigenazu, fundamentalni enzim u sintezi leukotriena.

Dejstvo na transkripcione faktore. Opšte je poznato da je nuklearni faktor kapa B (NF-kB) izuzetno bitan za normalno ćelijsko funkcionisanje. Reguliše ekspresiju velikih grupacija gena, uključujući one koji kodiraju proteine uključene u urođeni imunitet, zapaljenje i regulisanje

preživljavanja ćelija. Iako od centralnog značaja za veliki broj fizioloških procesa u ćeliji (Pahl, 1999), njegova hronična, nekontrolisana i permanentna aktivacija je usko povezana sa razvojem inflamacije i kancera (Karin i sar., 2005; Prasad i sar., 2010). U citoplazmi je prisutan u inaktivnom obliku, zahvaljujući inhibitoru NF- κ B (I κ B) koji maskira vezivno mesto za DNK, i tako onemogućava prelazak NF- κ B u svoju aktivnu formu, kao i transport u jedro. Indukcija aktivnosti NF- κ B se vrši izlaganjem ćelije citokinima (npr. TNF- α) ili oksidativnom stresu. Za aktivaciju NF- κ B neophodna je fosforilacija I κ B koja se odigrava pod uticajem odgovarajuće kinaze (Jung i sar., 2008). Pokazano je da (-)-epikatehin na različite načine može da ometa delovanje pomenutog faktora NF- κ B:

- 1) svojim antioksidativnim efektom;
- 2) direktnom interakcijom sa transkripcionim faktorom. Pokazano je da (-)-epikatehin direktno intereaguje sa NF- κ B, i time ometa njegovo vezivanje za promotorsku sekvencu DNK (Mackenzie i sar., 2004). Pored direktne interakcije, za ostvarivanje antiinflamatornog efekta (-)-epikatehina, značajna je i inhibicija fosforilacije I κ B (Mackenzie i sar., 2004). Na ovaj način smanjuje se ekspresiju gena za citokine (npr. interleukina-5 (IL-5), interleukina-2 (IL-2), TGF- β), a time i klonalna proliferaciju T i B limfocita;
- 3) indirektno, inhibicijom odgovarajućih kinaza kao što je mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK). U MAPK spadaju ekstracelularnim signalom regulisana kinaza (ERK), c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) i p38, i koji su samo jedna karika u lancu prenosa signala od receptora na površini ćelije do gena u nukleusu. Fosforilacijom ovi enzimi (inače spadaju u serin-treonin kinaze) bivaju aktivirani i njihov osnovni zadatak je fosforilacija nishodnih proteina, koji su obično transkripcioni faktori (NF- κ B ili cAMP-odgovorni element vezujući protein (CREB, engl. *cAMP response element binding protein*)). U skladu sa tim, (-)-epikatehin pokazuje sposobnost direktne inhibicije ERK signalnog puta, kako *in vitro*, tako i *in vivo* (Lee i sar., 2010), ili sprečava njegovu aktivaciju ometajući vezivanje i prenos signala TNF- α u T limfocitima (Jurkat), Hoćkinovom limfomu ili adipocitima (Mackenzie i sar., 2004; Mackenzie i Oteiza, 2006; Vazquez-Prieto i sar., 2012).

Antiaterogeni efekat

Već je naglašeno da rezultati odgovarajućih epidemioloških i kliničkih studija sugerišu postojanje jake negativne korelacije između povećane potrošnje flavanola i razvoja aterosklerotskih kardiovaskularnih bolesti ili stope mortaliteta posle preležanog velikog kardiovaskularnog događaja (Arts i sar., 2001; Janszki i sar. 2009).

Rezultati dobijeni na animalnim modelima ateroskleroze direktno koreliraju sa ovim rezultatima, ali i ukazuju na mogući mehanizam antiaterogenog efekta (-)-epikatehina. U studiji Miura i sar. (2001), u kojoj su apolipoprotein E (ApoE)-deficijenti miševi hranjeni visoko kaloričnom dijetom tokom 14 nedelja sa ili bez dodatka katehina ((-)-epikatehina, (-)-epikatehin galata i epigalokatehin galata), prosečan razvoj aterosklerotskih plakova bio je 23% manji u arterijama miševa čija je ishrana bila obogaćena katehinima. Dodatno, koncentracija LDL holesterola u ovoj grupi miševa bila je prosečno manja za 27%, i pokazano je manje preuzimanje istih u aktivirane makrofage (Miura i sar., 2001). Doprinos (-)-epikatehina ovom rezultatu dobija na značaju ako se u obzir uzme i nalaz studije Morrisona i sar. (2013), u kojoj su miševi tokom 16 nedelja bili izloženi placebo (kontrolna grupa) ili (-)-epikatehinu. Površina aterosklerotskih lezija je bila značajno manja u grupi tretiranoj (-)-epikatehinom. Interesantno je da grupe nisu ispoljile značajnu razliku u ukupnoj koncentraciji holesterola, pa autori ove studije smatraju da mehanizam antiaterogenog delovanja (-)-epikatehina verovatno ne uključuje njegov uticaj na lipidni profil (Morrison i sar., 2013). Aucler i sar. (2008) antiaterogeni efekat (-)-epikatehina objašnjavaju njegovim inhibitornim uticajem na gensku ekspresiju pojedinih regulatornih proteina, kao što su adhezivni molekuli na površini monocita (kasni antigen-4, CD40 i CD36) ili endotelnim ćelijama (P-selektin i VCAM). Pored ovih, predloženi su i drugi mehanizmi antiaterogenog delovanja (-)-epikatehina, kao što su inhibicija pankreasne holesterol

esteraze i vezivanje za žučne kiseline, kao i smanjena proliferacija glatko mišićnih ćelija (Ngamukote i sar., 2011).

Uticaj na glikemijski status

Beta-ćelije pankreasa održavaju normoglikemiju putem glukozom-stimulisane sekrecije insulina. Disfunkcija β -ćelija, prisutna u dijabetesu, rezultira smanjenom i slabo kontrolisanom sekrecijom insulina i, konačno, apoptozom ovih ćelija. Tretmani kojima se povećava funkcionalni broj β -ćelija mogu biti korisni u lečenju dijabetesa. Prethodne studije sugerišu da flavanoli kakaa štite i/ili poboljšavaju funkciju β -ćelija, utičući na njihovo veće preživljavanje, veću sekreciju insulina i proliferaciju (Fernandez-Millan i sar., 2015; Jalila i sar., 2008; Martin i sar., 2013). Mehanizam hipoglikemijskog efekta izolovanog (-)-epikatehina proučavan je na nekoliko animalnih modela dijabetesa i u *in vitro* studijama.

Značajno poboljšanje osetljivosti tkiva na insulin u sprovedenim studijama na miševima, autori objašnjavaju sposobnošću (-)-epikatehina da smanji ekspresiju gena za protein tirozin fosfatazu 1B, koja ometa intracelularni prenos signala pri aktivaciji insulinskog receptora (Cremonini i sar., 2016), ili da aktivira adenzin monofosfat-zavisnu kinazu (AMPK), visoko senzitivni molekul za pokretanje energetskog procesa u ćelijama (Si i sar. 2011). Aktivacijom AMPK, ne samo da se ostvaruje potencijalni benefiitni efekat na glikemijski status, već i na lipidni profil, imajući u vidu da ovaj enzim promovise i β -oksidaciju masnih kiselina (Steinberg i sar., 2009), a inhibira sintezu holesterola fosforilacijom 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktaze (Samari i sar., 1998).

Dodatno, u *in vitro* studiji na izolovanim β -ćelijama pankreasa pacova, pokazano je (-)-epikatehin inhibira ekspresiju inducibilne NO sintaze (iNOS), i posledično oštećenje ćelija nitritima (Kim i sar. 2004). Konačno, u studiji Rowleya i sar. (2017), na izolovanim humanim β -ćelijama, (-)-epikatehin je značajno stimulisao sekreciju insulina, i to indukcijom transkripcije gena za respiratorni kompleks III, IV i V na unutrašnjoj membrani mitohondrija, čime je ubrzana oksidativna fosforilacija i sinteza adenzin trifosfata (ATP).

Antiagregacioni efekat

Tromboza je patološki proces intravaskularnog zgrušavanja krvi u odsustvu krvarenja. Hemostaza počinje vazokonstrikcijom, sledi proces agregacije trombocita (formiranja trombocitnog čepa, koji primarno zatvara oštećenje), a zatim i koagulacije krvi (formiranja fibrina, potporne mreže krvnog ugruška, koji konačno zatvara oštećenje). Na kraju, dolazi do zaceljenja krvnog suda urastanjem vezivnog tkiva u krvni ugrušak i rastvaranja krvnog ugruška (fibrinolize). Pokazano je da se unosom hrane bogate flavanolima, u roku od nekoliko sati postiže značajno antiagregaciono dejstvo, slično onome postignutom primenom male doze aspirina, izraženo smanjenjem ekspresije glikoproteinskih IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptora na površini trombocita (Holt i sar., Pearson i sar., 2002; Rein i sar., 2000). Antiagregacioni efekat bio je u direktnoj korelaciji sa nivoom katehinskih metabolita u plazmi (4-O-metil-epikatehin i 3-O-metil-katehin) (Heptinstall i sar., 2006).

Mehanizam antiagregacionog delovanja flavanola još nije u potpunosti razjašnjen, mada postoji nekoliko mogućnosti, uključujući promenu u fluidnosti membrane, afinitetu receptora ili modulaciju nekoliko intracelularnih signalnih puteva. Pokazano je da (-)-epikatehin u mikromolarnim koncentracijama ima sposobnost inhibicije aktivnosti trombocitne fosfolipaze C (Piglatelli i sar., 2000). Antiagregacioni potencijal (-)-epikatehina baziran je i na njegovom antioksidativnom kapacitetu (Freedmana i sar., 2001), kao i uticaju na metabolizam arahidonske kiseline (Schramm i sar., 1999).

Antihipertenzivni efekat

Skorašnja meta-regresiona analiza (Ellinger i sar., 2012) pokazala je direktnu korelaciju između antihipertenzivnog efekta kakao praha i sadržaja (-)-epikatehina u njemu. Literaturni podaci pokazuju da se pozitivni efekti flavanola kakaa na krvni pritisak ostvaruju, uglavnom, posredstvom povećanja

bioraspoloživosti i bioaktivnosti NO (Ferri i sar., 2015), redukcijom NADPH-oksidge i smanjenjem raspoloživosti superoksidnog anjona (Fraga i sar., 2011), ili inhibicijom ekspresije i aktivnosti mRNA arginaze-2 u endotelnim ćelijama (Rimbach i sar., 2009). Ostali antihipertenzivni mehanizmi flavanola kakaa uključuju: inhibiciju stvaranja endotelina-1 (Field i sar., 2013) ili modulaciju sistema renin-angiotenzin-aldosteron (Grassia i sar. 2010).

Antihipertenzivni efekat izolovanog (-)-epikatehina, je, do sada, dokazan samo na animalnim modelima hipertenzije (Galleano i sar. 2013; Litterio i sar., 2012), ali ne i u kliničkim studijama.

Uticaj na endotelnu (dis)funkciju

Vazodilatacija indukovana povećanim protokom (FMD, engl. *flow mediated dilatation*) krvi je jedna od najboljih pokazatelja endotelne funkcije, i značajno je smanjena kod koronarne arterijske bolesti ili ateroskleroze (Moens i sar., 2005), a identifikovana je i kao nezavisni prediktor budućih kardiovaskularnih događaja (Inaba i sar., 2010). U studiji Balzera i sar. (2008) dokazano je povećanje ovog parametra nekoliko sati posle aplikovanja kakao praha, a u slučaju redovnog uzimanja ovog značajnog izvora (-)-epikatehina, pozitivan efekat je bio dugoročan. U kratkoročnoj kliničkoj studiji sprovedenoj od strane Schroetera i sar. (2006), neposredno je dokazano da benefitetni efekat kakao praha na endotelnu funkciju, bar delimično, zavisi od sadržaja (-)-epikatehina, pošto je promena FMD kod ispitanika bila u jakoj pozitivnoj korelaciji sa promenom koncentracije (-)-epikatehina u plazmi. Jedan od najvažnijih mehanizama pozitivnog uticaja (-)-epikatehina na endotelnu funkciju je indukcija proizvodnje NO ili sprečavanje endotelinom-indukovane aktivacije NADPH oksidge (Fisher i sar. 2003; Gomez-Guzman i sar., 2003).

Vazodilatatorno delovanje

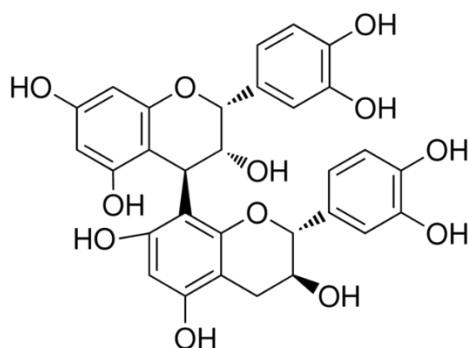
Mehanizam vazorelaksantog delovanja (-)-epikatehina bio je predmet istraživanja nekoliko *in vitro* studija. Primarno je ispitivan na izolovanim segmentima aorte i mezenterične arterije pacova (Duarte i sar., 1993; Huang i sar., 1998). U ovim, i nekoliko *in vitro* studija koje su potom usledile, (-)-epikatehin pokazuje i endotel-zavisnu (koja je bila značajno umanjena uklanjanjem endotela) i endotel-nezavisnu relaksaciju (Aggio i sar., 2013; Chen i sar., 2000; Duarte i sar., 1993; Huang i sar., 1999; Huang i sar., 2000). U studiji Huang i sar. (1999) dilatatorni efekat (-)-epikatehina na mezenteričnoj arteriji pacova bio je delimično umanjn primenom inhibitora endotelne NOS (eNOS) ili uklanjanjem endotela, što ukazuje da značajnu ulogu u relaksaciji ima aktivacija puta NO/cGMP. Dodatno, (-)-epikatehinom-indukovana dilatacija u endotel-intaktnim krvnim sudovima može biti posredovana i NO-zavisnom aktivacijom iberiotoksin-senzitivnih K⁺ kanala (Huang i sar., 1999). Intenzivno je izučavan i mehanizam kojim (-)-epikatehin indukuje aktivnost eNOS, pa je tako pokazana i Ca²⁺-zavisna i Ca²⁺-nezavisna aktivacija (posredovana aktivacijom protein kinaza A (PKA)/fosfatidilinozitol-3 kinaza (PI3K) signalnim putem) (Ramirez-Sanchez i sar., 2010).

Sa druge strane, pokazano je da endotel-nezavisna relaksacija indukovana (-)-epikatehinom može biti posredovana blokadom voltažno-zavisnih Ca²⁺ kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Huang i sar., 1998).

Međutim, mehanizam kojim (-)-epikatehin izaziva vazodilataciju, posebno humanih krvnih sudova, još uvek nije jasno definisan.

PROCIJANIDIN B2

Procijanidini su oligomeri koji se sastoje od kovalentno vezanih monomernih flavan-3-ola ((-)-epikatehin i (+)-katehin), obično vezanih 4→6 ili 4→8 vezom. Najobimnija su subklasa flavonoida prisutna u prirodi (Downing i sar., 2017), a jedan od najznačajnijih procijanidina je procijanidin B2 (Slika 8).



Slika 8. Struktura procijanidina B2

Najznačajniji izvori

Koncentracije procijanidina su više u voću koje je nezrelo, često su gorki pa daju taninski ukus crnom vinu, a gorak ukus kakau (Santos-Buelga i Scalbert., 2000). U poređenju sa ostalim izvorima, semena grožđa imaju najveći sadržaj ukupnih procijanidina ($3532,3 \pm 105,8$ mg/100 g) i procijanidinskih dimera po jedinici mase ($417,3 \pm 4,8$ mg/100 g) (Zhang i sar., 2016). Dnevni unos procijanidina može varirati od 10 mg do 0,5 g/dan, pri čemu je najveći unos procijanidina B1 i B2 (Zhang i sar., 2016). Namirnice najbogatije procijanidinom B2 i sadržaj ovog dimera u njima, prikazane su u Tabeli 1.

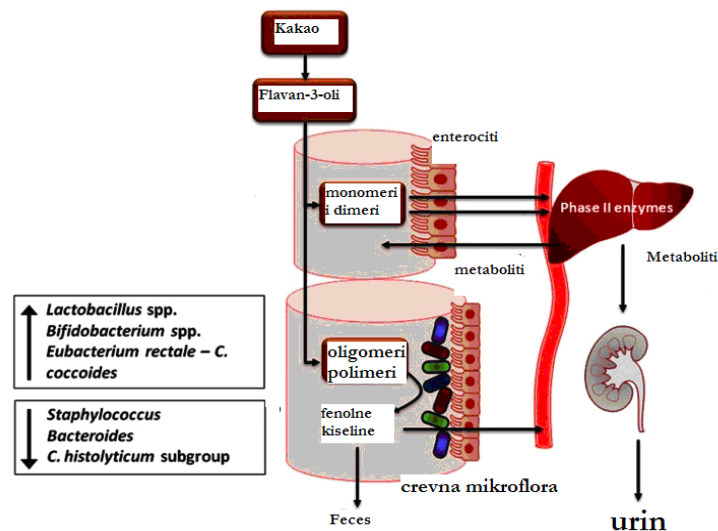
Tabela 1. Sadržaj procijanidina B2 u nekim namirnicama

Kakao prah	71,57 mg/100 g
Crna čokolada	36,50 mg/100 g
Jabuka	19,50 mg/100 g
Šljiva	5,20 mg/100 g
Crveno vino	4,50 mg/100 ml
Čaj	2,50 mg/100 ml
Kajsija	2,10 mg/100 g
Glog	1,50 mg/100 g

Farmakokinetika

Nakon *per os* primene, procijanidini su samo delimično stabilni u kiseloj sredini želuca. Oligomerni oblici sa više od 4 jedinice se izuzetno slabo resorbuju, dok se, očekivano, u najvećoj meri resorbuju dimerni oblici (Zhang i sar., 2016). U skladu sa tim su i nalazi studije Appeldoorna i sar. (2009) da su, nakon peroralnog aplikovanja kakaa ili ekstrakta semena grožđa, samo dimeri B2 (epikatehin-(4-8)-epikatehin) i B1 (epikatehin-(4-8)-katehin) (od svih oligomernih oblika) detektovani u humanoj plazmi. Apsorpcija procijanidinskih dimera u ovoj studiji iznosila je svega 5-10% apsorpcije (-)-epikatehina, ali s obzirom da je sadržaj procijanidina u hrani relativno visok, autori smatraju da i ovi oligomerni oblici mogu značajno doprineti protektivnom efektu hrane bogate flavanolima. Finalna koncentracija procijanidina B2 u plazmi (zajedno sa metabolitima), nakon unosa kakaa ili semena grožđa, je nekoliko desetina nM (Shrestha i sar., 2011). Za razliku od (-)-epikatehina, koji gotovo u potpunosti gradi glukuronide, sulfate i metil etre, ovo se ne može reći za procijanidin B2, pošto se njegovi metilovani i glukuronidovani oblici samo u malim koncentracijama detektuju u plazmi (Shrestha i sar., 2011). Upotrebom ^{14}C obeleženih procijanidina pokazano je da se 58-78% unetih oligomera izlučuje putem urina (Zhang i sar., 2016).

Oligomerni oblici koji nisu apsorbirani (procijanidini stepena polimerizacije > 4), dospevaju do debelog creva gde podležu modifikaciji od strane crevne mikroflore, stvarajući pritom jednostavne fenolne kiseline i njihove polimere čiji biološki značaj nije još u potpunosti procenjen (Rios i sar., 2000) (Slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz farmakokinetičkih puteva flavanolnih monomera i procijanidina

Biološki efekti

Procijanidinski ekstrakti različitog porekla su do sada na animalnim modelima pokazali antioksidativno i antiinflamatorno delovanje (Lu, 2000; Mackenzie i sar., 2008), inhibiciju stvaranja glikoziranih produkata (Peng i sar., 2010) i hipolipemični efekat (Quettier-Deleu i sar., 2003).

Sprovedene su i kratkoročne kliničke studije kojima su ispitivani efekti ekstrakta primorskog bora koji obiluje specifičnim procijanidinima niske molekulske mase, uključujući i procijanidin B2, kod pacijenata sa stabilnom anginom. Endotelna funkcija je procenjivana praćenjem FMD, a praćeni su i biomarkeri oksidativnog stresa i inflamacije, kao i krvni pritisak ispitanika. Dokazano je značajno poboljšanje dilatacije posredovane protokom, kao i značajno snižavanje nivoa oksidativnog stresa i krvnog pritiska u aktivnoj grupi u odnosu na placebo grupu (Enseleit i sar., 2012).

Procenjivani su i efekti primene ovog ekstrakta u periodu od 6 meseci na faktore rizika povezane sa metaboličkim sindromom. Merenjem obima struka i praćenjem nivoa glukoze utvrđeno je da statistički značajno redukuje ove parametra kod oba pola. Nivo triglicerida je, takođe, bio statistički značajno smanjen, a nivo HDL statistički značajno povećan, kod oba pola, dostigavši preporučene vrednosti u ovoj studiji (Belcaro i sar., 2013).

Pregledom literaturnih podataka nalazimo da procijanidini, a posebno procijanidin B2, ostvaruju opisana kardioprotektivna delovanja putem različitih mehanizama koja će biti detaljnije opisana u daljem tekstu.

Antioksidativni efekat

Slično (-)-epikatehinu, i različiti procijanidini svoj antioksidativni efekat ostvaruju direktnim hvatanjem slobodnih radikala, heliranjem metala, ili uticajem na enzime koji su direkto uključeni u stvaranje ovih reaktivnih vrsta.

Na bazi osnovne strukture procijanidina, uzimajući u obzir veći broj aromatičnih prstenova i hidroksilnih grupa kojima potencijalno neutrališu slobodne radikale formirajući rezonantno stabilizovane fenoksil radikale, može se reći da poseduju znatan antioksidativni potencijal. Antioksidativna aktivnost flavanola povećava se od monomera do trimera, a zatim opada od trimera ka

višim oligomerima (Hamaizu i Ilijima, 1999; Plumb i sar., 1998). Tip veze između monomera u okviru jednog oligomera utiče na antioksidativni potencijal, pri čemu dimeri sa C4-C8 vezom lakše oksiduju od dimera sa C4-C6 vezom. U skladu sa tim, pokazano je da procijanidin B2 efikasnije uklanja slobodne radikale od procijanidina B4 ili samog (-)-epikatehina (Aron, 2008). Sposobnost ekstrakta bogatog procijanidinom B2 da veoma efikasno neutrališe superoksidni anjon, ali i hidroksil radikal i peroksinitritni radikal, pokazana je u brojnim studijama (Blazso i sar.1998; Elstner i sar., 1990; Packer i sar., 1999; Virgil i sar., 1998)

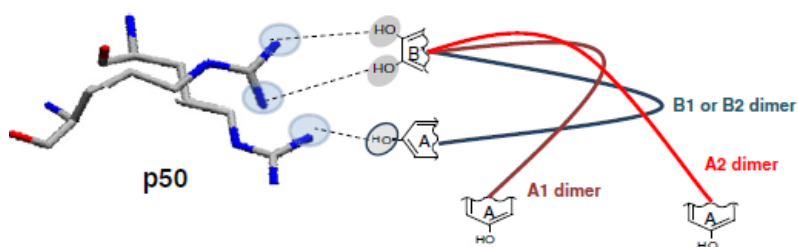
Kako je koncentracija procijanidina u tkivu dosta niska, malo je verovatno da ostvaruju direktan antioksidativni efekat, već, najverovatnije inhibiraju enzime implementirane u generisanje slobodnih radikala u organizmu (Packer i sar., 1999). Pri toj inhibiciji, primarno dolazi do interakcije prolinskih ostataka enzima i o-dihidroksilfenolne grupe procijanidina (Baxter i sar., 1998; Haslam, 1974).

Antiinflamatorni efekat

Analogno antiinflamatornim mehanizmima prikazanim kod (-)-epikatehina, procijanidin B2 svoj benefitni efekat u jednom upalnom procesu ostvaruje na više načina.

Prvo, procijanidini značajno utiču na aktivnost iNOS u makrofagama miševa. Niže koncentracije ekstrakta bogatog procijanidinom B2 (do 10 µg/mL) imaju stimulatívni efekat na iNOS, međutim primenom viših koncentracija ovog ekstrakta (50–100 µg/mL), enzim je inhibiran (Virgili i sar., 1998).

Dalje, pokazana je sposobnost stereospecifičnog vezivanja procijanidina B2 vodoničnim vezama za komponente NF-κB transkripcionog faktora, i time ometanje njegovog vezivanja za promotorsku sekvencu DNK (Slika 10) (Mackenzie i sar., 2004). Na ovaj način značajno je redukovana ekspresija gena za citokine (npr. IL-5, IL-2, TNF-α, TGF-β), a time i klonalna proliferaciju T i B limfocita.



Slika 10. Interakcija procijanidina B2 sa subjedinicama transkripcionog faktora

Konačno, jedan od najznačajnijih mehanizama kojim procijanidini, pre svega procijanidin B2, ostvaruju antiinflamatorni efekat je inhibicija aktivacije NLRP3 (engl. *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*) inflamazoma. Inflamazomi su multiproteinski intracelularni signalni kompleksi koji imaju važnu ulogu u regulaciji urođenog imuniteta i inflamatornom odgovoru. Sastoje se od prokaspaze i receptora koji prepoznaju obrazac PRR (*pattern recognition receptors*). Abnormalna aktivacija NLRP3 inflamazoma je uključena u patogenezu brojnih inflamatornih bolesti. Do stvaranja NLRP3 inflamazoma dolazi prilikom ulaska patogena, oštećenja tkiva, usled dejstva lipopolisaharidaze, prisustva reaktivnih kiseoničnih radikala ili prisustva oksidovanog LDL holesterola (Martinon i sar., 2009). Stimulisan ovim signalima, NLRP3 inflamazom katalizuje cepanje prekursora inflamatornih citokina, IL-1b i IL-18 (Hitomi i sar., 2009). Istraživanja na endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene su pokazala da procijanidin B2 dovodi do negativne regulacije genske ekspresije za NLRP3, smanjuje aktivaciju NLRP3 inflamazoma i inhibira kasniju aktivaciju kaspaze-1 i sekreciju IL-1b, indukovanu lipopolisaharidazom (Yang i sar., 2014).

Antiaterogeni efekat

Uticaj izolovanog procijanidina B2 na prevenciju ateroskleroze i njene kliničke manifestacije do sada nikada nije ispitivan u nekoj kliničkoj studiji. Caimari i sar. (2006) ispitujući efekte niskih doza ekstrakta procijanidina iz semena grožđa na lipidni profil hrčka, uočavaju znatnu redukciju akumulacije masti i poboljšavanje lipidnog profila. Kao moguće mehanizme ovih benefitnih efekata, autori navode stimulaciju beta oksidacije masnih kiselina i ciklusa glicerolipid/slobodne masne kiseline u adipoznom tkivu. Slično, Downing i sar. (2017) demonstriraju da ekstrakt procijanidina iz semena grožđa, nakon jedne nedelje primene, efikasno smanjuje serumski nivo triglicerida kod pacova hranjenih fruktozom. U ovom animalnom modelu došlo je do inhibicije lipogeneze usled nishodne regulacije dva važna faktora-*sterol regulatornog elementa vezujućeg proteina 1c* i *stearoil-koenzim A desaturaze*.

Mehanizam antiaterogenog dejstva izolovanog procijanidina B2 je bio predmet istraživanja nekoliko *in vitro* studija. Sarriá i sar. (2015) pokazuju procijanidinom B2-indukovanu ekspresiju Apo A-1 proteina na izolovanim ćelijskim kulturama, čime je objašnjen njegov efekat na povećanje HDL partikula. Dalje, dokazana je i njegova sposobnost aktivacije receptora koji se aktiviraju uz proliferaciju peroksizoma (PPAR γ , engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) (Zhang i sar., 2017), inhibicije proliferacije glatkih mišićnih ćelija inaktivacijom matriksne metaloproteinaze (Cai i sar., 2011), ili sposobnost povećanja ekspresije proapoptotskih proteina (Bad i Bak) u izolovanim monocitima/makrofagama (Chen i sar., 2006).

Antihipertenzivni efekat

Antihipertenzivno delovanje izolovanog procijanidina B2, prema našim saznanjima, za sada nije pokazano na animalnim modelima ili kliničkim studijama. Međutim u literaturi se mogu naći podaci da je antihipertenzivni efekat pokazan za nekoliko procijanidinskih ekstrakata različitog porekla na miševima i pacovima (Kim i sar., 2000; Magos i sar., 2008). Takođe, rezultati dve kratkoročne kliničke studije, u kojima je korišćen ekstrakt bogat procijanidinom B2, pokazuju značajno sniženje sistolnog krvnog pritiska, pre svega kod osoba ženskog pola (Hosseini i sar., 2001; Valls i sar., 2016).

Antiagregacioni efekat

Putter i sar. (2016) uočavaju da pri primeni 100 mg procijanidinskog ekstrakta (Pycnogenol®) dolazi do značajnog antiagregacionog efekta kod hroničnih pušača, sličnog primeni male doze aspirina. Autori smatraju da je ovaj antitrombocitni efekat procijanidinskog ekstrakta bio posredovan stimulacijom sinteze NO u endotelnim ćelijama, i posledičnom inhibicijom sinteze tromboksana A2. Mogućim antiagregacionim mehanizmima procijanidina, smatraju se i direktna inhibicija ciklooksigenaze (COX) (Tzeng i sar., 1991) ili inhibicija transporta kalcijumovih jona kroz membranu (Wang i sar., 1999).

U retkim studijama rađenim *in vitro* sa izolovanim procijanidinom B2 u plazmi humanog porekla bogatoj trombocitima, direktno je dokazana sposobnost ovog flavanola da inhibira sintezu tromboksana, 12-L-hidroksiheptadeka-5,8,10-trienolne kiseline i 12-L-hidroperoksi-5,8,10,14-eikozatetraenske kiseline (Wen-Chang i Feng-Lin, 1989).

Vazodilatatorni efekat

Kardioprotektivni efekat procijanidina se može, delom, pripisati njihovim vazodilatatornim osobinama. Prethodne *in vitro* studije, pokazale su da biljni ekstrakti bogati procijanidinima prouzrokuju endotel-zavisnu vazodilataciju različitih krvnih sudova (Aldini i sar., 2003; Kim i sar., 2000; Kwan i sar., 2005; Matsui i sar., 2009). Mehanizam ove vazodilatacije uključuje aktivaciju NO-

cGMP puta u kombinaciji sa hiperpolarizacijom. Tako na primer, procijanidini iz jabuke (Matsui i sar., 2009) i *Crataegus* ekstrakta (Kim i sar., 2000) izazivaju NO-posredovanu relaksaciju aorte pacova uz dodatnu aktivaciju tetraetilamonijum-senzitivnih K^+ . Pored toga, Kwan i sar. (2005) su pokazali da je u mehanizam relaksacije aorte i mezenterične arterije pacova uzrokovane ekstraktom lista *Apocynum venetum*, uključeno nekoliko tipova K^+ kanala. Ispitivanja mešavine procijanidina iz semena grožđa na humanim arterijama su ukazala da je za vazodilatatorno delovanje, pored NO-zavisnih mehanizama, značajna i produkcija prostaglandina (Aldini i sar., 2005). Osim toga, novije meta-analize su pokazale da ishrana ljudi bogata procijanidinima (kakao, čokolada, čaj) dovodi do poboljšanja endotelne funkcije, a samim tim i smanjenja kardiovaskularnog rizika (Ras i sar., 2011; Hooper i sar., 2012).

Međutim, upotreba biljnih ekstrakata u studijama ne dozvoljava procenu doprinosa pojedinih supstanci u ukupnom vazorelaksantnom efektu. Do sada je sprovedena samo jedna studija se čistim procijanidinom C1, koja je pokazala da ovaj procijanidin izaziva vazodilataciju aorte pacova (Buyn i sar., 2014). Do danas, nema podataka o vazorelaksantnom efektu procijanidina B2.

MEHANIZMI VAZODILATACIJE JEDINJENJA DOBIJENIH IZ BILJAKA

Luna-Vázquez i sar. (2013) su u svojoj studiji identifikovali čak 207 vazodilatatornih jedinjenja poreklom iz biljaka (uglavnom alkaloidi, terpenoidi i flavonoidi), i opisali mehanizme njihovog dejstva. Zapaženo je da se vazodilatatorni efekat značajnog broja ovih jedinjenja (oko 40%) ostvaruje posredstvom dva ili više mehanizama, pri čemu se ističu aktivacija NO/cGMP puta, blokada Ca^{2+} kanala i aktivacija K^+ kanala (Luna-Vázquez i sar., 2013). Takođe, mehanizam dejstva biljnih agenasa može zavisi od njihove koncentracije, ali i od tipa i porekla korišćenih krvnih sudova. Tako, feniletil ester kafeinske kiseline u niskim koncentracijama izaziva dilataciju aktiviranjem NO/cGMP puta, dok visoke koncentracije ovog važnog sastojka propolisa indukuju relaksantni efekat endotel-nezavisnim mehanizmima - blokadom ulaska Ca^{2+} u glatku muskulaturu ili inhibicijom oslobađanja ovog jona iz intracelularnih depoa (Cicala i sar., 2003). Sa druge strane, kumarin indukuje relaksaciju mezenterične arterije pacova blokadom voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala L-tipa, dok aortu miša relaksira posredstvom povećane produkcije NO (He i sar., 2009; Nie i sar., 2009).

Više od polovine ispitivanih biljnih jedinjenja ima vazorelaksantni mehanizam koji, barem delimično, zahteva prisustvo intaktnog endotela. Među njima je izuzetno visok procenat (98,4%) onih koji indukuju NO/cGMP put, dok je aktivacija puta prostaglandin I_2 (PGI_2)/ciklični adenozin-monofosfat (cAMP) uključena u mehanizam delovanja samo 23% biljnih agenasa (Luna-Vázquez i sar., 2013). Brojni su primeri flavonoida koji dovode do povećanja ekspresije gena za eNOS (luteolin, cinarizid) (Li i sar., 2004; Xia i sar., 2010), ili koji aktiviraju ovaj enzim (epigallocatehin galat, kvercetin i rezveratrol) (Kawakami i sar., 2011; Wang i sar., 2011).

Već je istaknuto da su važna ciljna mesta delovanja biljnih vazodilatatora i različiti tipovi K^+ kanala. U skladu sa tim, u studiji Kima i sar. (2000) je pokazano da procijanidini semena grožđa svoje relaksantno dejstvo ostvaruju aktivacijom voltažno-zavisnih K^+ kanala (K_V). Dosta je dobro proučeno delovanje polifenola na Ca^{2+} -zavisne K^+ kanale (K_{Ca}). Tako, kemferol, barem delimično, svoj vazodilatatorni efekat ostvaruje aktivacijom K_{Ca} kanala visoke provodljivosti (BK_{Ca}), a slični nalazi dobijeni su i za naringenin ili rezveratrol (Saponara i sar., 2006; Xu i sar., 2007). Sa druge strane, literaturni podaci o dejstvu polifenola na vaskularne ATP-zavisne K^+ kanale (K_{ATP}) su nešto skromniji. Ističu se radovi Jina i sar. (2007) i Zhua i sar. (2007), koji smatraju da aktivacija ovih kanala značajno doprinosi relaksantnom delovanju polifenola zelenog čaja, odnosno pinocembrina na aorti pacova.

Konačno, studije ukazuju da i uticaj na promet Ca^{2+} može biti mehanizam delovanja nekog biljnog agensa. Tako na primer, isopropil-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-hidroksipropanoat, izolovan iz crvene kadulje (*Salvia miltiorrhiza*), svoje relaksantno delovanje ostvaruje blokadom voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala L-tipa, dok euksanton inhibira oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma (Fang i sar., 2006; Wang i sar., 2008).

MEHANIZMI VAZODILATACIJE

Da bi neki agens izazvao vazokonstrikciju potrebno je da: (1) na glatkoj muskulaturi aktivira receptor spregnut sa Gq proteinom, kako bi preko povećanog stvaranja inozitol trifosfata (IP_3) indukovao oslobađanje Ca^{2+} iz intracelularnih depoa; (2) depolariše membranu i tako aktivira voltažno-zavisne Ca^{2+} kanale L-tipa; ili (3) aktivira ligand-zavisne Ca^{2+} kanale (Rang i sar., 2016). Porast intracelularne koncentracije Ca^{2+} dalje aktivira kinazu lakog lanca miozina (KLLM), što dalje izaziva fosforilaciju miozina, ili senzibilizaciju miofilamenata prema Ca^{2+} (Rang i sar., 2016).

Sa druge strane, vazorelaksacija je indukovana smanjenjem koncentracije slobodnog Ca^{2+} u glatkoj muskulaturi krvnog suda ili smanjenjem osetljivosti kontraktilnog aparata na ovaj jon. Ovo se postiže posredstvom:

1. Povećanja koncentracije drugih glasnika u glatkoj muskulaturi, kao što su cAMP ili cGMP, koji dalje uzrokuju smanjenje intracelularne koncentracije Ca^{2+} , smanjenje osetljivosti kontraktilnog aparata na Ca^{2+} ili hiperpolarizaciju;
2. Smanjenja priliva ektracelularnog Ca^{2+} , i to direktnom blokadom Ca^{2+} kanala, ili izazivanjem hiperpolarizacije glatke muskulature, koja rezultuje smanjenjem otvorenosti ovih kanala (Rang i sar., 2016).

Nekoliko osnovnih mehanizama posreduju vazorelaksantnom efektu:

- ❖ Relaksacija posredovana faktorima poreklom iz endotela;
- ❖ Regulacija tonusa uticajem na promet Ca^{2+} u glatkoj muskulaturi;
- ❖ Regulacija tonusa uticajem na K^+ kanale krvnih sudova.

Vazorelaksacija posredovana faktorima poreklom iz endotela

Endotel je kompleksan organ koji kontroliše homeostazu krvnih sudova integrišući signale između vaskularnog zida i lumena suda. U fiziološkim uslovima, on održava normalan vaskularni tonus i protok krvi sintetišući brojne faktore kao što su NO, prostaciklin, hiperpolarujuć faktor, endotelin.

NO

NO je intracelularni glasnik ćelije, smatra se regulatorom brojnih fizioloških funkcija i patoloških stanja u organizmu. Najmanji je ćelijski signalni medijator, hemijski nestabilan, kratkog poluvijeka (6-60 s), ali *in vivo* može da formira S-nitrozo jedinjenja, pa u krvi cirkuliše i u vidu S-nitrozo albumina (Božović i sar., 2007), što značajno produžava njegovu biološku aktivnost. Lipofilne je prirode, brzo difunduje kroz ćelijske membrane, lako reaguje sa sulfhidrilnim grupama biomolekula i jonima metala, što mu omogućava uticaj na brojne biološke funkcije u organizmu (Božović i sar., 2007).

Produkcija i oslobađanje NO

Nastaje pod katalitičkim dejstvom NOS, koja se nalazi u tri izoforme: neuronalna (nNOS), iNOS i eNOS. eNOS i nNOS spadaju u konstitutivne forme, dok se inducibilna indukuje u endotelnim, glatkim mišićnim, imunim ćelijama i miocitima, dejstvom citokina ili bakterijskih endotoksina. Aktivnost konstitutivnih formi NOS regulisana je nivoom intracelularnog Ca^{2+} . Za proizvodnju NO u endotelnim ćelijama, i posledičnu vazorelaksaciju, najznačajnija je eNOS.

Pored bazalne sinteze, proizvodnju NO indukuju i različiti stimulusi, fizičke i hemijske prirode. Glavni fiziološki stimulus je brz porast krvnog protoka, imajući u vidu da se tada u endotelnim ćelijama, usled povećanog pritiska smicanja, aktivira odgovarajuća serin/treonin kinaza, koja fosforiliše eNOS i time povećava njenu aktivnost. Dodatno, veliki broj endogenih i egzogenih supstanci, usled aktivacije receptora na površini endotela (adrenergičnih, serotonininskih, histaminskih, bradikininskih i

estrogenih), inicira porast intracelularne koncentracije Ca^{2+} , koji u kompleksu sa kalmodulinom aktivira eNOS (Božović i sar., 2007).

Mehanizam relaksacije posredovan NO

NO svoje delovanje uglavnom ostvaruje aktivacijom gvanilat ciklaze (GC), koja katalizuje proizvodnju cGMP-a iz gvanozin-trifosfata (GTP). cGMP aktivira protein kinazu G (PKG), koja dovodi do smanjenja intracelularne koncentracije Ca^{2+} različitim mehanizmima: indukcijom preuzimanja citosolnog Ca^{2+} u sarkoplazmatski retikulum, iniciranjem eliminacije ovog jona iz ćelije ili aktivacijom K_{Ca} kanala (Carvajal i sar., 2000; Ignarro i Kadowitz, 1998; Weisbrod i sar., 1998).

Pored toga, NO poseduje i GC-nezavisne efekte. Stimuliše Ca^{2+} -ATP-azu endoplazmatskog retikuluma (SERCA), i time preuzimanje Ca^{2+} u intracelularne depoe (Adachi i sar., 2004). Dodatno, reaguje i sa cistein tiolima, formirajući S-nitrozilirane proteine (nitrozilacija bradikininskog, muskarinskog, α_1 i AT_1 receptora), čime se menja njihova funkcija i afinitet prema odgovarajućem ligandu, i indukuje relaksacija nekim donorima NO (Aronstam i sar., 1995; Lecler i sar., 2006; Miyamoto i sar., 1997). Konačno, nekoliko autora je pokazalo da celularni mehanizmi koji posreduju NO-zavisnoj relaksaciji krvnih sudova, mogu biti i modulacija K_{ATP} , K_V i K_{Ca} kanala (Irvine i sar., 2003; Mistri i Garland, 1998; Murphi i Braiden, 1995). Svakako, aktivacija ovih kanala može biti posledica direktnog delovanja NO (Bolotina et al., 1994) ili rezultat povećanja aktivnosti GC ili PKG (Archer et al., 1994).

PROSTACIKLIN

Prostaciklin je glavni prostanoid koji proizvode endotelne ćelije. Osim što ima ulogu u inhibiciji agregacije trombocita, značajno je i njegovo relaksantno delovanje. Efekti su posredovani aktivacijom adenilat ciklaze (AC) i posledičnim povećanjem koncentracije cAMP-a u glatkoj muskulaturi (Tatteson i sar., 1977). Proizvodi se u endotelnim ćelijama kao odgovor na pulsni pritisak ili stimulatorno delovanje bradikinina, trombina, serotonina i adeninskih nukleotida. Sinteza prostaciklina započinje delovanjem fosfolipaze A2, koja oslobađa arahidonsku kiselinu iz membranskih fosfolipida, na koju zatim deluje COX endotelne ćelije. Slično NO i hiperpolarišućem faktoru, prostaciklin je lokalni (parakrini) hormon koji je efikasan samo u neposrednoj blizini ćelije koja ga oslobađa. Nestabilnost prostaciklina u cirkulaciji otežava terapijsku primenu. Brzo se razgrađuje u plazmi na biološki neaktivno jedinjenje, 6-ketoprostaglandin F (Zhou i Parker, 2019).

ENDOTEL-ZAVISNI HIPERPOLARIŠUĆI FAKTOR

Za razliku od NO/cGMP puta ili prostaciklin-zavisne relaksacije koji su dosta proučavani, priroda i mehanizam dilatacije posredovane endotel-zavisnim hiperpolarišućim faktorom (EDHF, engl. *endothelial derived hyperpolarization factor*) ostaju nepotpuno razjašnjeni. Literaturni podaci ukazuju da EDHF ima važnu ulogu u modulaciji vaskularnog tonusa arterija malog otpora. Dodatno, u endotelnoj disfunkciji, kada je NO-zavisna relaksacija smanjena, funkcija EDHF je dosta očuvana, ili čak i povećana, pa se EDHF smatra rezervnim sistemom za održavanje perfuzije tkiva u uslovima smanjene sinteze NO. Nakon stimulacije endotelnih ćelija različitim agonistima, povećava se intracelularna koncentracija Ca^{2+} , koja zatim aktivira K_{Ca} kanale niske i srednje provodljivosti (IK_{Ca} i SK_{Ca}). Nastaje hiperpolarizacija koja se putem mioendotelnih tesnih veza (engl. *myoendothelial gap junctions*) prenosi na glatku muskulaturu i indukuje relaksaciju, ili ta endotelna hiperpolarizacija predstavlja vučnu silu za ulazak Ca^{2+} u endotelne ćelije, koji indukuje proizvodnju NO i prostaciklina (Feletou i sar., 2016).

Regulacija tonusa uticajem na promet Ca^{2+} u glatkoj muskulaturi

Koncentracija intracelularnog Ca^{2+} održava se u uskom opsegu, i regulisana je kako ulaskom ekstracelularnog Ca^{2+} , putem voltažno-zavisnih Ca^{2+} -kanala L-tipa, tako i aktivnošću endoplazmatskog retikuluma. Voltažno-zavisni Ca^{2+} -kanali sadrže domene homologih sekvenci koji su organizovani u okviru jedne velike subjedinice ($\alpha 1$). Kao dodatak glavnoj subjedinici, kanali sadrže i nekoliko drugih subjedinica ($\alpha 2$, β , γ i δ). Direktnom blokadom ovih kanala, ili hiperpolarizacijom glatke muskulature, kada su kanali smanjeno aktivni, postiže se vazodilatacija (Jackson, 2000).

Endoplazmatski retikulum ima sposobnost skladištenja, oslobađanja i ponovnog preuzimanja Ca^{2+} , stalnom aktivnošću tri glavne klase regulatornih proteina: (1) proteina koji vezuju Ca^{2+} u organeli; (2) kanala endoplazmatskog retikuluma za oslobađanje Ca^{2+} iz skladišta (receptor za rijanodin i receptor za IP_3); i (3) SERCA, pumpe za ponovno preuzimanja Ca^{2+} . Da bi smanjili intracelularnu koncentraciju Ca^{2+} , i tako indukovali relaksaciju, potrebno je redukovati oslobađanje Ca^{2+} iz intracelularnih depoa, ili povećati njegovo preuzimanje u iste (Jackson, 2000).

Regulacija tonusa uticajem na K^+ kanale krvnih sudova

Tonus malih arterija i arteriola se nalazi u osnovi održavanja perifernog otpora i kontroli krvnog pritiska (White i sar., 1996). Važnu ulogu u kontroli potencijala ćelijske membrane, a time i vaskularnog tonusa, imaju K^+ kanali (Jackson, 2000). Agensi koji direktno ili indirektno indukuju njihovo otvaranje, iniciraju izlazak K^+ iz ćelije i posledičnu hiperpolarizaciju glatke muskulature. Ovo ne samo da redukuje ulazak Ca^{2+} putem voltažno-zavisnih kanala, već i smanjuje njegovo oslobađanje iz intracelularnih depoa i osetljivost kontraktilnog aparata glatke muskulature (Jackson, 2000). Bitan faktor relaksantnog efekta može biti i aktivacija K^+ kanala eksprimiranih na endotelu. Hiperpolarizacija, koja se time postiže, se može direktno preneti na glatku muskulaturu, ili biti signal za ulazak Ca^{2+} i pokretanje sinteze NO i prostaciklina kao relaksantnih faktora (Feletou i sar., 2016).

Sve je više studija koji ukazuju na direktnu korelaciju između poremećaja odgovarajućih K^+ kanala i kardiovaskularnih bolesti. Tako, u aterosklerotičnim promenama humanih koronarnih arterija, vreme tokom kojeg su BK_{Ca} kanali otvoreni je duže nego u glatkoj muskulaturi drugih krvnih sudova (Wiecha i sar., 1997). Bolotina i sar. (1991) pokazuju da aterosklerotični segmenti humane aorte sadrže dve različite vrste BK_{Ca} kanala, za razliku od zdravog krvnog suda u kojem se eksprimira samo jedna vrsta. Takođe, senzitivnost BK_{Ca} kanala za Ca^{2+} u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova je smanjena kod postojanja dijabetesa melitusa, i povezana je sa smanjenom ekspresijom pomoćne $\beta 1$ -subjedinice (McGahon i sar., 2007).

Klasifikacija K^+ kanala

K^+ kanali su najraznovrsnija vrsta kanala i svaki (pod)tip ima posebnu fiziološku ulogu. Dugi niz godina struktura i tipovi K^+ kanala bili su nepoznati usled nedostatka specifičnih liganada za njihovu aktivaciju ili blokiranje. Značajan doprinos dala je upotreba selektivnih liganada animalnog porekla, ali i uvođenje odgovarajućih elektrofizioloških metoda („voltage clamp i „patch clamp“). Klasifikacija K^+ kanala zasnovana je na broju transmembranskih domena koji ulaze u sastav α subjedinice (kanali sa dve, četiri i šest transmembranskih domena) (Khan i sar., 2001; Shieh i sar., 2000). Podela je prikazana u Tabeli 2.

Tabela 2. Klasifikacija K⁺ kanala

K ⁺ kanali sa dva transmembranska domena	K ⁺ kanali sa četiri transmembranska domena	K ⁺ kanali sa šest transmembranskih domena		
Ulazno ispravljački K ⁺ kanali		Voltažno-zavisni K ⁺ kanali (K _V)	Ca ²⁺ -zavisni K ⁺ kanali (K _{Ca})	Na ⁺ -zavisni K ⁺ kanali (K _{Na}) (nekada klasifikovani kao podtip K _{Ca})
K _{IR} 1.x	TWIK	K _V 1.x	K _{Ca} 1.x (BK)	K _{Na} 1.x
K _{IR} 2.x	TREK	K _V 2.x	K _{Ca} 5.x (SL03)	
K _{IR} 3.x	TASK	K _V 3.x	K _{Ca} 2.x (SK)	
K _{IR} 4.x	TALK	K _V 4.x	K _{Ca} 3.x (IK)	
K _{IR} 5.x	THIK	K _V 7.x		
K _{IR} 6.x	TRESK	K _V 8.x		
K _{IR} 7.x		K _V 9.x		
		K _V 10.x		
		K _V 11.x		
		K _V 12.x		

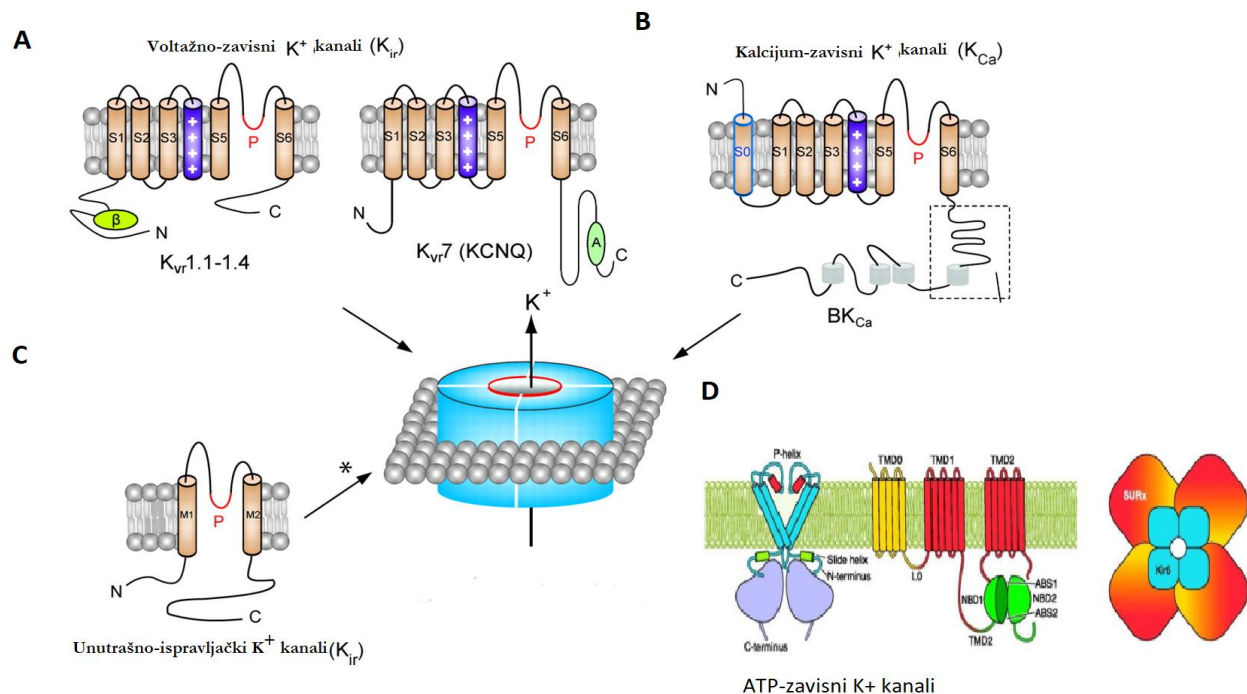
U mikrocirkulaciji, kao i u ostalim vaskularnim koritima, najznačajnija je ekspresija 3 različite klase K⁺ kanala: K_{ATP} kanali (podtip ulazno-ispravljačkih K⁺ kanala (K_{IR})), K_V i K_{Ca} kanali (Nelson i Quayle, 1995).

K_V kanali

Funkcija K_V kanala, čija je struktura shematski prikazana na Slici 11A, je da ostvari i održi negativni membranski potencijal, i tako stvori ravnotežu depolarišućem delovanju Na⁺ i Ca²⁺.

Beech i Bolton (1989) i Okabe i sar. (1987) su među prvima identifikovali K_V kanale u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. Naredne studije su pokazale njihovo prisustvo u gotovo svim ispitivanim krvnim sudovima (Cox, 2005; Nelson i Quayle, 1995). Najveću zastupljenost od svih K_V kanala ima K_V1.x podtip (Overturk i sar., 2004). Nekoliko istraživačkih grupa ukazuje na promenu u ekspresiji i funkciji K_V kanala u krvnim sudovima hipertenzivnih životinja. Tako, u mezenteričnim arterijama hipertenzivnih pacova, ekspresija K_V1.2 i K_V1.5 kanala je bila znatno niža nego u normotenzivnih jedinki (Xu i sar., 1999).

Pregledom literaturnih podataka, uočavamo da veliki broj relaksantnih supstanci deluje, barem delimično, aktiviranjem K_V kanala na glatkoj muskulaturi krvnih sudova, i to na različite načine. Dok neke supstance, poput dapagliflozina, direktno aktiviraju kanal (Li i sar., 2018), relaksacija koju proizvode adenozin ili β-agonisti se ostvaruje povećanjem intracelularne koncentracije cAMP-a, aktivacijom PKA, i posledičnom fosforilacijom kanala (Berwick i sar., 2010; Satake i sar., 1996). Dodatno, aktivacija K_V kanala može biti i u direktnoj korelaciji sa aktivacijom NO/cGMP/PKG puta, kao što je pokazano u studijama sa donorima NO i natriuretskim peptidom (Tanaka i sar., 2006).



Slika 11. Shematski prikaz (A) voltažno-zavisnih K^+ kanala (K_v); (B) Ca^{2+} -zavisnih K^+ kanala; (C) ulazno-ispravljačkih K^+ kanala (K_{IR}); (D) ATP-zavisnih K^+ kanali (K_{ATP})

K_{Ca} kanali

Za aktivaciju ovog tipa kanala, osim depolarizacije, potrebna je i povećana koncentracija Ca^{2+} u citoplazmi (Brainard i sar., 2007). Dele se na BK_{Ca} , IK_{Ca} i SK_{Ca} kanale. SK_{Ca} kanali se primarno nalaze u endotelu gde, pretpostavlja se, imaju ulogu u hiperpolarizaciji (Feletou i sar., 2016). IK_{Ca} podtip kanala je prvi put otkriven u glatkim mišićima arteriola pankreasa pacova (Stuenkel, 1989). Podaci o ulozi koju ovaj podtip K^+ kanala ima u glatkim mišićima krvnih sudova su vrlo oskudni. Mnogo je više podataka o njegovom učešću u endotelnoj hiperpolarizaciji (Feletou i sar., 2016).

BK_{Ca} kanali su najviše proučavani od svih K_{Ca} kanala. Sastoje se od 4 α -subjedinice koje formiraju poru, i koje su ubikvitarno prisutne u tkivima sisara, i pomoćnih β -subjedinica, čija je ekspresija tkivno specifična (Hu i Zhang, 2012) (Slika 13B).

Benham i Bolton (1986) su među prvima identifikovali BK_{Ca} kanale na izolovanim glatkim mišićnim ćelijama mezenterične arterije zamorca. Nakon toga, brojne istraživačke grupe pokazuju ekspresiju ovih kanala na velikim krvnim sudovima sistemske cirkulacije, kao što je aorta ili renalna arterija (Gebremedhin i sar., 1996; Jackson i sar., 1998). Veoma široka zastupljenost u vakularnoj glatkoj muskulaturi im omogućava da participiraju u održavanju membranskog potencijala, regulaciji tonusa, i učestvuju u kompenzatornom mehanizmu koji se odupire vazokonstrikciji. Različite fiziološke promene (starenje i/ili razvoj, trudnoća), ili patofiziološka stanja doprinose njihovoj promeni (Hu i Zhang, 2012).

Izoproterenol, prostaciklin, adenozin i peptid sličan kalcitoninu (CGRP, engl. *calcitonin gene-related peptide*) svoje relaksantne efekte, barem delimično, ostvaruju PKA-posredovanom aktivacijom BK_{Ca} kanala (Yamacuchi i sar., 2005; Nara i sar., 1998), dok se u literaturi beleži i NO-indukovana aktivacija ovih kanala nekim agensima (Tykocki i sar., 2018).

K_{IR} kanali pripadaju brojnoj klasi kanala sa četiri subjedinice, od kojih svaka sadrži po dva transmembranska domena i petlju pore između njih (Hibino sar., 2010) (Slika 11C). Aktiviraju se tokom maksimalne hiperpolarizacije, obezbeđujući povratak K⁺ u ćeliju, i igrajući bitnu ulogu u postizanju potencijala mirovanja. K_{IR} kanali su, analogno K_V kanalima, organizovani u tetramere (Brainard i sar., 2007), mada je opisan i kompleksniji tzv. oktamerni raspored, kao u slučaju K_{ATP} kanala, koji imaju četiri Kir6.x subjedinice, a svaka od njih vezuje po jednu sulfonilurea receptorsku subjedinicu (SUR1, SUR2A, SUR2B) (Slika 11D).

K_{ATP} kanali (podtip K_{IR} kanala) su prvi put opisani na kardiomiocitima, gde je njihova aktivnost direktno zavisna od celularnog nivoa ATP (Noma, 1983). Igraju izuzetno važnu ulogu u povezivanju ćelijskog metabolizma sa ekscitabilnošću, što je najbolje ilustrovano kod β ćelija pankreasa, gde povezuju nivo glukoze u plazmi sa lučenjem insulina.

Naročito su značajni za relaksaciju i povećani protok krvi u koronarnoj cirkulaciji (Berwick i sar., 2010), koži (Cankar i Struel, 2008), splanhikusu i bubregu (Duncker i sar., 2001). Dodatno, imaju bitnu ulogu u autoregulacionom mehanizmu i funkcionalnoj hiperemiji u srcu i mozgu (Tykocky i sar., 2018). Postoji jaka pozitivna korelacija između razvoja hipertenzije i poremećaja K_{ATP} kanala (Kawata i sar., 1998).

PKA-posredovana fosforilacija, sa posledičnom aktivacijom kanala i hiperpolarizacijom glatke muskulature je mehanizam delovanja različitih relaksantnih supstanci: adenoizina (Dart i Standen, 1993), prostaciklina (Jackson, 1993), PGE₂ (Bouchard i sar., 1994), CGRP-a (Wellman i sar., 1998), vazoaktivnog intestinalnog peptida (Yang i sar., 2008), ili agonista β-adrenergičkih receptora (Nelson i sar., 2011). Aktivacija K_{ATP} kanala može zavisiti i od indukcije NO/cGMP puta, ali biti i neposredna (Tykocky i sar., 2018).

HUMANI BAJPAS GRAFTOVI KAO MODEL ZA ISPITIVANJE VAZORELAKSANTNOG DELOVANJA

Da bi se dopremila oksigenisana krv u ishemično područje miokarda, u procesu hirurške revaskularizacije, uglavnom se koriste distalni deo unutrašnje torakalne arterije ili vena safena, koji se implantiraju ispod mesta opstrukcije koronarne arterije (Olearchyk, 1988). Ova procedura se naziva autokoronarno bajpas graftovanje.

Kao eksperimentalni model za ispitivanje vazorelaksantnog delovanja flavanola izabrana su ova dva humana krvna suda iz sledećih razloga:

- I. Humana unutrašnja torakalna arterija i humana vena safena su dva najčešće korišćena bajpas grafta;
- II. Dejstvo (-)-epikatehina i procijanidina B2 još uvek nije ispitivano na humanim krvnim sudovima;
- III. Ateroskleroza, prvenstveno venskog grafta, dovodi do značajnog morbiditeta i mortaliteta nakon revaskularizacije miokarda. Da bi rano propadanje graftova sveli na najmanju moguću meru, treba, između ostalog, primeniti i odgovarajuću medikamentoznu terapiju neposredno nakon operativnog zahvata, i kasnije u postoperativnom toku. Antiaterogenom delovanju, bi, barem delimično, mogao doprineti vazorelaksantni efekat ispitivanih flavanola.

CILJEVI RADA

S obzirom da su *in vitro* ispitivanja vazodilatatornog dejstva (-)-epikatehina i procijanidina B2 za sada još uvek retka, a mehanizam vazodilatacije nepoznat, ispitivanje pomenutih supstanci kao potencijalno korisnih vazodilatatornih supstanci je vrlo aktuelno.

Budući da su preliminarni rezultati pokazali da (-)-epikatehin i procijanidin B2 izazivaju vazodilataciju izolovane unutrašnje torakalne arterije i vene safene čoveka, cilj istraživanja je bio da se ispituju mehanizmi njihovog vazodilatatornog delovanja. Da bi se ostvario glavni cilj, definisano je nekoliko podciljeva:

1. Da se ispita da li (-)-epikatehin i procijanidin B2 deluju direktno na glatke mišićne ćelije unutrašnje torakalne arterije i vene safene i/ili indirektno, delujući na endotel ovih krvnih sudova;
2. Da se ispita uloga signalnog puta NO/cGMP-a, kao i prostaciklina, u mehanizmu endotel-zavisnog vazodilatatornog dejstva ovih flavanola;
3. Da se definišu tipovi K^+ kanala posredstvom kojih deluju vazodilatatorno (-)-epikatehin i procijanidin B2, kao i da se ispita da li ovi polifenoli deluju vazodilatatorno posredstvom istih tipova K^+ kanala na izolovanu unutrašnju torakalnu arteriju i venu safenu;
4. Da se ispita da li su voltažno-zavisni kalcijumski kanali uključeni u mehanizam vazodilatatornog dejstva ovih flavanola, kao i uticaj flavanola na intracelularni Ca^{2+} .

MATERIJAL I METODE

PRIPREMA TKIVA

Ekperimenti su izvođeni na izolovanim humanim krvnim sudovima: unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka. Studijski protokol je usvojen od strane Etičkog komiteta Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“. Tokom istraživanja uzeti su arterijski i venski segmenti od ukupno 250 pacijenata koji su podvrgnuti bajpas operaciji, a za eksperimente su upotrebljeni samo delovi koji su bili bez makroskopski vidljivih aterosklerotskih promena. Neiskorišćeni segmenti unutrašnje torakalne arterije i vene safene su odmah su ostavljani u hladni (4°C) Krebs-Ringerov bikarbonatni rastvor (118,3 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄ i 11,1 mM glukoze, pH = 7,4) i transportovani u laboratoriju.

U laboratoriji su dobijeni segmenti krvnih sudova pažljivo očišćeni od okolnog vezivnog i masnog tkiva, a zatim isecani na prstenove širine 3 mm. Broj prstenova dobijenih od svakog segmenta bio je 1-3. Endotel nekih prstenova je uklanjan mehanički, nežnim prevlačenjem unutrašnje površine žicom od nerđajućeg čelika.

Prstenovi krvnih sudova su zatim postavljeni u vodeno kupatilo za izolovane organe na sledeći način: kroz lumen prstenova su provučena dva držača trouglastog oblika od nerđajućeg čelika, a zatim su prstenovi bili uronjeni u kupatilo za izolovane organe zapremine 10 ml, ispunjeno Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom temperature 37 °C, koji se kontinuirano oksigeniše mešavinom 95% O₂ i 5% CO₂. Donji držač je fiksiran za kanilu, a gornji vezan za transdjuser. Rastojanje između dva držača, odnosno opterećenje preparata, podešavano je pomeranjem gornjeg držača mikrometarskim zavrtnjem. Izometrijska tenzija preparata registrovana je preko transdjusera na monitoru kompjutera. Prstenasti segmenti arterija i vena postepeno su istezani do optimalne tačke zatezanja (do 2 g). Pre početka eksperimenata preparati su bili ekvilibrirani 60-75 min. U toku ovog perioda, krvni sud je ispiran na svakih 10 min. svežim Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom. U posebnoj seriji eksperimenata korišćen je Krebs-Ringerov rastvor bez Ca²⁺, kod koga je izostavljen CaCl₂, a dodat 1 mM etilin glikol tetraacetat (EGTA).

EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Ekperimenti su izvođeni na izolovanim krvnim sudovima sa i bez endotela. Nakon perioda ekvilibracije, prstenovi unutrašnje torakalne arterije i vene safene čoveka su kontrahovani fenilefrinom (10 μM), a kada je kontrakcija preparata dostigla stabilan plato (posle 10-15 min.), u vodeno kupatilo je dodavan acetilholin (1 μM). Endotel se smatrao očuvanim ukoliko je dodatak acetilholina izazvao snažnu relaksaciju ispitivanog krvnog suda. Nakon toga, preparat je u narednih sat vremena ispiran svežim Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom, posle čega je ponovo kontrahovan fenilefrinom ili rastvorom koji sadrži 80 mM K⁺. Nakon što je kontrakcija dostigla svoj stabilan plato, rastuće koncentracije (-)-epikatehina (0,1-500 μM) ili procijanidina B2 (0,001-3 μM) su kumulativno dodavane u vodeno kupatilo. Posle toga, preparat je ispiran u narednih sat vremena, a zatim, u cilju ispitivanja mehanizma dejstva, u vodeno kupatilo su dodavani različiti blokatori/inhibitori ili njihove kombinacije (20 min. pre ponovne kontrakcije preparata). Kada je ponovna kontrakcija dostigla stabilan plato, kumulativno su dodavane rastuće koncentracije ispitivane supstance (sada u prisustvu specifičnog blokatora/inhibitora ili njihove kombinacije).

Da bismo ispitali uticaj (-)-epikatehina i/ili procijanidina B2 na intracelularni Ca²⁺, u posebnoj seriji eksperimenata kontrakcije su indukovane fenilefrinom (10 μM) ili kofeinom (25 mM) u Krebs-Ringerovom rastvoru koji ne sadrži Ca²⁺ (bez CaCl₂), a zatim su kumulativno dodavane rastuće koncentracije ispitivanih supstanci. Takođe, neki prstenovi, u normalnom Krebs-Ringerovom rastvoru (sa CaCl₂), 40 min. pre kontrakcije fenilefrinom i kumulativnog dodavanja (-)-epikatehina ili procijanidina B2, su tretirani tapsigarginom ili nifedipinom. Ekperimenti izvođeni bez dodavanja specifičnih blokatora/inhibitora korišćeni su kao kontrola.

Da bi ispitali uloge različitih komponenti cGMP puta i prostaciklina u mehanizmu vazodilatatornog efekta (-)-epikatehina i/ili procijanidina B2, korišćeni su sledeći inhibitori:

- ❖ *L-NAME* (*N ω -nitro-L-arginin metil estar*) – inhibitor eNOS
- ❖ *hidroksokobalamin* – hvatač NO
- ❖ *ODQ* (*1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-*a*]kvinoksalin-1-on*) – inhibitor solubilne GC,
- ❖ *indometacin* – reverzibilni inhibitor COX.

Uloge različitih K⁺ kanala u mehanizmu vazodilatatornog dejstva (-)-epikatehina i procijanidina B2 ispitivane su korišćenjem sledećih blokatora:

- ❖ *glibenklamid* – selektivni blokator K_{ATP} kanala,
- ❖ *4-aminopiridin* - neselektivni blokator K_V kanala,
- ❖ *margatoksin* – selektivni blokator K_V1.3 kanala,
- ❖ *iberiotoksin* – selektivni blokator BK_{Ca} kanala,
- ❖ *apamin* - selektivni blokator SK_{Ca} kanala,
- ❖ *TRAM-34* (*1-[(2-hlorfenil difenilmetil]-1H- pirazol*) - selektivni blokator IK_{Ca} kanala.

STATISTIČKA ANALIZA

Relaksacija prouzrokovana bilo kojom koncentracijom ispitivane supstance ((-)-epikatehina i procijanidina B2) je merena i izražavana u procentima u odnosu na maksimalnu moguću relaksaciju (povratak na baznu liniju, odnosno tenziju pre vazokonstrikcije). Koncentracija ispitivane supstance koja proizvede 50% maksimalne relaksacije izračunata je iz krive odnosa koncentracije i relaksacije, koristeći metodu najmanjih kvadrata, i prezentovana kao pD₂ (pD₂ = -log EC₅₀). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija, a vrednost *n* označava broj eksperimenata. Statističko poređenje kumulativnih krivih odnosa koncentracije i relaksacije pod različitim tretmanom (sa i bez blokatora/inhibitora) vršeno je primenom dvofaktorske analize varijanse sa ponovljenim merenjima, praćene Bonferroni testom za *post hoc* poređenja. Za ispitivanje značajnosti razlika između maksimalnih vrednosti relaksacije (E_{max}) i EC₅₀ vrednosti različitih grupa, koristili smo Studentov t-test. Statistički značajnom smatrana je vrednost *p* < 0,05. Za statističke analize korišćen je kompjuterski program SPSS (version 10.0; International Business Machines Corp, Armonk, NY).

EKSPERIMENTALNE SUPSTANCE

U eksperimentima su korišćene sledeće supstance:

Supstance za izazivanje relaksacije:				
(-)-Epikatehin, procijanidin B2, acetilholin-jodid.				
Supstance za izazivanje kontrakcije:				
Fenilefrin-hidrohlorid, kofein, kalijum-hlorid.				
Specifični blokatori/inhibitori za ispitivanje mehanizma dejstva:				
Blokatori kalijumovih kanala	Blokator voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala	Inhibitori cGMP puta	Inhibitor ciklooksigenaze	Inhibitor kalcijum-zavisne ATP-aze sarkoplazmatskog retikuluma
Apamin, TRAM- 34, iberiotoksin, glibenklamid, 4-aminopiridin, margatoksin.	Nifedipin	Hidroksokobalamin hidrohlorid, ODQ, L-NAME.	Indometacin	Tapsigargin

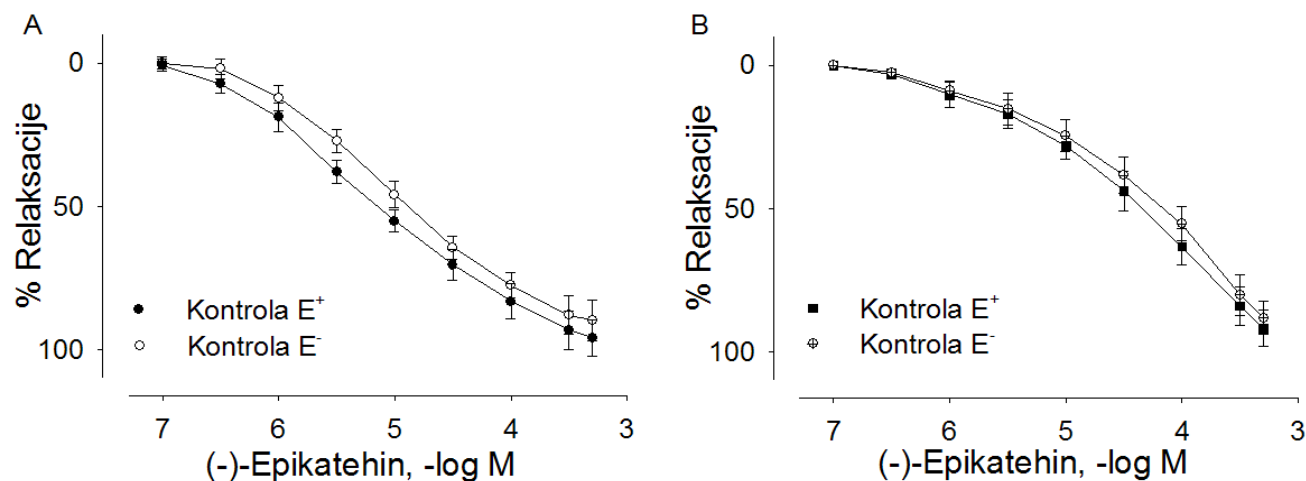
Glibenklamid, TRAM-34, ODQ i indometacin su rastvarani u dimetil-sulfoksidu. Tapsigargin i nifedipin su rastvarani u apsolutnom etanolu. Radne koncentracije etanola i dimetil-sulfoksida u kupatilu su bile < 0,01% (v/v). Sve ostale supstance su rastvarane u destilovanoj vodi. Supstance su dodavane direktno u kupatilo za izolovane organe, a njihove koncentracije izražene kao finalne molarne koncentracije u vodenom kupatilu. Eksperimenti su izvođeni u zamračenoj prostoriji zbog fotosenzibilnosti (-)-epikatehina i procijanidina B2.

REZULTATI

VAZODILATORNO DEJSTVO (-)-EPIKATEHINA

Efekat (-)-epikatehina na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i humanoj veni safeni prekontrahovanoj fenilefrinom

(-)-Epikatehin ($0,1-500 \mu\text{M}$) je koncentracijski-zavisno relaksirao humanu unutrašnju torakalnu arteriju sa i bez endotela (pD_2 kontrolne krive sa endotelom $5,14 \pm 0,04$, maksimalni efekat $95,7 \pm 6,3\%$; $n = 10$; odnosno pD_2 kontrolne krive bez endotela $4,86 \pm 0,1$, maksimalni efekat $89,7 \pm 7,0\%$; $n = 10$; Slika 12A), kao i humanu venu safenu sa i bez endotela (pD_2 kontrolne krive sa endotelom $4,35 \pm 0,12$, maksimalni efekat $91,7 \pm 6,3\%$; $n = 10$; odnosno pD_2 kontrolne krive bez endotela $4,24 \pm 0,05$, maksimalni efekat $87,9 \pm 5,8\%$; $n = 10$; Slika 12B). Nije bilo statistički značajne razlike između pD_2 vrednosti i vrednosti maksimalnih efekata između preparata sa i bez endotela kod oba krvna suda ($p > 0,05$ za sva poređenja).



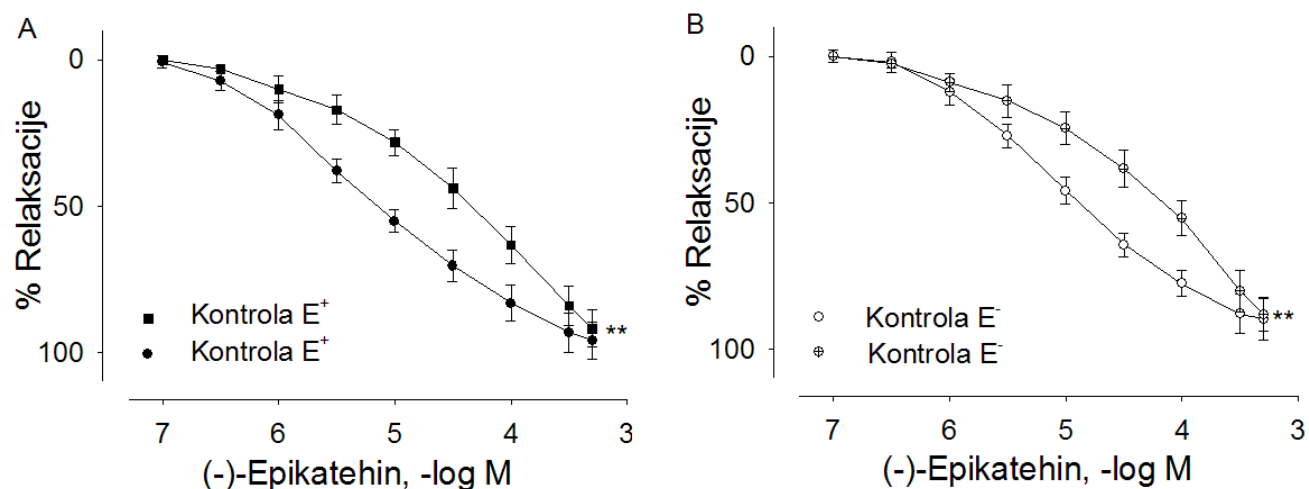
Slika 12. Koncentracijski-zavisne krive za (-)-epikatehin dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije sa i bez endotela (A) i humane vene safene sa i bez endotela (B), prekontrahovane fenilefrinom ($10 \mu\text{M}$). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SD od eksperimenata ($n = 10$).

Pokazano je da je unutrašnja torakalna arterija sa i bez endotela visoko značajno osetljivija na (-)-epikatehin u poređenju sa venom safenom (sa i bez endotela) ($p < 0,01$ za obe; Slika 13A i 13B).

Ispitivanje mehanizma vazodilatatornog dejstva (-)-epikatehina na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i humanoj veni safeni

S obzirom da su prve serije eksperimenata pokazale snažan endotel-nezavisni relaksantni efekat (-)-epikatehina na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni, dalja ispitivanja mehanizma dejstva vršena su na preparatima bez endotela.

Ispitan je uticaj različitih blokatora K^+ kanala na (-)-epikatehinom-indukovanu relaksaciju, kao i dejstvo (-)-epikatehina na ekstracelularni i intracelularni Ca^{2+} .



Slika 13. Koncentracijski-zavisne krive za (-)-epikatehin dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije (●) i vene safene (■) sa endotelom (A) i unutrašnje torakalne arterije (○) i vene safene (⊕) bez endotela (B), prekontrahovane fenilefrinom (10 μ M). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SD od eksperimenata (n = 10). ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).

Uticaj različitih blokatora K^+ kanala na relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene prouzrokovanu (-)-epikatehinom

Da bi ispitali da li su, i koji K^+ kanali uključeni u vazorelaksantni efekat (-)-epikatehina na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni, koristili smo sledeće blokatore K^+ kanala: glibenklamid, 4-aminopiridin, margatoksin i iberiotoksin.

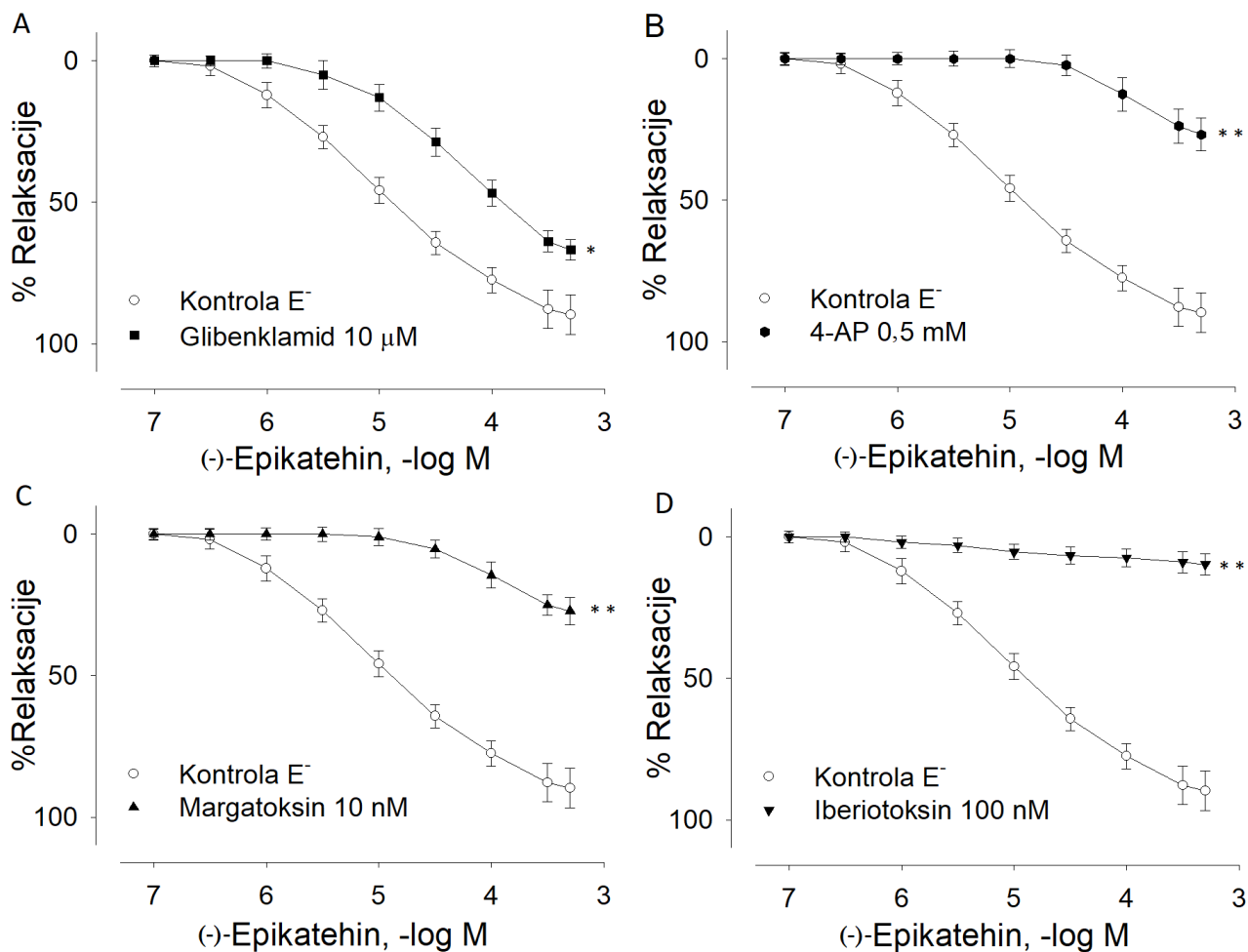
Glibenklamid (10 μ M), selektivni blokator K_{ATP} kanala, pomerio je u desno krivu odnosa koncentracije i efekta dobijenu na segmentima unutrašnje torakalne arterije (Slika 14A; Tabela 3). Sa druge strane, ovaj blokator je značajno smanjio relaksaciju vene safene prouzrokovanu visokim koncentracijama (-)-epikatehina (Slika 15A; Tabela 4).

4-Aminopiridin (0,5 mM), predominantni blokator K_V kanala, parcijalno je inhibirao (-)-epikatehinom uzrokovanu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije (Slika 14B; Tabela 3), dok je (-)-epikatehinom-indukovana relaksacija vene safene bila skoro potpuno inhibirana (Slika 15B; Tabela 4).

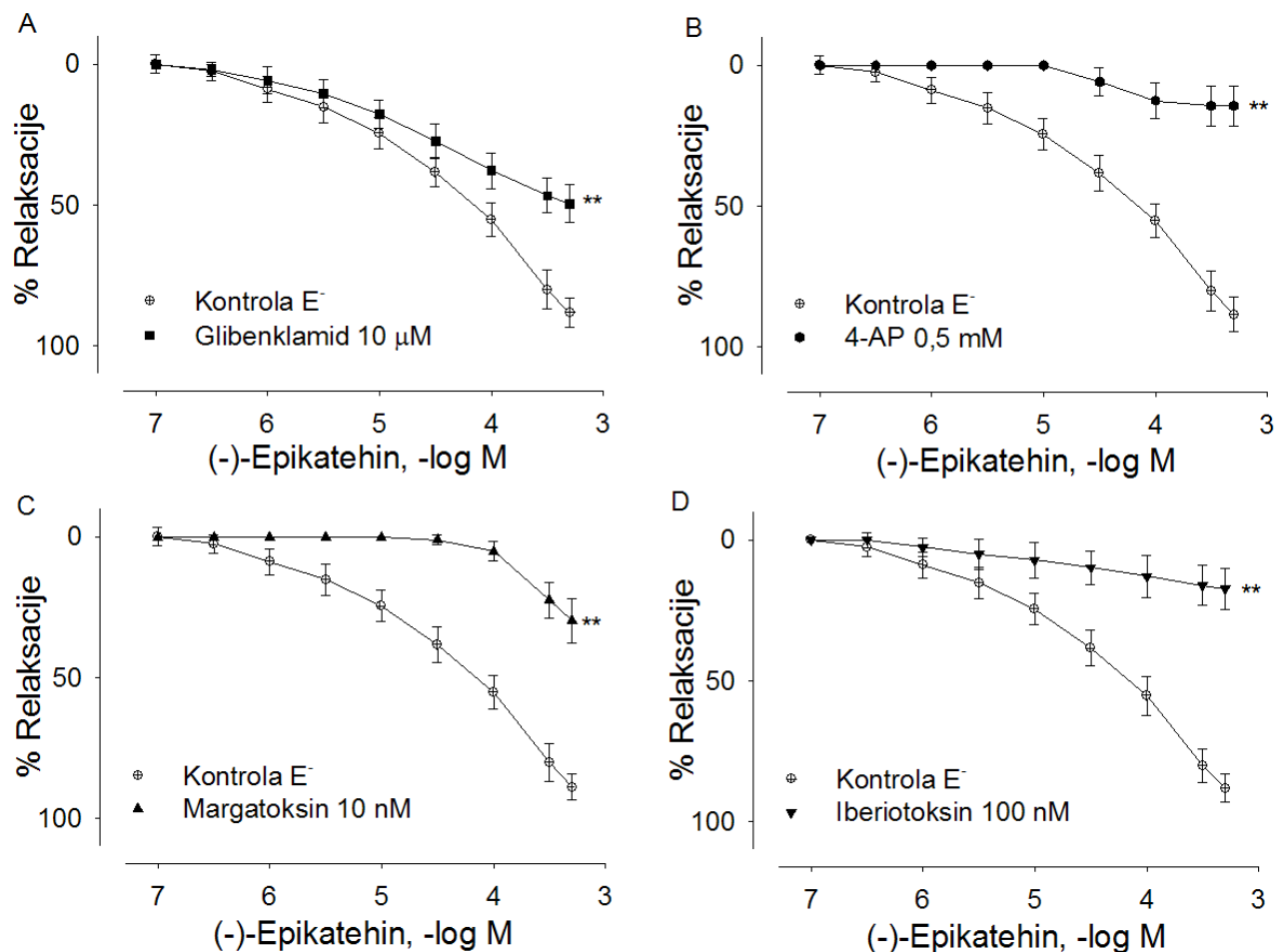
Margatoksin (10 nM), potentni inhibitor $K_{V1.3}$ kanala, značajno je antagonizovao relaksaciju unutrašnje torakalne arterije i vene safene izazvanu (-)-epikatehinom (Slika 14C i 15C; Tabela 3 i 4).

Iberiotoksin (100 nM), visoko selektivan blokator BK_{Ca} kanala, je skoro potpuno blokirao relaksaciju unutrašnje torakalne arterije i vene safene prouzrokovanu (-)-epikatehinom (Slika 14D i 15D; Tabela 3 i 4).

Dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem pokazala je da na unutrašnjoj torakalnoj arteriji postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa glibenklamidom (p < 0,05), 4-aminopiridinom (p < 0,01), margatoksinom (p < 0,01) ili iberiotoksinom (p < 0,01) u odnosu na kontrolu. Slično, na veni safeni pokazana je statistički značajna razlika nakon inkubacije bilo kojeg od 4 korišćena blokatora K^+ kanala (p < 0,01 za sva poređenja) u odnosu na kontrolu.



Slika 14. Koncentracijski-zavisne krive za (-)-epikatehin dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije bez endotela prekontrahovane fenilefrinom (10 μM) u odsustvu i prisustvu (A) glibenklamida (10 μM); (B) 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM); (C) margatoksina (10 nM) i (D) iberiotoksina (100 nM). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od eksperimenata (n = 5-8). * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).



Slika 15. Koncentracijski-zavisne krive za (-)-epikatehin dobijene na preparatima humane vene safene bez endotela prekontrahovane fenilefrinom (10 μM) u odsustvu i prisustvu (A) glibenklamida (10 μM); (B) 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM); (C) margatoksina (10 nM) i (D) iberiotoksina (100 nM). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od eksperimenata (n = 5-8). ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).

Tabela 3. Uticaj blokatora K^+ kanala na relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije prouzrokovanu (-)-epikatehinom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁻	6	4,81±0,08	90,8±6,1
Iberiotoksin 100 nM	6	nr	9,7±3,8**
Kontrola E ⁻	8	4,81±0,09	89,3±6,6
Glibenklamid 10 µM	8	3,87±0,09*	66,8±3,6*
Kontrola E ⁻	6	4,79±0,06	88,5±4,9
4-Aminopiridin 0,5 mM	6	nr	26,8±5,8**
Kontrola E ⁻	5	4,82±0,08	87,8±6,7
Margatoksin 10 nM	5	nr	27,2±4,8**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁻, preparat bez endotela; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Tabela 4. Uticaj blokatora K^+ kanala na relaksaciju izolovane humane vene safene prouzrokovan (-)-epikatehinom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁻	6	4,29±0,08	88,0±5,1
Iberiotoksin 100 nM	6	nr	17,3±7,3**
Kontrola E ⁻	8	4,29±0,10	88,2±5,1
Glibenklamid 10 µM	8	3,34±0,23**	49,4±5,6**
Kontrola E ⁻	8	4,31±0,06	88,5±6,2
4-Aminopiridin 0,5 mM	8	nr	14,3±7,1**
Kontrola E ⁻	5	4,30±0,08	88,8±2,7
Margatoksin 10 nM	5	nr	29,7±7,8**

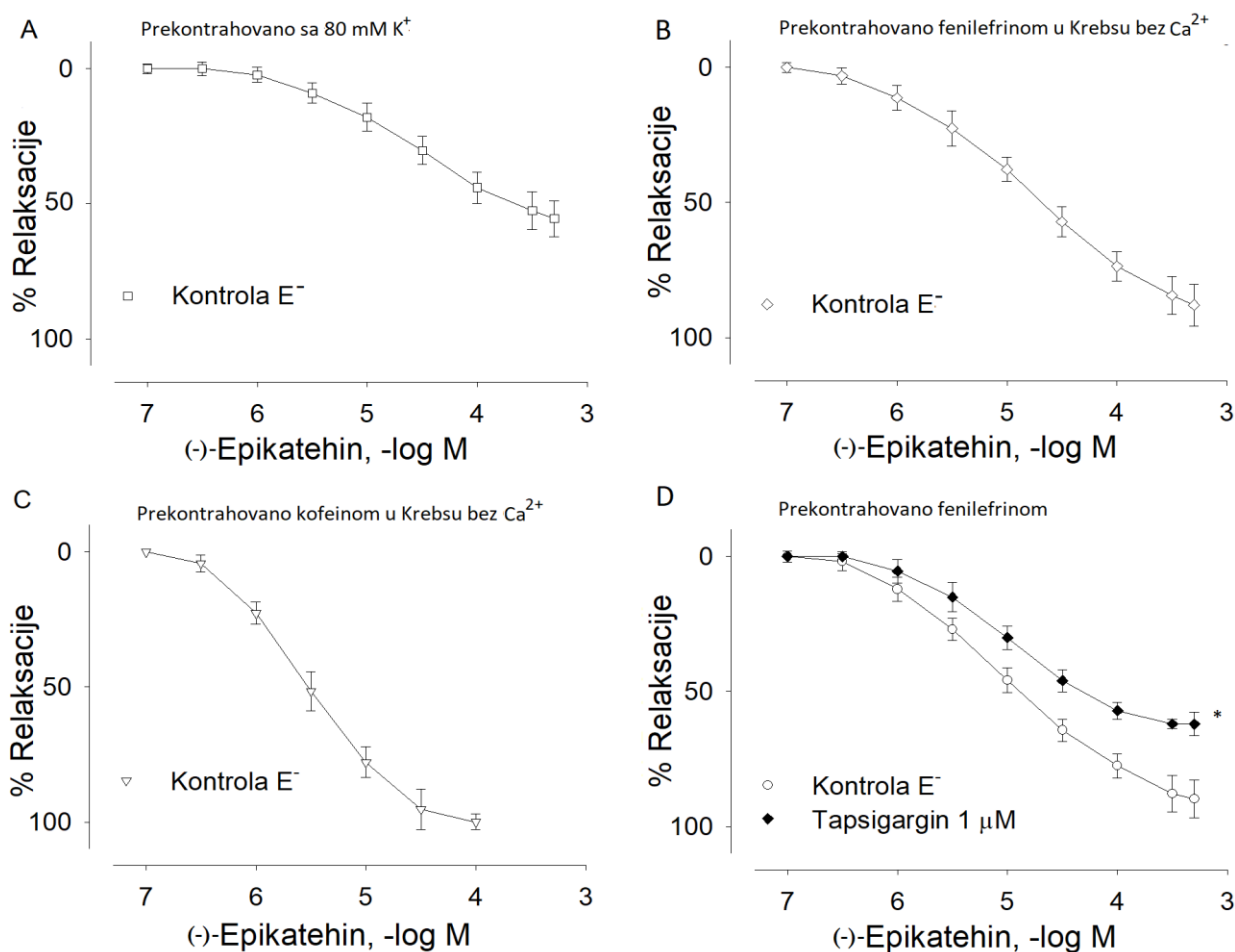
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁻, preparat bez endotela; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Efekat (-)-epikatehina na influks ekstracelularnog Ca^{2+} u glatke mišićne ćelije

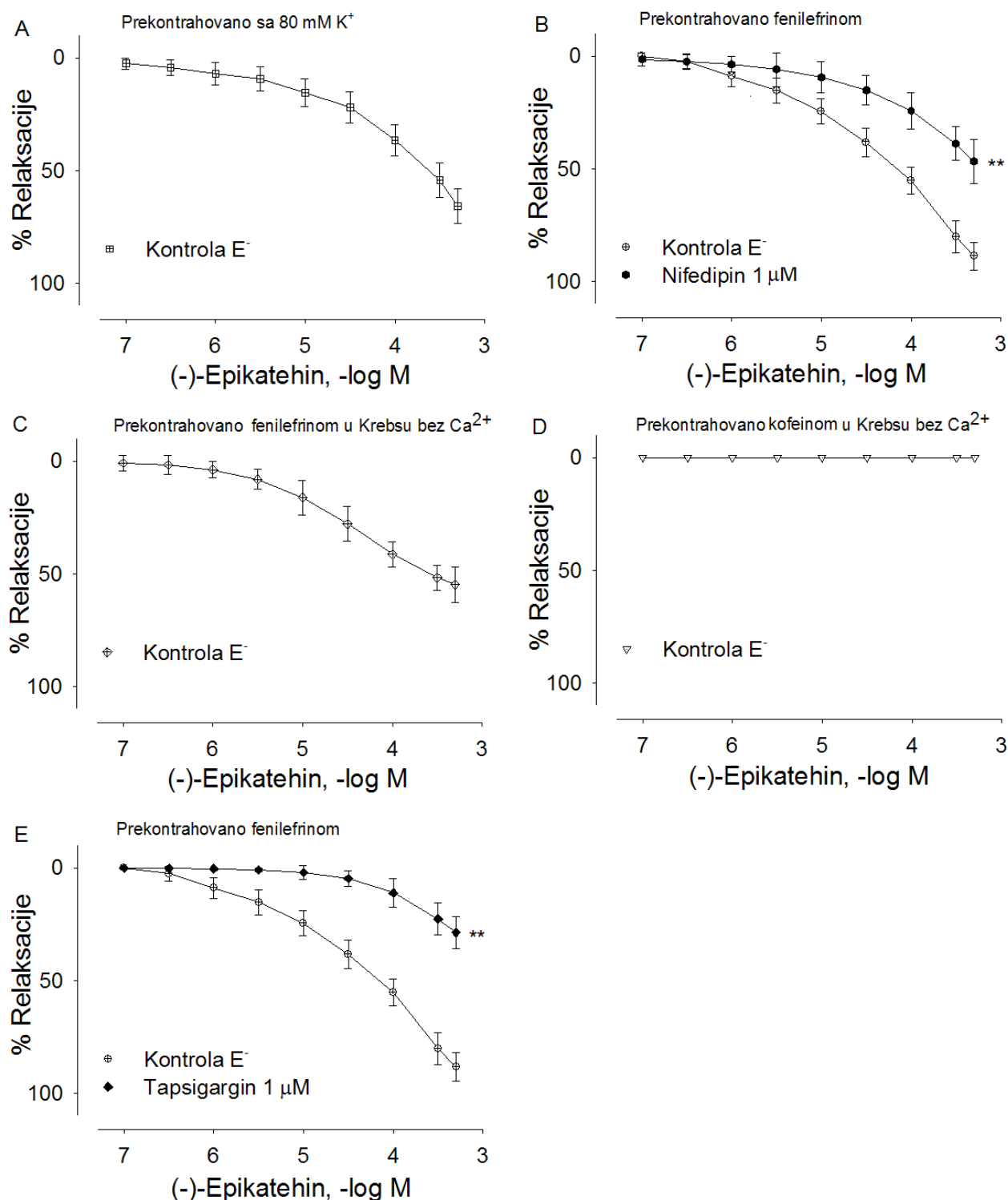
Nakon kontrakcije uzrokovane visokim K^+ , dodavanje (-)-epikatehina (0,1–500 μM) indukovalo je parcijalnu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije (Slika 16A; Tabela 5) i koncentracijski-zavisnu relaksaciju vene safene (Slika 17A; Tabela 5). Nakon inkubacije sa nifedipinom (1 μM), blokatorom voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala L-tipa, prstenovi vene safene i unutrašnje torakalne arterije se nisu kontrahovali dodatkom 80 mM K^+ (podaci nisu prikazani).

Nifedipin (1 μM) je delimično antagonizovao relaksantni efekat (-)-epikatehina na izolovanim segmentima vene safene kontrahovanim fenilefrinom ($\text{pD}_2 = 4,18 \pm 0,08$; $E_{\text{max}} = 88,7 \pm 6,1\%$ u kontrolnoj seriji eksperimenata vs. $\text{pD}_2 = 2,29 \pm 0,13$; $E_{\text{max}} = 46,7 \pm 9,7\%$ u prisustvu nifedipina; $p < 0,01$ za oba; $n = 5$ za oba) (Slika 17B).

Dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem pokazala je da na veni safeni postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa nifedipinom u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$).



Slika 16. Koncentracijski-zavisne krive za (-)-epikatehin dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije (A) prekontrahovane sa 80 mM K^+ ; (B) prekontrahovane fenilefrinom (10 μM) u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (C) prekontrahovane kofeinom (25 mM) u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (D) prekontrahovane fenilefrinom u prisustvu i odsustvu tapsigargina (1 μM) u normalnom Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju pre kontrakcije K^+ ili fenilefrinom. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SD od eksperimenata ($n = 5-7$). * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).



Slika 17. Koncentracijski-zavisne krive za (-)-epikatehin dobijene na preparatima humane vene safene (A) prekontrahovane sa 80 mM K⁺; (B) prekontrahovane fenilefrinom u prisustvu i odsustvu nifedipina (1 μM); (C) prekontrahovane fenilefrinom (10 μM) u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca²⁺; (D) prekontrahovane kofeinom (25 mM) u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca²⁺; (E) prekontrahovane fenilefrinom u prisustvu i odsustvu tapsigargina (1 μM) u normalnom Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju pre kontrakcije K⁺ ili fenilefrinom. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od eksperimenata (n = 5-9). ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).

Efekat (-)-epikatehina na oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} u glatkim mišićnim ćelijama

U Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} , (-)-epikatehin (0,1–500 μ M) je izazvao koncentracijski-zavisnu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije, prethodno kontrahovane fenilefrinom (10 μ M) ili kofeinom (25 mM) (Slika 16B i 16C; Tabela 5). Dodavanje (-)-epikatehina izolovanim segmentima vene safene, u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} , uzrokovalo je parcijalnu relaksaciju prstenova prethodno kontrahovanih fenilefrinom, dok u slučaju prethodne kontrakcije kofeinom, (-)-epikatehin nije pokazao nikakav relaksantni efekat (Slika 17C i 17D; Tabela 5).

Tapsigargin (1 μ M), inhibitor SERCA, je blago antagonizovao (-)-epikatehinom-indukovanu relaksaciju izolovanih segmenata unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom u normalnom Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru ($pD_2 = 4,83 \pm 0,13$; $E_{max} = 89,3 \pm 6,4\%$ u kontrolnoj seriji eksperimenata vs. $pD_2 = 4,14 \pm 0,10$; $E_{max} = 62,0 \pm 4,3\%$ u prisustvu tapsigargina; $p < 0,05$ za oba; $n = 5$ za oba) (Slika 16D). Sa druge strane, relaksacija vene safene izazvana (-)-epikatehinom, pod istim uslovima, je bila znatno redukovana prisustvom tapsigargina ($E_{max} = 88,2 \pm 6,3\%$ u kontrolnoj seriji eksperimenata vs. $E_{max} = 28,5 \pm 6,1\%$ u prisustvu tapsigargina; $p < 0,01$; $n = 6$ za oba) (Slika 17E).

Dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem pokazala je da postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa tapsigarginom, kako na unutrašnjoj torakalnoj arteriji ($p < 0,05$), tako i na veni safeni ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu.

Tabela 5. (-)-Epikatehinom izazvana relaksacija prstenova izolovane humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene prekontrahovane fenilefrinom ili kofeinom u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} , ili visokim K^+ u normalnom Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru.

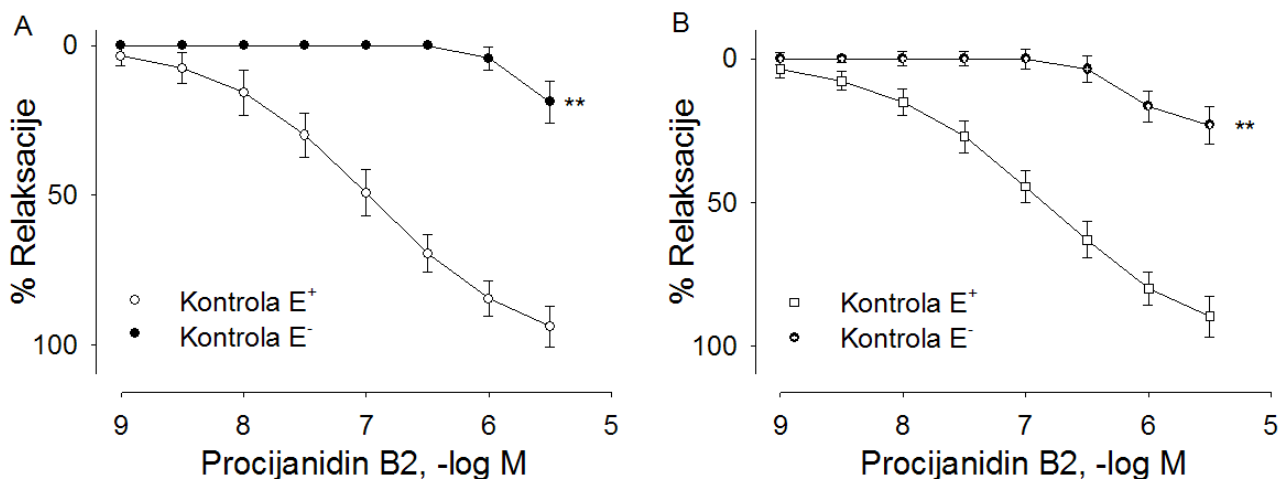
	n	pD_2	E_{max} (%)
Humana unutrašnja torakalna arterija			
(1) Fenilefrin (10 μ M)	7	$4,86 \pm 0,05$	$88,0 \pm 7,7$
(2) Kofein (25 mM)	5	$5,51 \pm 0,01$	$100,0 \pm 2,9$
(3) K^+ (80 mM)	6	$3,61 \pm 0,14$	$55,5 \pm 6,7$
Humana vena safena			
(1) Fenilefrin (10 μ M)	7	$3,55 \pm 0,13$	$54,6 \pm 7,9$
(2) Kofein (25 mM)	3	nr	$0,0 \pm 0,0$
(3) K^+ (80 mM)	9	$3,67 \pm 0,04$	$65,5 \pm 7,7$

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ SD. n, broj eksperimenata; $pD_2 = -\log EC_{50}$; E_{max} , maksimalna relaksacija; nr, nije računato (zbog male efikasnosti); (1) Preparati su prekontrahovani fenilefrinom u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (2) Preparati su prekontrahovani kofeinom u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (3) Preparati su prekontrahovani K^+ (80 mM).

VAZODILATATORNO DEJSTVO PROCIJANIDINA B2

Efekat procijanidina B2 na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i humanoj veni safeni prekontrahovanoj fenilefrinom

Procijanidin B2 ($0,001 \mu\text{M}$ – $3 \mu\text{M}$) je koncentracijski-zavisno relaksirao humanu unutrašnju torakalnu arteriju sa endotelom, dok je efekat relaksacije bio značajno smanjen nakon uklanjanja endotela (pD_2 kontrolne krive sa endotelom $6,99 \pm 0,02$, maksimalni efekat $93,9 \pm 6,9\%$; $n = 10$; dok je maksimalni efekat kontrolne krive bez endotela $18,9 \pm 7,0\%$; $n = 10$; Slika 18A). Sličan efekat procijanidin B2 prouzrokuje i na humanoj veni safeni (pD_2 kontrolne krive sa endotelom $6,86 \pm 0,06$, maksimalni efekat $89,7 \pm 6,2\%$; $n = 10$; dok je maksimalni efekat kontrolne krive bez endotela $23,0 \pm 4,8\%$; $n = 10$; Slika 18B). Pokazana je statistički značajna razlika između vrednosti maksimalnih efekata između preparata sa i bez endotela na oba krvna suda ($p < 0,01$ za oba).



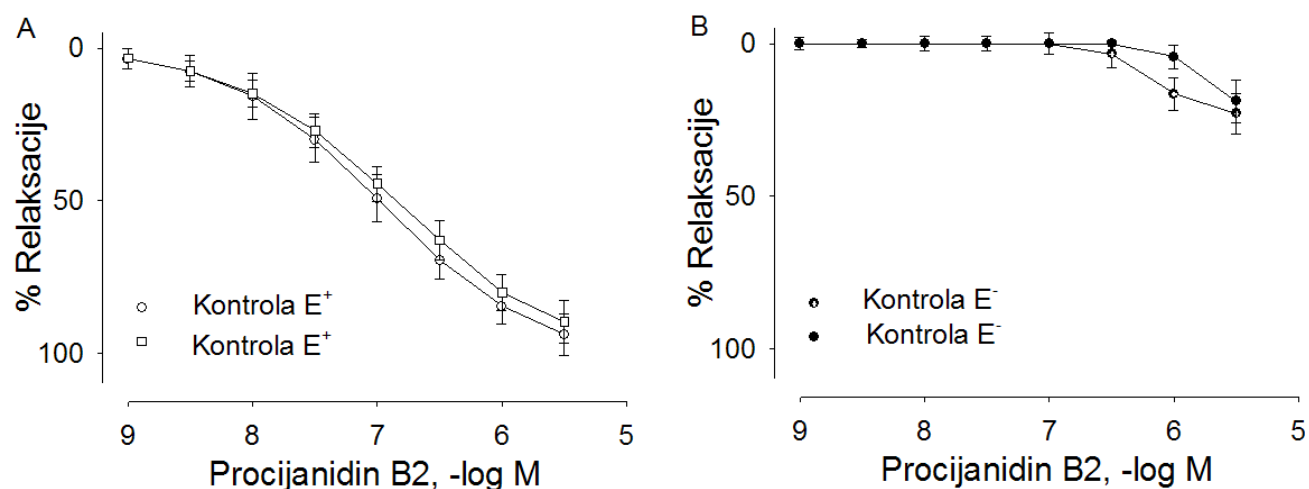
Slika 18. Koncentracijski-zavisne krive za procijanidin B2 dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije (A) i vene safene (B) sa i bez endotela, prekontrahovane fenilefrinom ($10 \mu\text{M}$). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SD od eksperimenata ($n = 10$). ** $p < 0,01$ (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).

Nije pokazana značajna razlika u osetljivosti humane unutrašnje torakalne arterije i humane vene safene, sa i bez endotela, na delovanje procijanidina B2 ($p > 0,05$ za sva poređenja; Slike 19A i 19B).

Ispitivanje mehanizma vazodilatatornog dejstva procijanidina B2 na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i humanoj veni safeni

S obzirom da su prve serije eksperimenata pokazale snažan endotel-zavisni relaksantni efekat procijanidina B2 na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni, dalja ispitivanja mehanizma dejstva vršena su na preparatima sa endotelom.

Ispitana je uloga različitih komponenti cGMP puta i prostaciklina, kao i uticaj različitih blokatora K^+ kanala na relaksaciju indukovanu procijanidinom B2. Takođe, proučavan je i uticaj procijanidina B2 na ekstracelularni i intracelularni Ca^{2+} .



Slika 19. Koncentracijski-zavisne krive za procijanidin B2 dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije (○) i vene safene (□) sa endotelom (A) i unutrašnje torakalne arterije (●) i vene safene (■) bez endotela (B), prekontrahovane fenilefrinom (10 μM). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od eksperimenata (n = 10).

Uloga različitih komponenti cGMP puta i prostaciklina u relaksaciji unutrašnje torakalne arterije i vene safene prouzrokovanoj procijanidinom B2

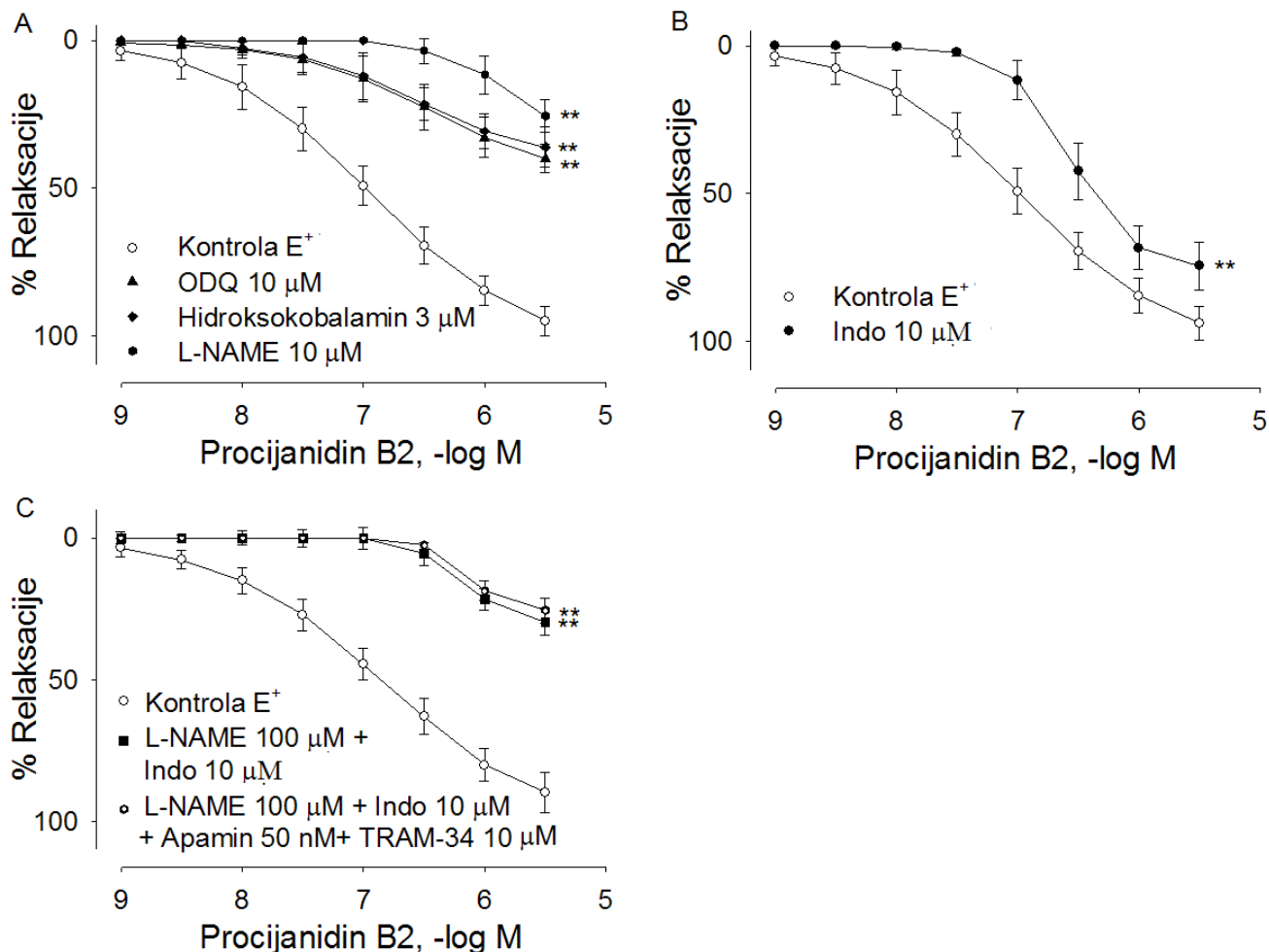
Da bi ispitali uloge različitih komponenti cGMP puta i prostaciklina u vazorelaksantnom efektu procijanidina B2 na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni, koristili smo sledeće inhibitore/blokatore: L-NAME, hidroskobalamin, ODQ, indometacin i apamin/TRAM-34 kombinaciju.

L-NAME (100 μM), inhibitor eNOS, ili hidroskobalamin (3 μM), hvatač NO, su skoro potpuno redukovali relaksantni efekat procijanidina B2 na izolovanim segmentima unutrašnje torakalne arterije i vene safene (Slika 20A i 21A; Tabela 6 i 7).

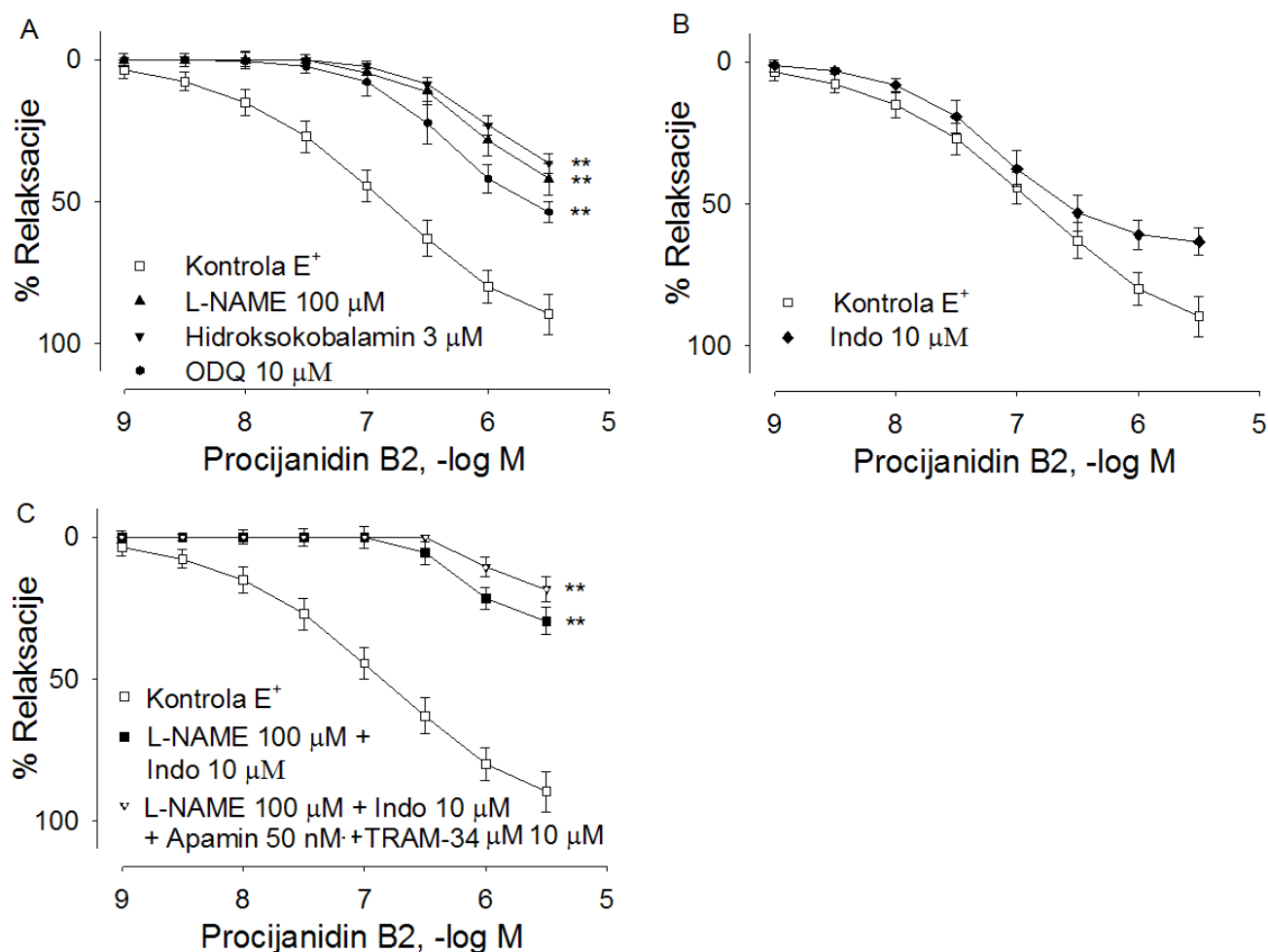
ODQ (10 μM), inhibitor solubilne GC, je značajno antagonizovao procijanidinom B2-indukovanu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije (Slika 20A; Tabela 6). Sa druge strane, relaksacija izolovanih segmenata vene safene je prisustvom ODQ delimično redukovana (Slika 21A; Tabela 7).

Indometacin (10 μM), reverzibilni inhibitor COX, je na segmentima unutrašnje torakalne arterije skoro poništio efekte izazvane nižim koncentracijama procijanidina B2, dok su efekti viših koncentracija bili delimično umanjani (Slika 20B; Tabela 6). Na segmentima vene safene, indometacinom su blago, ali statistički značajno, redukovani samo efekti prouzrokovani višim koncentracijama procijanidina B2 (Slika 21B; Tabela 7).

Dodatak apamina (50 nM), selektivnog blokatora SK_{Ca}, i TRAM-a 34 (10 μM), selektivnog blokatora IK_{Ca}, u prisustvu L-NAME i indometacina, doveo je do statistički značajnog redukovanja maksimalnog efekta procijanidinom B2-indukovane relaksacije vene safene, ali ne i unutrašnje torakalne arterije (Slika 20C i 21C; Tabela 6 i 7).



Slika 20. Koncentracijski-zavisne krive za procijanidin B2 dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom sa endotelom u odsustvu i prisustvu (A) L-NAME (10 μM), hidroksokobalamina (3 μM), ili ODQ (10 μM); (B) indometacina (Indo, 10 μM) i (C) kombinacije indometacina (10 μM) i L-NAME (100 μM) sa ili bez apamina (50 nM) i TRAM-a-34 (10 μM). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SD od eksperimenata ($n = 4-7$). ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).



Slika 21. Koncentracijski-zavisne krive za procijanidin B2 dobijene na preparatima humane vene safene prekontrahovane fenilefrinom sa endotelom u odsustvu i prisustvu (A) L-NAME (10 μM), hidroksokobalamina (3 μM), ili ODQ (10 μM); (B) indometacina (Indo, 10 μM) i (C) kombinacije indometacin (10 μM) i L-NAME (100 μM) sa ili bez apamina (50 nM) i TRAM-a-34 (10 μM). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od eksperimenata (n = 4-7) ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).

Dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem pokazala je da postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa L-NAME, hidroksokobalaminom ili ODQ (p < 0,01 za sva poređenja) u odnosu na kontrolu na oba krvna suda, i nakon inkubacije sa indometacinom (p < 0,01) u odnosu na kontrolu na unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Sa druge strane, nije pokazana statistički značajna razlika nakon inkubacije sa indometacinom, u odnosu na kontrolu, na veni safeni ili nakon dodatne inkubacije apamina i TRAM-a-34, u odnosu na prisustvo samo kombinacije L-NAME/indometacin, na oba krvna suda (p > 0,05 za sva poređenja).

Tabela 6. Uloga različitih komponenti cGMP puta i prostaciklina u relaksaciji humane unutrašnje torakalne arterije prouzrokovanoj procijanidinom B2.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁺	7	6,99±0,02	93,4±5,8
L-NAME 100 µM	7	nr	25,5±5,0**
Kontrola E ⁺	7	6,98±0,03	92,9±6,1
Hidroksokobalamin 3 µM	7	nr	35,5±7,3**
Kontrola E ⁺	6	6,96±0,02	94,8±4,9
ODQ 10 µM	6	nr	39,9±4,8**
Kontrola E ⁺	5	7,01±0,03	93,3±6,2
Indometacin 10 µM	5	6,38±0,06**	76,1±6,9*
Kontrola E ⁺	4	7,03±0,08	93,5±8,3
L-NAME 100 µM + Indometacin 10 µM	4	nr	19,5±5,5**
L-NAME 100 µM + Indometacin 10 µM + Apamin 50 nM + TRAM-34 10 µM	4	nr	16,5±4,6**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; L-NAME, Nω-nitro-L-arginin metil ester; ODQ, 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kvinoksalin-1-on; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Tabela 7. Uloga različitih komponenti cGMP puta i prostaciklina u relaksaciji humane vene safene prouzrokovanoj procijanidinom B2.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁺	6	6,89±0,02	89,6±5,6
L-NAME 100 µM	6	nr	42,1±4,8**
Kontrola E ⁺	6	6,90±0,03	91,3±6,1
Hidroksokobalamin 3 µM	6	nr	36,5±3,5**
Kontrola E ⁺	5	6,91±0,02	94,6±5,2
ODQ 10 µM	5	5,14±0,04**	53,6±6,5*
Kontrola E ⁺	7	6,82±0,10	88,5±5,9
Indometacin 10 µM	7	6,57±0,07	65,3±4,8*
Kontrola E ⁺	4	6,90±0,03	90,5±3,4
L-NAME 100 µM + Indometacin 10 µM	4	nr	29,4±4,5**
L-NAME 100 µM + Indometacin 10 µM + Apamin 50 nM + TRAM-34 10 µM	4	nr	18,4±3,5***#

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; L-NAME, Nω-nitro-L-arginin metil estar; ODQ, 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kvinoksalin-1-on; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu; # p < 0,05 u odnosu na kombinaciju L-NAME/indometacin (t-test).

Uticaj različitih blokatora K⁺ kanala na relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene prouzrokovanu procijanidinom B2

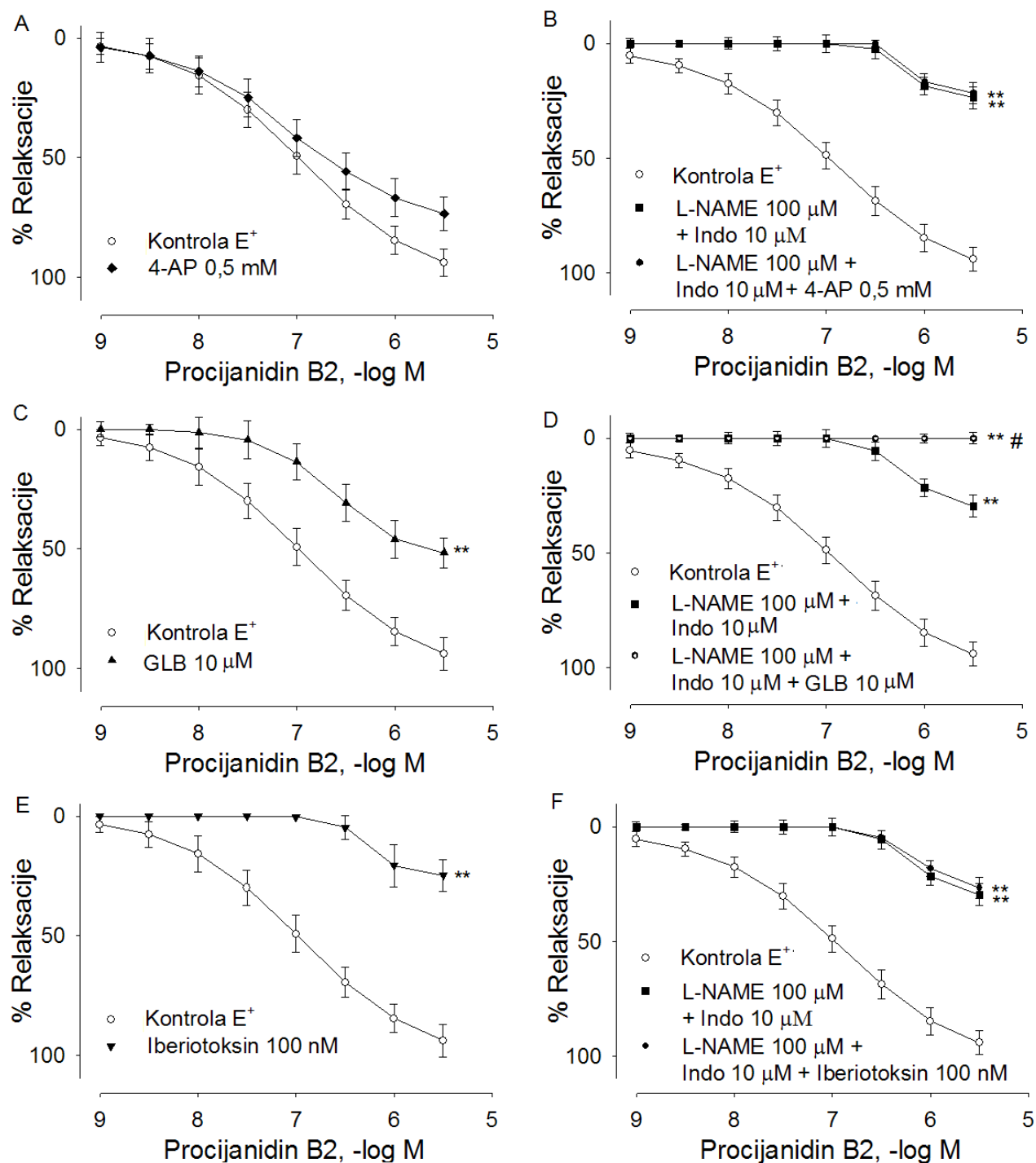
Da bi ispitali da li su, i koji K⁺ kanali uključeni u relaksantni efekat procijanidina B2 na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni, koristili smo sledeće blokatore K⁺ kanala: glibenklamid, 4-aminopiridin i iberiotoksin.

4-Aminopiridin (0,5 mM) je blago, ali značajno smanjio maksimalni efekat relaksacije unutrašnje torakalne arterije, izazvane procijanidinom B2 (Slika 22A; Tabela 8). Relaksacija vene safene indukovana procijanidinom B2 je parcijalno, ali značajno antagonizovana pretretmanom sa ovim blokatorom (Slika 23A; Tabela 9).

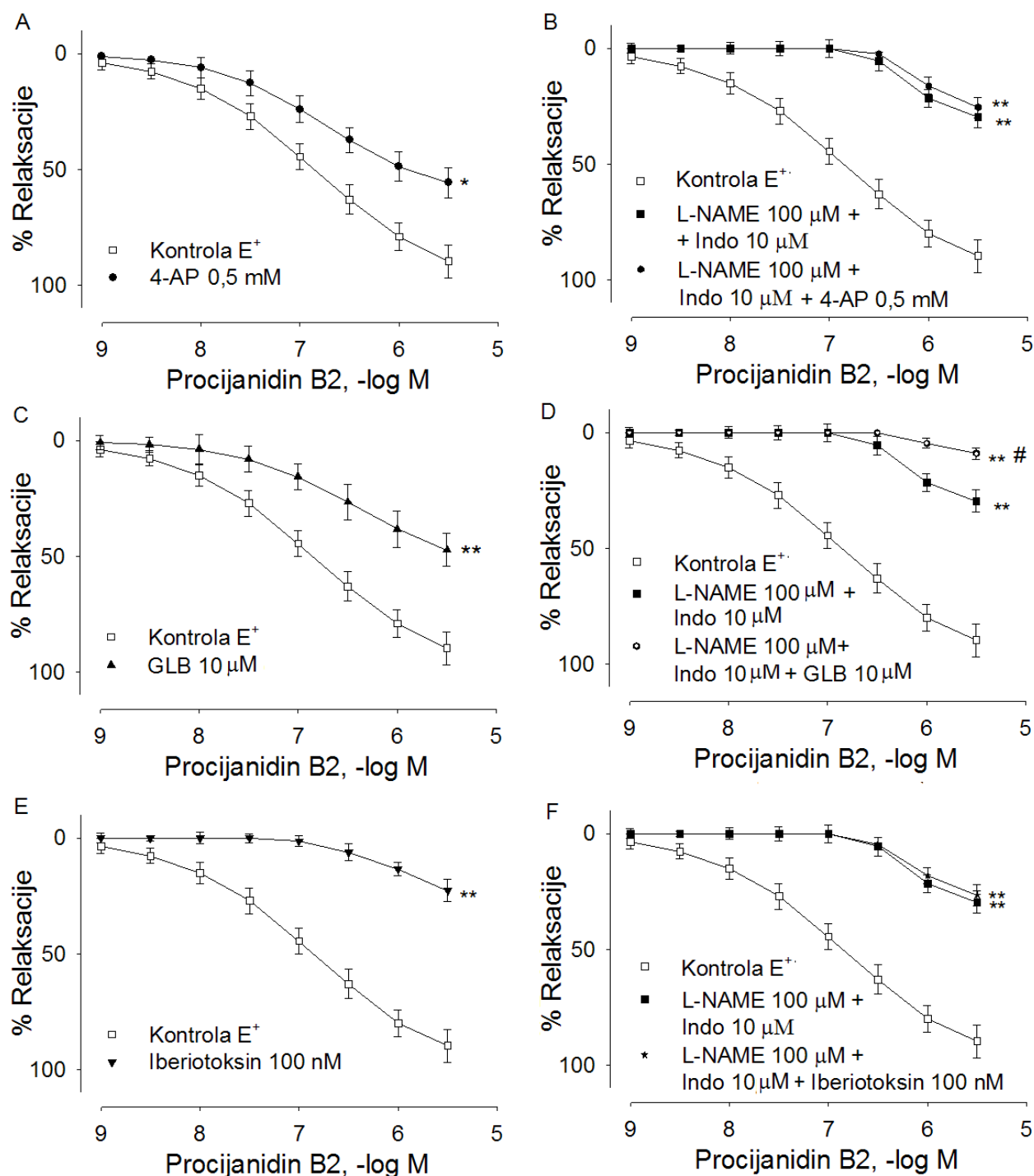
Glibenklamid (10 µM) je relaksaciju unutrašnje torakalne arterije, izazvanu procijanidinom B2, parcijalno inhibirao, dok je relaksacija vene safene prisustvom ovog blokatora značajno inhibirana (Slika 22C i 23C; Tabela 8 i 9).

Iberiotoksin (100 nM) je gotovo potpuno antagonizovao procijanidinom B2-indukovanu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije i vene safene (Slika 22E i 23E; Tabela 8 i 9).

Dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem pokazala je da postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa iberiotoksinom ili glibenklamidom (p < 0,01 za sve), u odnosu na kontrolu, na oba krvna suda, ili nakon inkubacije sa 4-aminopiridinom (p < 0,05), u odnosu na kontrolu, na veni safeni.



Slika 22. Koncentracijski-zavisne krive za procijanidin B2 dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije sa endotelom prekontrahovane fenilefrinom u odsustvu i prisustvu (A) 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM); (C) glibenklamida (GLB, 10 μM) ili (E) iberiotoksina (100 nM) i efekti pretretmana sa L-NAME (100 μM) i indometacinom (Indo, 10 μM) u odsustvu i prisustvu (B) 4-AP (0,5 mM); (D) GLB (10 μM) ili (F) iberiotoksina (100 nM). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od eksperimenata (n = 5-9). * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).



Slika 23. Koncentracijski-zavisne krive za procijanidin B2 dobijene na preparatima humane vene safene sa endotelom prekontrahovane fenilefrinom u odsustvu i prisustvu (A) 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM); (C) glibenklamida (GLB, 10 μM) ili (E) iberiotoksina (100 nM) i efekti pretretmana sa L-NAME (100 μM) i indometacinom (Indo, 10 μM) u odsustvu i prisustvu (B) 4-AP (0,5 mM); (D) GLB (10 μM) ili (F) iberiotoksina (100 nM). Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od eksperimenata (n = 5). * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).

Tabela 8. Uticaj blokatora K^+ kanala na relaksaciju humane izolovane unutrašnje torakalne arterije prouzrokovanu procijanidinom B2.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁺	5	7,02±0,03	94,5±6,9
Iberiotoksin 100 nM	5	nr	24,9±6,7**
Kontrola E ⁺	7	6,94±0,04	94,0±6,0
Glibenklamid 10 µM	7	5,65±0,32**	51,6±6,2**
Kontrola E ⁺	9	6,98±0,04	93,8±5,7
4-Aminopiridin 0,5 mM	9	6,60±0,15	73,4±7,1*

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Tabela 9. Uticaj blokatora K^+ kanala na relaksaciju humane izolovane vene safene prouzrokovanu procijanidinom B2.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁺	5	6,91±0,03	88,8±3,7
Iberiotoksin 100 nM	5	nr	22,6±3,5**
Kontrola E ⁺	5	6,83±0,05	93,0±5,9
Glibenklamid 10 µM	5	nr	47,2±6,5**
Kontrola E ⁺	5	6,85±0,04	86,5±5,3
4-Aminopiridin 0,5 mM	5	5,84±0,06**	55,6±5,5**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Uticaj blokatora K^+ kanala u prisustvu kombinacije L-NAME/indometacin na relaksaciju izolovane unutrašnje torakalne arterije i vene safene indukovanu procijanidinom B2

U prisustvu L-NAME i indometacina, procijanidinom B2-indukovana relaksacija unutrašnje torakalne arterije je bila potpuno antagonizovana dodatkom glibenklamida (Slika 22D; Tabela 10), dok je relaksacija vene safene dodatnim prisustvom ovog blokatora bila značajno redukovana (Slika 23D; Tabela 11). Suprotno, dodatkom 4-aminopiridina ili iberiotoksina, relaksacija prouzrokovana procijanidinom B2 je bila skoro nepromenjena na oba krvna suda (Slika 22B,22F,23B,23F; Tabele 10 i 11).

Dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem pokazala je da postoji statistički značajna razlika nakon dodatne inkubacije sa glibenklamidom (p < 0,01), a da ne postoji statistički značajna

razlika nakon dodatne inkubacije sa 4-aminopiridinom ili iberiotoksinom ($p > 0,05$), u odnosu na prisustvo samo L-NAME/indometacin kombinacije, na oba krvna suda.

Tabela 10. Efekat blokatora K^+ kanala u prisustvu kombinacije L-NAME/indometacin na relaksaciju humane unutrašnje torakalne arterije prouzrokovanu procijanidinom B2.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM	4	nr	29,5±8,2
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM + 4-Aminopiridin 0,5 mM	4	nr	26,5±8,5
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM	4	nr	32,3±7,0
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM + Iberiotoksin 100 nM	4	nr	30,3±4,5
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM	4	nr	27,8±6,7
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM + Glibenklamid 10 µM	4	nr	0,0±0,0**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; Indo, indometacin; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); ** $p < 0,01$ u odnosu na grupu eksperimenata sa L-NAME/indometacin (t-test).

Tabela 11. Efekat blokatora K^+ kanala u prisustvu kombinacije L-NAME/indometacin na relaksaciju humane vene safene prouzrokovanu procijanidinom B2.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM	5	nr	25,5±4,2
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM + 4-Aminopiridin 0,5 mM	5	nr	23,5±5,5
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM	4	nr	30,3±4,0
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM + Iberiotoksin 100 nM	4	nr	27,5±6,5
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM	7	nr	28,3±8,7
L-NAME 100 µM/Indo 10 µM + Glibenklamid 10 µM	7	nr	7,1±8,9**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; Indo, indometacin; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); ** $p < 0,01$ u odnosu na grupu eksperimenata sa L-NAME/indometacin (t-test).

Efekat procijanidina B2 na influks ekstracelularnog Ca^{2+} u glatke mišićne ćelije

Nakon kontrakcije uzrokovane visokim K^+ , dodavanje procijanidina B2 (0,001–3 μM) indukovalo je parcijalnu koncentracijski-zavisnu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije (Slika 24A; Tabela 12) i vene safene (Slika 25A; Tabela 12). Nakon inkubacije sa nifedipinom (1 μM), prstenovi oba krvna suda se nisu kontrahovali dodatkom 80 mM K^+ (podaci nisu prikazani).

Nifedipin (1 μM) je na unutrašnjoj torakalnoj arteriji značajno uticao samo na relaksacije uzrokovane najvišim koncentracijama procijanidina B2 (Slika 24B; Tabela 13), dok je koncentracijski-zavisna kriva, dobijena na preparatima vene safene, pomerena u desno, uz smanjenje maksimalnog efekta (Slika 25B; Tabela 13).

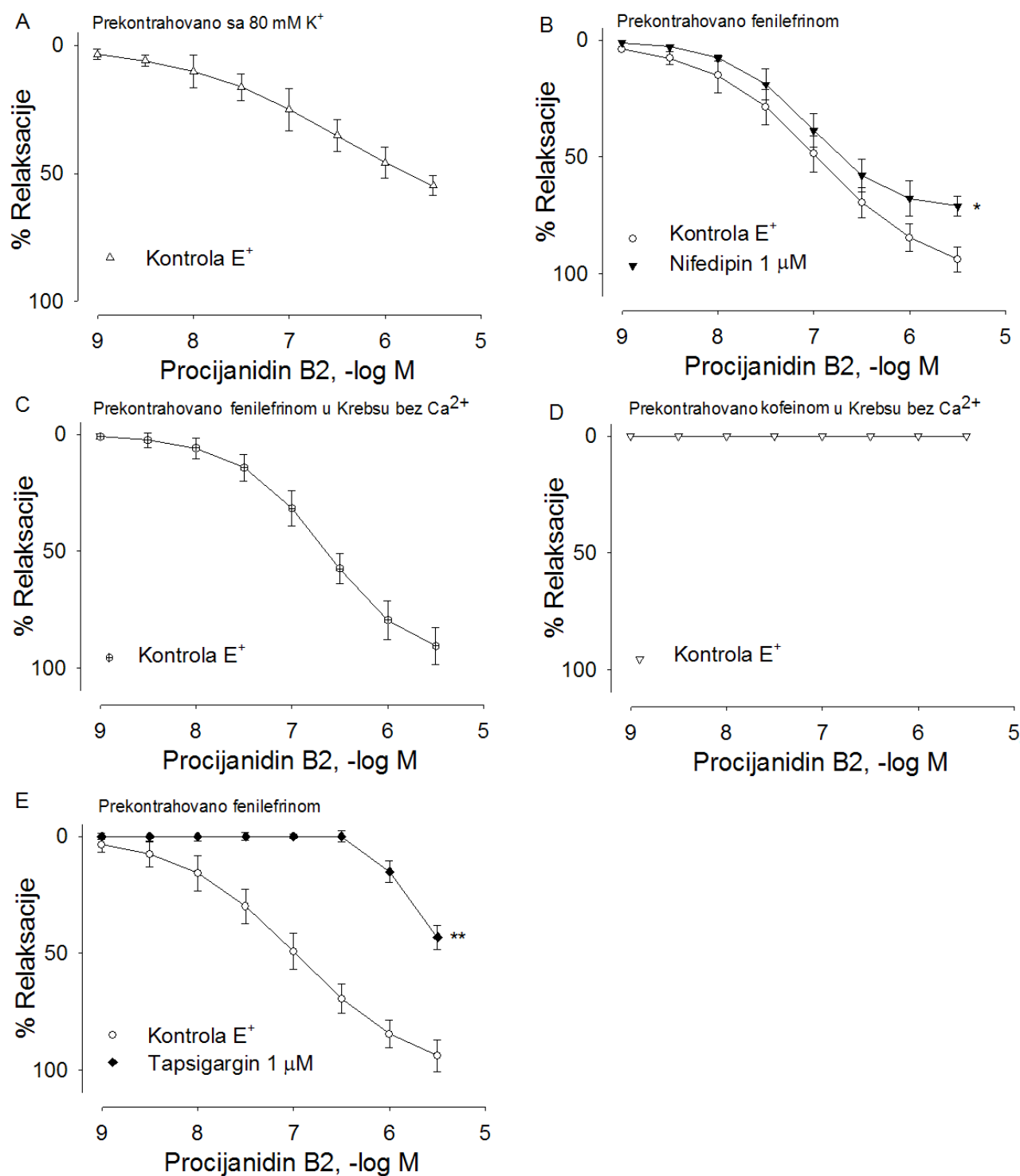
Dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem pokazala je da na unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa nifedipinom u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$ za oba).

Efekat procijanidina B2 na oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} u glatkim mišićnim ćelijama

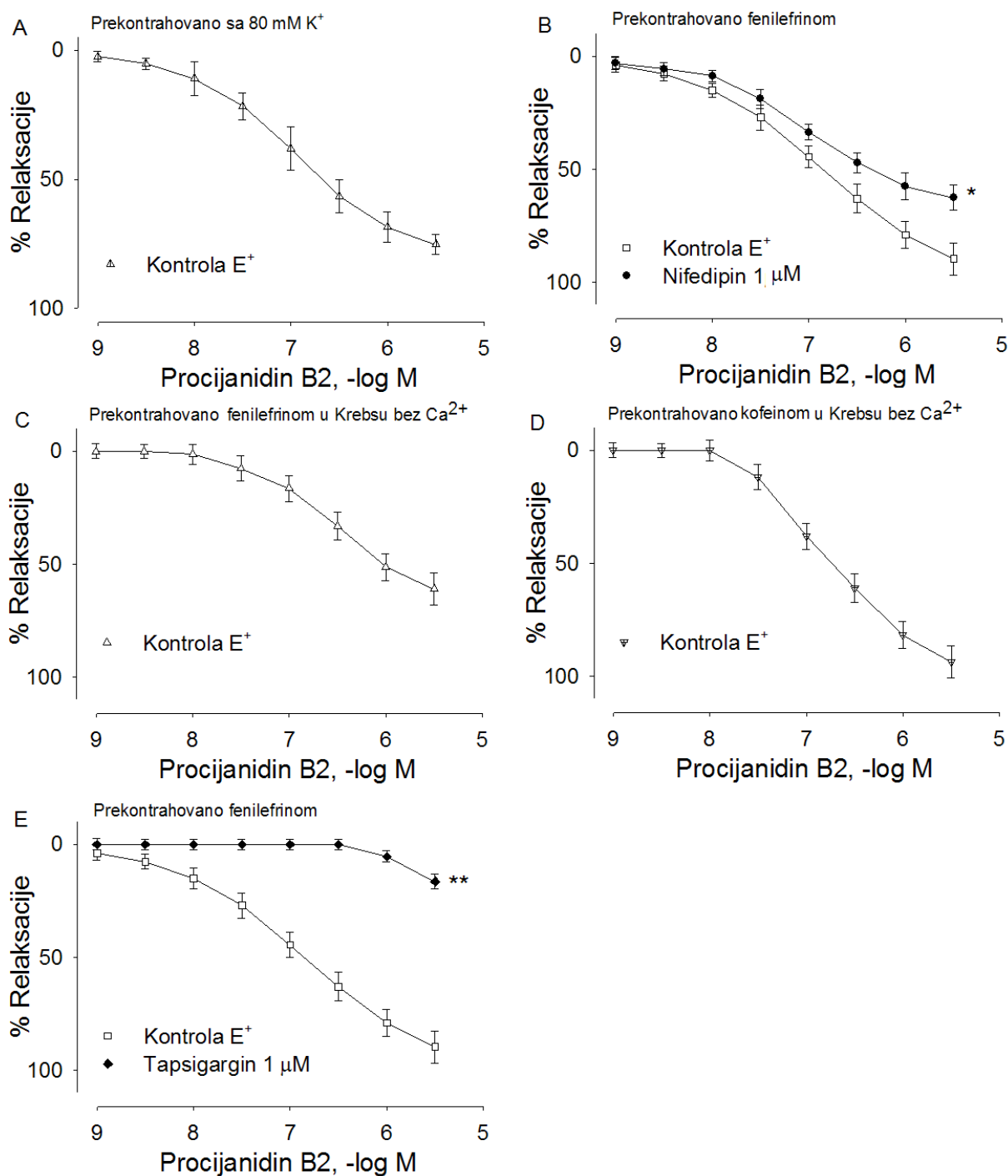
U Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} , dodavanje kumulativnih koncentracija procijanidina B2 uzrokovalo je koncentracijski-zavisnu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije, prethodno kontrahovane fenilefrinom (10 μM) (Slika 24C; Tabela 12), dok na kontrakciju indukovanu kofeinom (25 mM) nije bilo uticaja (Slika 24D; Tabela 12). U slučaju vene safene, kumulativno dodavanje procijanidina B2 pod istim uslovima, uzrokovalo je parcijalnu relaksaciju segmenata prethodno kontrahovanih i fenilefrinom i kofeinom (Slika 25C i 25D; Tabela 12).

U normalnom Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru, tapsigargin (1 μM) je potpuno onemogućio relaksaciju unutrašnje torakalne arterije uzrokovanu niskim koncentracijama procijanidina B2, a prethodno kontrahovane fenilefrinom. Vazorelaksantni efekat većih koncentracija procijanidina B2 (1–3 μM) bio je značajno umanjen u poređenju sa kontrolom (Slika 24E; Tabela 13). Sa druge strane, relaksacija vene safene prouzrokovana procijanidinom B2 je prisustvom tapsigargina drastično redukovana (Slika 25E; Tabela 13).

Dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem pokazala je da na unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa tapsigarginom u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$ za oba).



Slika 24. Koncentracijski-zavisne krive za procijanidin B2 dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije (A) prekontrahovane K^+ (80 mM); (B) prekontrahovane fenilefrinom u prisustvu i odsustvu nifedipina (1 μM); (C) prekontrahovane fenilefrinom (10 μM) u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (D) prekontrahovane kofeinom (25 mM) u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (E) prekontrahovane fenilefrinom u prisustvu i odsustvu tapsigargina (1 μM) u normalnom Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SD od eksperimenata ($n = 4-9$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).



Slika 25. Koncentracijski-zavisne krive za procijanidin B2 dobijene na preparatima humane vene safene (A) prekontrahovane K^+ (80 mM); (B) prekontrahovane fenilefrinom u prisustvu i odsustvu nifedipina (1 μM); (C) prekontrahovane fenilefrinom (10 μM) u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (D) prekontrahovane kofeinom (25 mM) u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (E) prekontrahovane fenilefrinom u prisustvu i odsustvu tapsigargina (1 μM) u normalnom Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru. Efekti su izraženi kao procenat maksimalne relaksacije do povratka na baznu liniju. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SD od eksperimenata (n = 4-8). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (dvofaktorska analiza varijanse sa ponavljanjem).

Tabela 12. Procijanidinom B2 izazvana relaksacija prstenova izolovane humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene prekontrahovane fenilefrinom ili kofeinom u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} , ili visokim K^+ u normalnom Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru.

	n	pD_2	$E_{\max}$ (%)
Humana unutrašnja torakalna arterija			
(1) Fenilefrin (10 μM)	6	$6,64 \pm 0,03$	$90,5 \pm 8,0$
(2) Kofein (25 mM)	4	nr	$0,0 \pm 0,0$
(3) K^+ (80 mM)	9	$5,65 \pm 0,32$	$55,5 \pm 7,7$
Humana vena safena			
(1) Fenilefrin (10 μM)	4	$5,89 \pm 0,11$	$57,8 \pm 3,0$
(2) Kofein (25 mM)	4	$6,73 \pm 0,03$	$93,6 \pm 9,1$
(3) K^+ (80 mM)	8	$6,73 \pm 0,06$	$73,7 \pm 6,5$

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ SD. n, broj eksperimenata; $\text{pD}_2 = -\log \text{EC}_{50}$; $E_{\max}$, maksimalna relaksacija; nr, nije računato (zbog male efikasnosti) (1) Preparati su prekontrahovani fenilefrinom u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} (2) Preparati su prekontrahovani kofeinom u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} ; (3) Preparati su prekontrahovani K^+ (80 mM).

Tabela 13. Uticaj procijanidina B2 na intracelularni i ekstracelularni Ca^{2+} humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene.

	n	pD_2	$E_{\max}$ (%)
Humana unutrašnja torakalna arterija			
Kontrola E^+	5	$6,95 \pm 0,08$	$94,5 \pm 5,2$
Nifedipin 1 μM	5	$6,90 \pm 0,10$	$71,0 \pm 4,3^*$
Kontrola E^+	8	$7,00 \pm 0,04$	$93,5 \pm 6,9$
Tapsigargin 1 μM	8	nr	$43,1 \pm 5,2^{**}$
Humana vena safena			
Kontrola E^+	5	$6,88 \pm 0,04$	$89,5 \pm 6,9$
Nifedipin 1 μM	5	$6,24 \pm 0,06^*$	$62,5 \pm 5,5^*$
Kontrola E^+	5	$6,81 \pm 0,09$	$89,6 \pm 5,6$
Tapsigargin 1 μM	5	nr	$16,4 \pm 3,2^{**}$

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ SD. n, broj eksperimenata; $\text{pD}_2 = -\log \text{EC}_{50}$; $E_{\max}$, maksimalna relaksacija; E^+ , preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (t-test).

DISKUSIJA

Poslednjih dvadesetak godina flavanoli su jedna od najčešće ispitivanih grupa flavonoida u biomedicinskim naukama. Pretragom PubMed indeksne baze podataka na temu „*flavonoidi i njihovi biološki efekti*“, dobija se preko 1200 publikovanih radova. Podaci o dilatatornom efektu pojedinačnih flavonoida na izolovanim humanim krvnim sudovima su minimalni i dosta oskudni (Goncalves i sar., 2009), dok, prema dostupnim podacima, naša studija je prva koja je ispitivala dejstvo nekog flavanola na krvnim sudovima humanog porekla. Prvi put je pokazan relaksantni efekat i mehanizmi delovanja (-)-epikatehina na venskom i arterijskom bajpas graftu, dok je relaksantni potencijal katehina do sada dokumentovan na više tipova arterijskih krvnih sudova animalnog porekla (Aggio i sar., 2003; Duarte i sar., 1993; Huang i sar., 1998,1999,2000). Dodatno, ovo istraživanje predstavlja jedno od malobrojnih koje je ispitivalo vazorelaksantna svojstva izolovanog procijanidina i njegove moguće mehanizme delovanja. Naime, prethodno saopšteni rezultati su ukazali da ekstrakti različitog porekla bogati procijanidinima indukuju snažnu endotel-zavisnu relaksaciju više tipova krvnih sudova (Aldini i sar., 2003; Byun i sar., 2014; Matsui i sar., 2009). Međutim, u većini studija, krvni sudovi su bili animalnog porekla i korišćeni su biljni ekstrakti, tako da nije bilo moguće proceniti doprinos individualnih supstanci ukupnom vazorelaksantnom efektu.

Koncentracijski-zavisne krive relaksacije dobijene u našoj studiji pokazuju da su prvi merljivi efekti (-)-epikatehina na unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni vidljivi pri koncentracijama 0,3 i 1 μM , redom, dok procijanidin B2 svoj početni efekat ostvaruje pri koncentraciji 3 nM, na oba krvna suda. U većem broju humanih studija baziranim na dijetarnim intervencijama, izmerena koncentracija (-)-epikatehina u plazmi nakon unosa crne čokolade, je u opsegu mikromolarnih koncentracija, dok procijanidin B2 dostiže niske nanomolarne koncentracije (Baba i sar., 2000; Richelle i sar., 1999). Imajući ovo u vidu, može se pretpostaviti da (-)-epikatehin i procijanidin B2, kod pojedinaca koji redovno konzumiraju hranu bogatu flavanolima, može imati značajan uticaj na vaskularni tonus.

Konačno, pošto se humana unutrašnja torakalna aretrija i vena safena najčešće koriste kao graftovi tokom bajpas operacije, pokazan relaksantni efekat indukovani ispitivanim flavanolima mogao bi značajno da doprinese produženju njihove dugoročne prohodnosti.

MEHANIZAM VAZODILATATORNOG EFEKTA (-)-EPIKATEHINA NA IZOLOVANIM SEGMENTIMA VENE SAFENE I UNUTRAŠNJE TORAKALNE ARTERIJE

Uklanjanje endotela nije značajno uticalo na relaksaciju unutrašnje torakalne arterije i vene safene izazvane (-)-epikatehinom, što jasno ukazuje da je mehanizam vazodilatacije endotel-nezavisan. Ovakav rezultat je u korelaciji sa rezultatima rada Duarte i sar. (1993), prve studije koja je proučavala efekat (-)-epikatehina na nekom izolovanom krvnom sudu (aorta pacova). Međutim, u literaturi se mogu naći i nalazi koji ukazuju na značajan uticaj (-)-epikatehina na sintezu i oslobađanje relaksantnih faktora poreklom iz endotela, prvenstveno NO (Aggio i sar., 2013; Huang i sar., 2000, 1999). Razlog tome može biti različit stepen endotelne disfunkcije izolovanih preparata, koja dovodi do značajne varijabilnosti u endotel-zavisnoj relaksaciji (Hurauk i sar., 1999). Stepenn endotelne disfunkcije je u jakoj pozitivnoj korelaciji sa prisustvom različitih faktora rizika, kao što su povećan serumski holesterol, pušenje, hipertenzija, pozitivna porodična anamneza, ishemijska bolest srca ili starost pacijenta (Vita i sar., 1990). Kako većina pacijenata u ovoj studiji ima jedan ili više faktora rizika, moguće je da je kod njih prisutna disfunkcija endotela u određenom stepenu, te bi endotel-nezavisno delovanje (-)-epikatehina moglo imati veliki terapijski i klinički potencijal.

Podaci iz eksperimentalnih studija ukazuju da je delovanje (-)-epikatehina tkivno- i vrsta-specifično. Tako, na primer, potentnost (-)-epikatehina pokazana na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji (7,4 μM i 13,8 μM , sa i bez endotela, redom) veća je u poređenju sa potentnošću izmerenom na mezenteričnoj arteriji pacova (199 μM i 398 μM , sa i bez endotela, redom) (Huang i sar., 2000). Dalje, efikasnost (-)-epikatehina je u studiji na aorti pacova ($E_{\text{max}} = 46,3\%$) (Aggio i sar., 2013) bila značajno manja nego u našoj studiji na izolovanim segmentima unutrašnje torakalne arterije ($E_{\text{max}} = 95,7\%$) i

vene safene ($E_{\max} = 91,3\%$). Konačno, poređenjem srednjih efektivnih koncentracija (-)-epikatehina dobijenih na izolovanim segmentima humane unutrašnje torakalne arterije sa i bez endotela, redom (7,4 mM i 13,8 mM) i humane vene safene sa i bez endotela (44,6 mM i 57,5 mM), zaključujemo da je unutrašnja torakalna arterija signifikantno osetljivija od vene safene na delovanje (-)-epikatehina. Ovo se može objasniti značajnom razlikom u anatomskoj strukturi arterija i vena: vene imaju tanji zid, valvule za prevenciju retrogradnog toka krvi, veću komplijansu i više kolagena, ali manje elastina i glatkih mišićnih ćelija od arterijskih krvnih sudova (Shapherd i Vanhoutte, 1975). Takođe, opisano je da su vene, za razliku od arterija, manje osetljive na delovanje vazodilatatornih metabolita iz cirkulacije, i da pri tome imaju intenzivniju simpatičku inervaciju (Lewis i Mellander 1962; Mellander i Lewis, 1963).

U literaturi su opisani različiti mehanizmi kojima je posredovana vazodilatatorna aktivnost jedinjenja poreklom iz biljaka. Među najznačajnijima su, pored aktivacije NO/cGMP puta, blokada Ca^{2+} kanala ili aktivacija K^+ kanala (Luna-Vazquez i sar., 2013). Imajući u vidu brojne primere modulacije K^+ kanala različitim flavonoidima (Ko i sar., 2009; Matsui i sar., 2009; Saponara i sar., 2006; Jin i sar., 2007), jedan od podciljeva našeg istraživanja bio je da definišemo tipove K^+ kanala posredstvom kojih (-)-epikatehin ispoljava svoj vazodilatatorni efekat, što je postignuto primenom specifičnih blokatora K_V , K_{ATP} i K_{Ca} kanala.

Za ispitivanje uloge K_V kanala korišćen je 4-aminopiridin u koncentraciji (0,5 mM) u kojoj ima sposobnost blokade ovih kanala, ali nema efekat na BK_{Ca} ili K_{IR} kanale (Ko i sar., 2008), niti utiče na funkciju K_{ATP} kanala (Kitamura i Kamouchi, 1993). Značajno smanjenje vazodilatacije unutrašnje torakalne arterije i vene safene izazvane (-)-epikatehinom u prisustvu 4-aminopiridina ukazuje na važnu ulogu K_V kanala u ostvarivanju efekta (-)-epikatehina. K_V kanali, kao najveća grupa K^+ kanala, značajno doprinose regulaciji funkcije vaskularnih glatkih mišića, pa interakcija (-)-epikatehina sa ovim kanalima može biti od velikog kliničkog značaja (Gutman i sar., 2005).

Literaturni podaci navode da je najzastupljeniji podtip K_V kanala u vaskulaturi K_{V1} (Cox i Rusch, 2002), i da je u humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji pokazana ekspresija $\text{K}_{V1.3}$ i $\text{K}_{V1.5}$ kanala (Bonnet i sar., 2009; Cheong i sar., 2011; Afsar i sar., 2016). Daljim ispitivanjem podtipova K_V kanala uključenih u mehanizam dejstva (-)-epikatehina, upotrebljen je margatoksin. Izolovan iz otrova škorpije *Centruroides margaritatus*, ovaj toksin predstavlja potentan i selektivan blokator $\text{K}_{V1.3}$ kanala (Garcia Calvo i sar., 1993). Dobijeni rezultati pokazali su da je margatoksin blokirao relaksaciju vene safene i unutrašnje torakalne arterije skoro podjednako kao i 4-aminopiridin, što inicira pretpostavku da je aktivacija $\text{K}_{V1.3}$ kanala deo mehanizma dejstva (-)-epikatehina na oba krvna suda. Inače, $\text{K}_{V1.3}$ kanali imaju značajnu ulogu u proliferaciji i migraciji vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, što može rezultirati neointimalnom hiperlazijom i daljim remodelovanjem krvnih sudova (Cheong i sar., 2011).

K_{ATP} su jedinstvena klasa jonskih kanala eksprimirana u različitim tkivima, uključujući srčani i vaskularni glatki mišić. Učestvuju u različitim fiziološkim procesima, kao što je kontrola vaskularnog tonusa i zaštita kardiomiocita od ishemijskog oštećenja (Martin i sar., 2013). Promena u ekspresiji i funkciji K_{ATP} kanala u direktnoj je korelaciji sa smanjenom vazodilatacijom (Climent et al., 2014). Da bi ispitali da li K_{ATP} kanali doprinose relaksantnom efektu (-)-epikatehina, koristili smo glibenklamid, selektivni blokator ovih kanala. U našem istraživanju, glibenklamid je parcijalno inhibirao (-)-epikatehinom indukovanu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije, dok je na veni safeni značajno redukovao samo maksimalni efekat relaksacije. Ovi nalazi sugerišu da su K_{ATP} kanali, bar delimično, uključeni u efekat (-)-epikatehina na arterijskom krvnom sudu, a da značajnu ulogu u dilataciji venskog krvnog suda ostvaruju tek upotrebom visokih koncentracija ovog flavanola. Dostupni literaturni podaci se delimično razlikuju od rezultata naše studije. Tako, Huang i sar. (1999, 1998) potpuno isključuju mogućnost da je aktivacija K_{ATP} kanala na glatkoj muskulaturi mezenterične arterije pacova deo vazorelaksantnog mehanizma (-)-epikatehina. Ovaj nesklad u rezultatima može biti posledica drugačije

ekspresije K^+ kanala između arterijskih segmenata različitog porekla, ili dva segmenta istog krvnog suda (Shao i sar., 2011). Takođe, uočavamo razlike u metodologiji između studija. Tako, u radu Huanga i sar. (1998) je korišćena samo jedna, visoka, koncentracija (-)epikatehina (bez konstruisanja koncentracijski-zavisne krive), a glibenklamid je aplikovan u koncentraciji skoro tri puta nižoj nego u našoj studiji ($3 \mu\text{M}$ vs. $10 \mu\text{M}$), što je možda bilo nedovoljno za značajniju blokadu K_{ATP} kanala.

BK_{Ca} kanali imaju važnu ulogu u ispoljavanju vazorelaksantnog delovanja različitih prirodnih supstanci (Hu i Zhang, 2012). U cilju ispitivanja uloge BK_{Ca} kanala u endotel-nezavisnoj relaksaciji unutrašnje torakalne arterije i vene safene uzrokovanoj (-)epikatehinom, korišćen je iberiotoksin, visoko selektivan blokator ovih kanala (Ko i sar., 2008). Skoro potpuno antagonizovanje efekta (-)epikatehina na oba ispitivana krvna suda, u prisustvu iberiotoksina, ukazuje na značajno učešće ovih kanala u mehanizmu dejstva (-)epikatehina. Potencijalna važnost ovog rezultata ogleda se u činjenici da su BK_{Ca} kanali široko zastupljeni u vaskularnoj glatkoj muskulaturi, gde participiraju u održavanju membranskog potencijala, regulaciji tonusa, i učestvuju u kompenzatornom mehanizmu koji se odupire vazokonstrikciji. Dodatno, razna patološka stanja, kao što su hipertenzija, dijabetes i ishemijska bolest srca, usko su povezana sa promenom funkcije ovih kanala.

Iako predominantno eksprimirani na glatkoj muskulaturi, BK_{Ca} kanali mogu biti lokalizovani i na endotelnim ćelijama, i biti involvirani u proces endotelne hiperpolarizacije, praćene povećanim stvaranjem NO ili prostaciklina (Sandow i Grayson, 2009). Imajući u vidu da je u našoj studiji (-)epikatehinom-indukovana relaksacija posredovana isključivo endotel-nezavisnim mehanizmima, ciljno mesto delovanja (-)epikatehina su BK_{Ca} kanali prevashodno lokalizovani na glatkoj muskulaturi unutrašnje torakalne arterije i vene safene. S druge strane, rezultati istraživanja Huanga i sar. (1999) pokazuju (-)epikatehinom-indukovanu dilataciju endotel-intaktne pacovske aorte posredovanu NO-zavisnom aktivacijom BK_{Ca} kanala. Razlog ove neusaglašenosti može biti korišćenje različitih krvnih sudova, što za posledicu ima varijaciju u strukturi ili ekspresiji BK_{Ca} kanala. Poznato je da su ovi K_{Ca} kanali tetrameri, sastavljeni od α -subjedinica, koje formiraju poru, i pomoćnih β -subjedinica. α -Subjedinica je ubikvitarno prisutna u tkivima sisara, kodirana je jednim genom (*KCNMA1*), ali postoji u nekoliko izoformi (Hu i Zhang, 2012), što može delom objasniti varijaciju karakteristika BK_{Ca} kanala prisutnih u različitim tkivima (osetljivost na promenu potencijala, fosforilacija od strane PKA ili PKG). Dodatno, ekspresija pomoćnih β -subjedinica ($\beta 1$ - $\beta 4$) je tkivno specifična (Ledoux i sar., 2006; Hu i Zhang, 2012).

Razlika u rezultatima može proizilaziti i iz činjenice da razne fiziološke promene (starenje i/ili razvoj, trudnoća), ili patofiziološka stanja doprinose promeni BK_{Ca} kanala (Hu i Zhang, 2012). Naime, tokom hipertenzije dolazi do povećane ekspresije α - i $\beta 1$ -subjedinice, porasta protoka jonske struje kroz BK_{Ca} kanale, i posledičnog porasta mirovnog membranskog potencijala glatke muskulature (Liu i sar., 1997). Takođe, zabeležena je i pojava nishodne regulacije $\beta 1$ -subjedinice kanala, sa posledičnom smanjenom sposobnošću Ca^{2+} da aktivira ove kanale (Amberg i sar., 2003). Prema tome, vrlo je moguće da je različit efekat (-)epikatehina na BK_{Ca} kanale na različitim krvnim sudovima posledica tkivno specifične ekspresije subjedinica kanala, ili njihove izoforme, ali i činjenice da su u našoj studiji korišćeni uzorci dobijeni od pacijenata sa prisutnim različitim kardiovaskularnim komorbiditetima.

Najzad, ako poredimo ulogu K^+ kanala u efektu (-)epikatehina na humanoj veni safeni, sa rezultatima dobijenim na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, možemo zaključiti da je slična u pogledu učešća K_{V} i BK_{Ca} kanala, ali se razlikuje u pogledu K_{ATP} kanala u korist efekta (-)epikatehina ostvarenog na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Ova odstupanja mogu imati nekoliko objašnjenja. Prvo, razlika u odgovoru na (-)epikatehin između humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije, kao i između krvnih sudova čoveka i pacova, ukazuje na to da je mehanizam relaksacije izazvane (-)epikatehinom specifičan za određeno tkivo i vrstu. Osim toga, pokazano je da ekspresija K^+ kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama varira između vaskularnih segmenata, krvnih sudova različite veličine, i samih ćelija pojedinih vaskularnih segmenata (Cox, 2005). Dodatno,

kako je već napomenuto, uloge svih pomenutih K^+ kanala u vazodilataciji mogu biti izmenjene u mnogim patofiziološkim stanjima (hipertenzija, ateroskleroza, dijabetes i ishemija), a naši rezultati su dobijeni na krvnim sudovima pacijenata sa evidentnim vaskularnim oboljenjima.

Ca^{2+} deluje kao intracelularni glasnik kontrolišući mnoge ćelijske procese, uključujući rast i diferencijaciju ćelija, kao i kontraktilnu sposobnost glatke muskulature. Koncentracija intracelularnog Ca^{2+} održava se u uskom opsegu, i regulisana je kako ulaskom ekstracelularnog Ca^{2+} , putem voltažno-zavisnih Ca^{2+} -kanala, tako i aktivnošću endoplazmatskog retikuluma.

Literaturni podaci sugerišu da inhibicija kretanja Ca^{2+} može doprineti relaksaciji prouzrokovanoj (-)-epikatehinom (Huang i sar., 1999, 1998). Stoga, kako bi se ispitala sposobnost ovog flavanola da inhibira influks ekstracelularnog Ca^{2+} , unutrašnja torakalna arterija i vena safena su prekontrahovane K^+ u visokoj koncentraciji. Pod ovim uslovima dolazi do depolarizacije membrane glatkih mišićnih ćelija i otvaranja Ca^{2+} kanala, što rezultuje influksom ekstracelularnog Ca^{2+} i aktivacijom kontraktilnih elemenata (Karaki i sar., 1984). Nalazi naše studije pokazuju da: (1) (-)-epikatehin značajno relaksira prstenove unutrašnje torakalne arterije i vene safene kontrahovane pod ovim okolnostima; (2) prisustvo nifedipina u potpunosti onemogućava kontrakciju krvnih sudova visokim K^+ ; kao i da je (3) (-)-epikatehinom-indukovana relaksacija vene safene bila delimično redukovana prisustvom nifedipina. Sagledavajući ih, može se zaključiti da je i inhibicija influksa Ca^{2+} putem voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala L-tipa, između ostalog, sastavni deo mehanizma relaksantnog dejstva (-)-epikatehina, što je u saglasnosti sa prethodnim literaturnim podacima (Huang i sar., 1998).

Pored toga, u našoj studiji je ispitivan i potencijalni uticaj (-)-epikatehina na intracelularni Ca^{2+} , odnosno mogućnost da (-)-epikatehin svoj efekat ostvaruje inhibicijom oslobađanja intracelularnog Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog retikuluma i/ili stimulacijom preuzimanja ovog jona pomoću SERCA.

S obzirom da je oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} uglavnom regulisano preko IP_3 i rijanodinskog receptorskog sistema, ispitivan je efekat (-)-epikatehina na kontrakcije izazvane fenilefrinom i kofeinom u Krebs-Ringerovom rastvoru bez Ca^{2+} . U uslovima kada je ekstracelularni Ca^{2+} odsutan, kontrakcija fenilefrinom posledica je oslobađanja intracelularnog Ca^{2+} deponovanog u sarkoplazmatskom retikulumu preko aktivacije IP_3 kaskade. S druge strane, kofein je aktivator rijanodinskih receptora lokalizovanih na sarkoplazmatskom retikulumu, a intracelularni Ca^{2+} koji se oslobađa preko ovih receptora ima značajnu ulogu u indukciji ekscitacije i kontrakcije glatke muskulature. Naši rezultati pokazuju da (-)-epikatehin potpuno relaksira prstenove unutrašnje torakalne arterije bez obzira da li su prekontrahovani fenilefrinom ili kofeinom, u medijumu bez Ca^{2+} , što sugeriše da ispitivani flavanol može redukovati oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} , verovatno i preko IP_3 sistema i preko rijanodinskih receptora na ovom krvnom sudu. Sa druge strane, nalaz da na veni safeni, pod istim uslovima, (-)-epikatehin relaksira samo prstenove prekontrahovane fenilefrinom, a da na segmente prekontrahovane kofeinom nema nikakav efekat, ukazuje da u ovom krvnom sudu ispitivani flavanol intereaguje samo sa IP_3 sistemom sarkoplazmatskog retikuluma. Dobijeni rezultat na veni safeni dosta korelira, dok se rezultat dobijen na arterijskom krvnom sudu samo delimično poklapa sa podacima publikovanim u studiji Huanga i sar. (1998), u kojoj kofeinom-indukovana kontrakcija mezenterične arterije pacova u rastvoru bez Ca^{2+} nije bila značajno inhibirana (-)-epikatehinom. Moguća objašnjenja za heterogenost ovih rezultata leže u razlikama eksperimentalnih uslova koji su primenjivani: (1) korišćena je različita koncentracija kofeina; (2) Huang i sar. (1998) su za relaksaciju koristili samo jednu koncentraciju (-)-epikatehina (300 μM), dok je u našoj studiji korišćen opseg kumulativnih koncentracija (0,1 – 500 μM). Ovi rezultati još jednom naglašavaju da je mehanizam dejstva (-)-epikatehina tkivno- i vrsta-specifičan.

Na kraju, da bismo ispitali da li mehanizam relaksantnog delovanja (-)-epikatehina uključuje i stimulaciju preuzimanja Ca^{2+} u endoplazmatski retikulum posredstvom SERCA, korišćen je selektivni blokator ove pumpe, tapsigargin. Dobijeni rezultati upućuju da je aktivacija SERCA značajna za

ispoljavanje relaksantnog efekta (-)-epikatehina na oba krvna suda, ali da je njen doprinos veći na veni safeni nego na unutrašnjoj torakalnoj arteriji.

Sumirajući mehanizam vazorelaksantnog delovanja (-)-epikatehina, možemo reći da ovaj flavanol izaziva snažnu endotel-nezavisnu relaksaciju humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene prekontrahovane fenilefrinom. U mehanizam endotel-nezavisnog vazorelaksantnog dejstva verovatno su uključeni 4-aminopiridin-senzitivni i margatoksin-senzitivni K_V kanali, kao i BK_{Ca} i K_{ATP} kanali. Pored toga, pokazano je da (-)-epikatehin inhibira influks ekstracelularnog Ca^{2+} , redukuje oslobađanje, ali i stimuliše preuzimanje intracelularnog Ca^{2+} u sarkoplazmatski retikulum oba krvna suda.

MEHANIZAM RELAKSANTNOG EFEKTA PROCIJANIDINA B2 NA UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI I VENI SAFENI

Imajući u vidu da disfunkcija endotela, klinički manifestovana kao smanjena endotel-zavisna vazodilatacija, ima ulogu u razvoju većine kardiovaskularnih bolesti (Yeboah i sar., 2009), poboljšanje ili obnova funkcije endotela i pozitivni efekti na homeostazu između faktora koji se u njemu sintetišu potencijalno su značajan deo mehanizma kardioprotektivnih efekata procijanidina. U ovoj studiji je prvi put pokazano da procijanidin B2 izaziva snažnu endotel- i koncentracijski-zavisnu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije i vene safene. Prethodne publikacije su jasno sugerisale da različiti procijanidini biljnog porekla imaju vazorelaksantni potencijal (Aldini i sar., 2003; Biun i sar., 2014; Matsui i sar., 2009). Međutim, samo su Aldini i sar. (2003) pokazali relaksaciju krvnog suda humanog porekla indukovanu procijanidinskim ekstraktom semena grožđa, dok su drugi autori u svojim studijama koristili krvne sudove animalnog porekla. Saglasnost naših rezultata sa pomenutim studijama jasno ukazuje da procijanidin B2 značajno doprinosi vazorelaksantnom efektu hrane bogate procijanidima.

Uklanjanje funkcionalnog endotela u našoj studiji je u mnogome redukovalo relaksantni odgovor oba ispitivana krvna suda na procijanidin B2, što sugerise direktnu zavisnost njegovog vazorelaksantnog efekta od intaktnosti endotela. Zdrav i neoštećen endotel oslobađa različite vazoaktivne faktore, među kojima je NO jedan od fundamentalnih. Sintezom iz L-arginina kao prekursora, pod dejstvom eNOS, ovaj gasoviti agens, iako kratkog i brzog delovanja, predstavlja važan sekundarni glasnik koji prolazi različite membrane, aktivira biohemijske procese u susednim ćelijama i ostvaruje niz intracelularnih efekata, najčešće aktivacijom GC. Nalazi dobijeni u našoj studiji na izolovanim prstenastim segmentima oba krvna suda, u prisustvu inhibitora eNOS, L-NAME, ili hvatača NO, hidroskobalamina, upućuju da je za ispoljavanje relaksantnog delovanja ovog dimera izuzetno značajna povećana sinteza i bioraspoloživost NO. Ovakvi rezultati su u potpunoj korelaciji sa literaturnim podacima da je NO glavni medijator kojim je posredovana dilatacija vene safene usled povećanog protoka krvi i vazokonstrikcije (Ovens i sar., 2009). Dalje, nalaz da je u prisustvu selektivnog inhibitora GC, ODC, procijanidinom B2-indukovana relaksacija bila signifikantno antagonizovana na oba krvna suda, ukazuje da značajan udeo u mehanizmu relaksantnog efekta ispitivanog flavanola ima aktivacija NO/cGMP puta, što je u saglasnosti sa prethodnim izveštajima sa procijanidinskim ekstraktima (Aldini i sar., 2003; Biun i sar., 2014; Matsui i sar., 2009). Međutim, redukcija relaksantnog efekta procijanidina B2, na oba krvna suda, u uslovima inhibicije GC bila je značajno manja nego u uslovima smanjene sinteze ili oslobađanja NO. Ovakav rezultat ukazuje da NO-zavisan efekat, verovatno, nije posredovan isključivo aktivacijom GC, pa je predmet daljeg ispitivanja bila NO-zavisna aktivacija različitih tipova K^+ kanala, kao i inhibicija oslobađanja intracelularnog Ca^{2+} (Hester, 1985; Khan i sar, 1998).

Poznato je da prostaciklin, sintetisan iz arahidonske kiseline pod dejstvom COX-a u endotelu, indukuje relaksaciju glatke muskulature povećavajući koncentraciju cAMP-a (Kukovetz i sar., 1979). Nalaz naše studije da inhibitor COX-a, indometacin, nije imao efekta na relaksaciju indukovanu niskim

koncentracijama procijanidina B2, i da je značajno antagonizovao samo maksimalnu relaksaciju vene safene, sugerise učešće prostaciklina u procijanidin B2-indukovanoj relaksaciji venskog krvnog suda prevashodno u visokim koncentracijama. S druge strane, rezultat dobijen na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, u prisustvu indometacina, ukazuje da je za ispoljavanje relaksantnog delovanja procijanidina B2 na arterijskom krvnom sudu neophodna povećana sinteza i raspoloživost prostaciklina. Ovakav nalaz je potpuno saglasan rezultatima studije sprovedene od strane Chaikhounia i sar. (1986) o većoj sposobnosti unutrašnje torakalne arterije da proizvede prostaciklin u odnosu na venu safenu, kako u bazalnim uslovima, tako i pri stimulaciji. Međutim, u studiji Aldini i sar. (2003) je pokazani značaj prostaciklina za relaksaciju unutrašnje torakalne arterije bio veći nego u našoj. Razlog tome može biti korišćenje procijanidinskog ekstrakta semena grožđa, a ne izolovanog procijanidina B2, te postoji mogućnost da je sinteza prostaciklina, pored procijanidina B2, indukovana i nekom drugom komponentom ekstrakta.

Za razliku od NO/cGMP puta ili prostaciklin-zavisne relaksacije koji su dosta proučavani, priroda i mehanizam dilatacije posredovane EDHF-om ostaju u velikoj meri nerazjašnjeni. EDHF se smatra rezervnim sistemom za održavanje perfuzije tkiva u uslovima smanjene sinteze NO. Postoji dosta različitih literaturnih podataka po pitanju prirode i mehanizma delovanja EDHF. Naime, nakon stimulacije endotelnih ćelija različitim agonistima, povećava se intracelularna koncentracije Ca^{2+} , koja posledično aktivira IK_{Ca} i SK_{Ca} kanale. Usled toga nastaje hiperpolarizacija koja se putem mioendotelnih tesnih veza prenosi na glatku muskulaturu i indukuje njenu relaksaciju, ili ta endotelna hiperpolarizacija predstavlja vučnu silu za ulazak Ca^{2+} , koji indukuje proizvodnju NO i prostaciklina. Blokadom SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala, koji su skoro isključivo eksprimirani na endotelu, u prisustvu inhibitora eNOS i COX, potpuno bi bila prevenirana endotel-zavisna hiperpolarizacija (Feletou, 2016). Nalaz dobijen u našoj studiji u prisustvu selektivnih blokatora SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala (apamina i TRAM-a-34), uz prethodnu inhibiciju proizvodnje NO i prostaciklina, potpuno isključuje mogućnost da EDHF doprinosi relaksaciji unutrašnje torakalne arterije i vene safene indukovanoj procijanidinom B2. Ovakav rezultat je suprotan nalazu studije Hea i sar. (2002), u kojoj postoje jasni dokazi o doprinosu EDHF relaksaciji venskog krvnog suda. Međutim, imajući u vidu da Yang i He (1997) naglašavaju da zbog hirurške manipulacije grafta tokom bajpas operacije značaj EDHF može postati minoran, potpuno je razumljiva razlika u rezultatima naše i drugih studija.

Prethodne studije su pokazale da je aktivacija K^+ kanala na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, uz posledičnu hiperpolarizaciju, veoma važan mehanizam relaksantnog delovanja procijanidinskih ekstrakata (Kim i sar., 2000). Da bi ispitali da li aktivacija različitih podtipova K^+ kanala (K_{Ca} , K_{ATP} i K_V) doprinosi procijanidin B2-indukovanoj relaksaciji ispitivanih krvnih sudova, primenili smo agense koji imaju sposobnost selektivne blokade K^+ kanala.

4-Aminopiridin korišćen u koncentraciji u kojoj selektivno blokira K_V kanale je u manjoj meri, ali statistički značajno, smanjio maksimalnu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije proizvedenu procijanidinom B2, bez značajanog uticaja na EC_{50} . Sa druge strane doveo je do blagog, ali značajnog pomaka u desno koncentracijski-zavisne krive procijanidina B2 dobijene na veni safeni. Ovi rezultati ukazuju da 4-AP-senzitivni K_V kanali doprinose relaksantnom delovanju procijanidina B2 na oba krvna suda, ali je njihov uticaj na unutrašnjoj torakalnoj arteriji značajan samo u visokim koncentracijama. Naši rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim studijama, u kojima je pokazana značajnost K_V kanala u procijanidin-indukovanoj hiperpolarizaciji i posledičnoj relaksaciji različitih krvnih sudova (Buyn i sar., 2012; Kwan i sar., 2005; Matsui i sar., 2009). Međutim, u svim ovim radovima je, u poređenju sa našim nalazima, ta značajnost bila signifikantno veća. Razlika se može objasniti činjenicom da su pomenuti autori u svojim studijama koristili dva do šest puta veću koncentraciju 4-aminopiridina (od 1 do 3 mM), što je moglo rezultovati neselektivnom blokadom i drugih podtipova K^+ kanala.

Dosadašnja ispitivanja uloge K_{ATP} kanala u mehanizmu dejstva ekstrakata bogatih procijanidinima, dala su neusklađene rezultate. Da bismo ispitali da li su K_{ATP} kanali uključeni u mehanizam vazorelaksantnog delovanja procijanidina B2, aplikovali smo glibenklamid, selektivni blokator ovih kanala. Relaksacija unutrašnje torakalne arterije i vene safene izazvana procijanidinom B2 bila je parcijalno redukovana glibenklamidom, što sugerise da otvaranje K_{ATP} kanala značajno doprinosi njegovom relaksantnom dejstvu na oba krvna suda. S obzirom da ovi kanali učestvuju u regulaciji koronarnog protoka krvi tokom hipoksije, acidoze, ishemije i ishemijskog prekondicioniranja (Dellsperger, 1996), uticaj procijanidina B2 na K_{ATP} kanale može biti od značaja. Suprotstavljeni rezultati koji se navode u literaturi o učešću ovih kanala u dejstvu procijanidina mogu biti posledica upotrebe različitih ekstrakata bogatih procijanidinima, ali se razlike u rezultatima mogu objasniti i činjenicom da ekspresija i sastav K_{ATP} kanala varira između krvnih sudova različitog porekla (Foster i Coetzee, 2015).

Već je napomenuto da BK_{Ca} kanali imaju važnu ulogu u mehanizmu dejstva različitih prirodnih vazoaktivnih supstanci (Hu i Zhang, 2012). Za razliku od studija u kojima je korišćen neselektivni blokator tetraetilamonijum (TEA) (Kim i sar., 2000; Kwan i sar., 2005; Matsui i sar., 2009), u našoj studiji je, u cilju ispitivanja uloge BK_{Ca} kanala u relaksaciji unutrašnje torakalne arterije i vene safene indukovanoj procijanidinom B2, upotrebljen visoko selektivan blokator, iberiotoksin. Kako je pretretman ovom supstancom skoro poništio efekat procijanidina B2 na oba krvna suda, smatramo da otvaranje BK_{Ca} kanala u velikoj meri doprinosi njegovom relaksantnom efektu. Da bi sagledali da li procijanidin B2 intereaguje sa BK_{Ca} kanalima lokalizovanim na glatkoj muskulaturi ili eksprimiranim na endotelnim ćelijama, izolovani prstenasti segmenti su kontrahovani visokom koncentracijom K^+ . Kako je procijanidin B2 i pod datim uslovima izazvao koncentracijski-zavisnu relaksaciju endotel-intaktnih segmenata, vrlo verovatno otvaranje endotelnih K^+ kanala neznatno doprinosi sintezi relaksantnih faktora. Naime, prema literaturnim podacima, u prisustvu visoke koncentracije K^+ membrana endotelne ćelije je potpuno depolarisana, i vrlo teško je očekivati da otvaranje pojedinih K^+ kanala indukuje njenu hiperpolarizaciju. S obzirom da se BK_{Ca} kanali suprotstavljaju miogenom tonusu vene safene izložene hronično visokom pritisku *in vivo* (Szentiványi i sar., 1997), i da posledično postoji promena ovih kanala u patofiziološkim uslovima, kao što su hipertenzija, dijabetes, hipoksija i ishemijska bolest srca (Hu i Zhang, 2012), pokazani uticaj procijanidina B2 na BK_{Ca} kanale mogao bi imati značaj kod različitih kardiovaskularnih bolesti.

Nekoliko autora je pokazalo da celularni mehanizmi koji posreduju u NO-zavisnoj relaksaciji krvnih sudova, mogu uključivati modulaciju K_{ATP} , K_V i K_{Ca} kanala (Irvine et al., 2003; Mistri i Garland, 1998; Murphie i Braiden, 1995). Aktivacija ovih kanala može biti posledica direktnog delovanja NO (Bolotina et al., 1994) ili rezultat povećanja aktivnosti GC ili PKG (Archer et al., 1994). Kako bismo ispitali da li je aktivacija različitih K^+ kanala ispitivanih krvnih sudova bila rezultat direktnog uticaja procijanidina B2, ili samo jedan od posledičnih efekata aktivacije NO/cGMP puta, koristili smo selektivne blokatore K^+ kanala (4-aminopiridin, glibenklamid ili iberiotoksin) uz predhodnu inhibiciju sinteze NO i prostaciklina. Naši rezultati pokazuju da je procijanidin B2-indukovano otvaranje K_V i BK_{Ca} kanala na oba krvna suda u potpunosti posledica aktivacije NO/cGMP puta, što korelira sa rezultatima studija Kohlera i sar. (1998) i Neika i sar. (2018). S druge strane, efekat procijanidina B2 na K_{ATP} kanale unutrašnje torakalne arterije i vene safene je, barem delimično, direktan.

Značajan udeo u ispoljavanju vazorelaksantnog delovanja pojedinih jedinjenja poreklom iz biljaka ima i njihov uticaj na promet Ca^{2+} . To nas je podstaklo da ispitamo da li procijanidin B2 svoj efekat na unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni, pored ostalog, ostvaruje redukujući oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} inicirano aktivacijom IP_3 -zavisnog i/ili nezavisnog puta (Han i sar., 1987; Zucchi i Ronca-Testoni, 1997). U skladu sa tim, preparati su kontrahovani fenilefrinom ili kofeinom u Krebs-Ringer bikarbonatnom rastvoru bez Ca^{2+} . Procijanidin B2 je, u datim uslovima, proizveo snažnu

koncentracijski-zavisnu relaksaciju izolovanih segmenata unutrašnje torakalne arterije i vene safene prethodno kontrahovanih fenilefrinom, i segmenata vene safene kontrahovanih kofeinom. Sa druge strane, nije imao nikakvog efekta na unutrašnju torakalnu arteriju prekontrahovanu kofeinom. Ovakav rezultat ukazuje da uticaj procijanidina B2 na intracelularni promet Ca^{2+} igra značajnu ulogu u ispoljavanju njegovih relaksantnih efekata. Ovaj flavanol redukuje oslobađanje intracelularnog Ca^{2+} interferirajući sa IP_3 receptorskom kaskadom na oba krvna suda, dok na veni safeni njegovom dejstvu doprinosi i delovanje na rijanodinske receptore endoplazmatskog retikuluma.

Kako bismo ispitali ulogu procijanidina B2 u SERCA-posredovanom preuzimanju Ca^{2+} , a samim tim i smanjenju intracelularne koncentracije ovog jona, koristili smo tapsigargin. Odgovarajuće studije pokazuju da ovaj agens sprečava punjenje depoa Ca^{2+} , koji su prethodno ispražnjeni usled dejstva fenilefrina na arterijske segmente (Baró i Eisner, 1992). Prema našim rezultatima, procijanidin B2-indukovana relaksacija endotel-intaktnih segmenata oba krvna suda je prisustvom tapsigargina bila značajno redukovana, što ukazuje da je stimulacija SERCA neizostavan faktor ispoljavanja vazorelaksantnog dejstva procijanidina B2. Literaturni podaci ukazuju da povećanje aktivnosti SERCA može biti posledica kako direktnog delovanja NO, tako i rezultat aktivacije PKG (Adachi et al. 2004; Khan et al., 1998). Dodatno, Adachi i sar. (2004) su dokazali da PKG može smanjiti i oslobađanje Ca^{2+} iz intracelularnih depoa. Uzimajući u obzir važan doprinos NO relaksantnom efektu procijanidina B2 na oba krvna suda, moglo bi se reći da su indukcija aktivnosti SERCA ili smanjeno intracelularno oslobađanje Ca^{2+} samo posledični efekti aktivacije NO/cGMP puta, a ne direktni efekti procijanidina B2.

Konačno, u našoj studiji ispitan je i uticaj procijanidina B2 na ekstracelularni Ca^{2+} . Rezultati pokazuju da: (1) procijanidin B2 značajno relaksira prstenove unutrašnje torakalne arterije i vene safene prekontrahovane visokim K^+ ; (2) prisustvo nifedipina u potpunosti onemogućava kontrakciju pod ovim okolnostima; kao i da je (3) procijanidinom B2-indukovana relaksacija oba krvna suda bila delimično redukovana prisustvom nifedipina. Sva tri nalaza ukazuju da su blokada voltažno-zavisnih Ca^{2+} -kanala L-tipa sastavni deo mehanizma vazorelaksantnog delovanja procijanidina B2.

U zaključku ovog dela posebno naglašavamo važnost endotela za ispoljavanje efekta procijanidina B2 na unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni. Mehanizam vazorelaksantnog delovanja uključuje stimulaciju proizvodnje NO, praćenu aktivacijom GC, kao i otvaranjem odgovarajućih K^+ kanala, posebno BK_{Ca} , ali i K_{ATP} i K_{V} kanala. Pored toga, smanjenje intraćelijske koncentracije Ca^{2+} , i to smanjenjem ulaska i redukcijom oslobađanja deponovanog Ca^{2+} , takođe doprinosi relaksaciji krvnih sudova izazvanoj procijanidinom B2.

OSNOVNE RAZLIKE U VAZODILATATORNOM DEJSTVU (-)-EPIKATEHINA I PROCIJANIDINA B2 NA HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKANOJ ARTERIJI

U našoj studiji, snažna koncentracijski-zavisna relaksacija humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene, sa i bez endotela, postignuta je primenom mikromolarnih koncentracija (-)-epikatehina i/ili procijanidina B2. Međutim, pokazana je značajna razlika u osetljivosti krvnih sudova na delovanje flavanola različitog stepena polimerizacije. Naime, procijanidin B2, kao (-)-epikatehinski dimer, je pokazao 300 puta veću potentnost ($\text{EC}_{50} = 0,13 \mu\text{M}$) od monomernog (-)-epikatehina ($\text{EC}_{50} = 44,67 \mu\text{M}$) u relaksaciji vene safene, i oko 70 puta veću potentnost u relaksaciji segmenata humane unutrašnje torakalne arterije ($\text{EC}_{50} = 0,16 \mu\text{M}$ za procijanidin B2 vs. $\text{EC}_{50} = 11,22 \mu\text{M}$ za (-)-epikatehin). Ovakav rezultat je potpuno u korelaciji sa rezultatima dobijenim u studiji Fishera i sar. (2003), da se aktivnost procijanidina povećava sa povećanjem sadržaja (-)-epikatehinskih jedinica, broja galiolnih jedinica ili sa polimerizacijom.

Dalje, zavisnost delovanja od intaktnosti endotela se značajno razlikovao među ispitivanim flavanolima. Naime, dok uklanjanje endotela nije uopšte remetilo relaksaciju unutrašnje torakalne

arterije i vene safene izazvanu (-)-epikatehinom, vazodilatatorni efekat procijanidina B2 je time u velikoj meri bio redukovan.

Otvaranje različitih podtipova K^+ kanala na glatkoj muskulaturi bitno doprinosi vazorelaksantnom efektu ispitivanih flavanola. Međutim, K_V kanali i njegovi podtipovi signifikantno više doprinose (-)-epikatehin- nego procijanidin B2-indukovanoj relaksaciji oba ispitivana krvna suda. Dodatno, dok K_{ATP} skoro podjednako doprinose efektu procijanidina B2 na oba grafta, njihova uloga u dejstvu (-)-epikatehina je nešto značajnija na unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Najzad, dok je aktivacija različitih K^+ kanala rezultat direktnog delovanja (-)-epikatehina, ovaj efekat je kod procijanidina B2 najvećim delom posredovan aktivacijom NO/cGMP puta.

Razlika u dejstvu (-)-epikatehina i procijanidina B2 ispoljava se i u mehanizmu inhibicije oslobađanja intracelularnog Ca^{2+} . Naime, procijanidin B2 na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, a (-)-epikatehin na veni safeni interferiraju samo sa IP_3 receptorskom kaskadom. Sa druge strane, značajno je i delovanje na rijanodinski receptor endoplazmatskog retikuluma, i to procijanidina B2 na veni safeni, i (-)-epikatehina na unutrašnjoj torakalnoj arteriji.

U Tabeli 14. sumarno su prikazane osnovne razlike u vazodilatatornom dejstvu (-)-epikatehina i procijanidina B2 na ispitivanim krvnim sudovima.

Tabela 14. Osnovne razlike u vazodilatatornom dejstvu (-)-epikatehina i procijanidina B2

	(-)-Epikatehin na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji	(-)-Epikatehin na humanoj unutrašnjoj veni safeni	Procijanidin B2 na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji	Procijanidin B2 na humanoj veni safeni
Zavisnost relaksantnog efekta od intaktnosti endotela	-	-	+	+
EC ₅₀	11,22 μ M	0,16 μ M	44,67 μ M	0,13 μ M
Značaj K_V kanala za ispoljavanje relaksantnog efekta	veliki	veliki	mali	mali
Značaj K_{ATP} kanala za ispoljavanje relaksantnog efekta	veliki	Samo u visokim koncentracijama	veliki	veliki
Efekat na K^+ kanale	direktan	direktan	Indirektan-posledica aktivacije NO/cGMP puta	Indirektan-posledica aktivacije NO/cGMP puta
Mehanizam inhibicije oslobađanja intracelularnog Ca^{2+}	Interferencija sa IP_3 receptorskim sistemom i rijanodinskim receptorom	Interferencija samo sa IP_3 receptorskim sistemom	Interferencija samo sa IP_3 receptorskim sistemom	Interferencija sa IP_3 receptorskim sistemom i rijanodinskim receptorom

ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u toku farmakološke analize efekata (-)-epikatehina i procijanidina B2 na unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- 1) (-)-Epikatehin i procijanidin B2 prouzrokuju koncentracijski-zavisnu relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene prekontrahovane fenilefrinom.
- 2) (-)-Epikatehin prouzrokuje endotel-nezavisnu, a procijanidina B2 endotel-zavisnu relaksaciju oba krvna suda.
- 3) NO/cGMP signalni put je uključen u mehanizam endotel-zavisne relaksacije indukovane procijanidinom B2 na oba krvna suda, dok je prostaciklin verovatno, bar delom, uključen u mehanizam vazorelaksacije ispitivanih krvnih sudova.
- 4) Endotel-nezavisni relaksantni efekat (-)-epikatehina uključuje aktivaciju 4-AP- i margatoksin-senzitivnih K_V kanala, BK_{Ca} kanala, i, bar delimično, aktivaciju K_{ATP} kanala na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama.
- 5) Endotel-zavisni relaksantni efekat procijanidina B2 uključuje aktivaciju BK_{Ca} i K_{ATP} kanala, kao i K_V kanala u visokim koncentracijama.
- 6) Mehanizma vazorelaksantnog efekta (-)-epikatehina i procijanidina B2 uključuje i blokadu voltažno-zavisnih Ca^{2+} -kanala L-tipa, i posledično smanjen ulazak ekstracelularnog Ca^{2+} .
- 7) Vazorelaksantnom efektu (-)-epikatehina i procijanidina B2 doprinosi i redukcija oslobađanja Ca^{2+} iz intracelularnih depoa, delovanjem na IP_3 i/ili na rijanodinske receptore, kao i stimulacija intracelularnog preuzimanja Ca^{2+} posredstvom SERCA.

LITERATURA

- Acar C, Jebara VA, Portoghesi M, Beyssen B, Pagny JY, Grare P, Chachques JC, Fabiani JN, Deloche A, Guermontprez JL, Carpentier AF. Revival of the radial artery for coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 1992;54:652-660.
- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* 2004;10:1200-1207.
- Aggio A, Grassi D, Onori E, D'Alessandro A, Masedu F, Valenti M, Ferri C. Endothelium/nitric oxide mechanism mediates vasorelaxation and counteracts vasoconstriction induced by low concentration of flavanols. *Eur J Nutr.* 2013;52:263-72.
- 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 cardioprotection. *Life Sci.* 2003;73:2883-98.
- Amberg GC, Bonev AD, Rossow CF, Nelson MT, Santana LF. Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin Invest.* 2003;112:717-24.
- Appeldoorn MM, Jean-Paul V, Harry G, Peter CHH. Procyanidin Dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *J Nutr.* 2009;139:1469-73.
- Aprotosoaie AC, Miron A, Trifan A, Luca VS, Costache II. The Cardiovascular effects of cocoa polyphenols. *Diseases.* 2016;17:39-47.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinane N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr.* 2000;130:2243-50.
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of carboxydotoxin sensitive K^{+} channels by cGMP-dependent protein kinase. *PNAS.* 1994;91:7583-87.
- Aronstam RS, Martin DC, Dennison RL, Cooley HG. S-Nitrosylation of M_2 muscarinic receptor thiols disrupts receptor-G-Protein coupling. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;757:215-217.
- Arranz S, Valderas-Pamires P, Chiva-Blanch P, Casas R, Urpi-Sarda M, Estruch R. Cardioprotective effects of cocoa: Clinical evidence from randomized clinical intervention trials in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57:936-47.
- Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:227-32.
- Arts IC, Jacobs DR, Harnack LJ, Gross M, Folsom AR. Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women. *Epidemiology.* 2001;12:668-75.
- Ashcroft FM. *Ion Channels and Disease*. 1st ed. San Diego (CA): Academic Press, 2000.
- Auclair S, Milenkovic D, Besson C, Chauvet S, Gueux E, Morand C, Mazur A, Scalbert A. Catechin reduces atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice: a transcriptomic study. *Atherosclerosis.* 2009;204:21-27.

- Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr.* 2007;137:1436–41.
- Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res.* 2000;33:635-41.
- Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, Merx M, Heussen N, Gross HB, Keen CL, Schroeter H, Kelm M. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:2141–49.
- Baró I, Eisner DA. The effects of thapsigargin on Ca^{2+} in isolated rat mesenteric artery vascular smooth muscle cells. *Pflug Arch.* 1992;420:115–17.
- Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, Williamson MP. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in a complexation and precipitation. *Biochemistry.* 1997;36:5566-77.
- Beech DJ, Bolton TB. Two components of potassium current activated by depolarization of single smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J Physiol.* 1989;418:293–309.
- Belcaro GU, Cornelli R, Luzzi MR, Cesarone M, Dugall B, Feragalli S, Errichi E, Ippolito MG, Grossi M, Hosoi M, Gizzi G. Pycnogenol supplementation improves health risk factors in subjects with metabolic syndrome. *Phytother Res.* 2013;27:1572-8.
- Benham CD, Bolton TB. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J Physiol.* 1986;381:385–406.
- Berwick ZC, Payne GA, Lynch B, Dick GM, Sturek M, Tune JD. Contribution of adenosine A(2A) and A(2B) receptors to ischemic coronary dilation: Role of K_V and K_{ATP} channels. *Microcirculation.* 2010;17:600–7.
- Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. U.S. Department of Agriculture. 2014.
- Blazso G, Gabor M, Sibbel R, Rohdewald P. Antiinflammatory and superoxide radical scavenging activities of procyanidins containing extract from the bark of *Pinus pinaster* Sol. and its fractions. *Pharm Pharmacol.* 1994;3:217-20.
- Bolotina V, Gericke M, Bregestovski P. Kinetic differences between Ca^{2+} -dependent K^+ channels in smooth muscle cells isolated from normal and atherosclerotic human aorta. *Proc Biol Sci.* 1991;244:51–55.
- Bolotina VM, Najibi SN, Palacino JJ, Pagano PJ, Kohen, RA. Nitric oxide directly activates Ca^{2+} -dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368:850-853.
- Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, Dromparis P, Roy M, Watson KO, Nagendran J, Haromy A, Dyck JR, Michelakis ED. Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodelling through the inhibition of the AKT/GSK3- β /NFAT axis. *Circulation.* 2009;120:1231-40.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990;186:343–55.
- Božović B, Mirić D, Dragojević I. The role of nitric oxide physiological and pathophysiological process. *Praxis Medica.* 2007;35:95-98

- Brainard AM, Korovkina VP, England SK. Potassium channels and uterine function. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18:332-9.
- Brigelius-Flohe R, Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:2335-81
- Buijsse B, Weikert C, Drogan D, Bergmann M, Boeing H. Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. *Eur Heart J.* 2010;31:1616-23.
- Byun EB, Sung NY, Yang MS, Song DS, Byun EH, Kim JK, Park JH, Song BS, Lee JW, Park SH, Byun MW, Kim JH. Procyanidin C1 causes vasorelaxation through activation of the endothelial NO/cGMP pathway in thoracic aortic rings. *J Med Food.* 2014;17:742-748.
- Cai Q, Li BY, Gao HQ, Zhang JH, Wang JF, Yu F, Yin M, Zhang Z. Grape seed procyanidin B2 inhibits human aortic smooth muscle cell proliferation and migration induced by advanced glycation end products. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75:1692-7.
- Caimari A, del Bas JM, Crescenti A, Arola L. Low doses of grape seed procyanidins reduce adiposity and improve the plasma lipid profile in hamsters. *Int J Obes (Lond).* 2013;37:576-83.
- Cankar K, Strucl M. The effect of glibenclamide on cutaneous laser-Doppler flux. *Microvasc Res.* 2008;75:97-103.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000;184:409-20.
- Chaikhouni A, Crawford FA, Kochel PJ, Olanoff LS, Halushka PV. Human internal mammary artery produces more prostacyclin than saphenous vein. *J thorac cardiovas surg.* 1986;92:88-91.
- Chen DM, Cai X, Kwik-Urbe CL, Zeng R, Zhu XZ. Inhibitory effects of procyanidin B2 dimer on lipid-laden macrophage formation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;48:54-70.
- Cheong A, Li J, Sukumar P, Kumar B, Zeng F, Riches K, Munsch C, Wood IC, Porter KE, Beech DJ. Potent suppression of vascular smooth muscle cell migration and human neointimal hyperplasia by KV1.3 channel blockers. *Cardiovasc Res.* 2011;89:282-89.
- Chuang CC, McIntosh MK. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu Rev Nutr.* 2011;31:155-176.
- Cicala C, Morello S, Iorio C, Capasso R, Borrelli F, Mascolo N. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2003;73:73-80.
- Climent B, Simonsen U, Rivera L. Effects of obesity on vascular potassium channels. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12:438-452.
- Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT, Kunze DL. Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res.* 1987;61:632-40.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger- Gateau P, Dartigues JF. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol.* 2000;16:357-63.
- Corder R, Crozier A, Kroon PA. Drinking your health? It's too early to say. *Nature.* 2003;426:119
- Cox RH, Rusch NJ. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. *Microcirculation.* 2002;9:243-257.
- Cox RH. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys.* 2005;42:167-195.

- Cremonini E, Bettaieb A, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. (-)-Epicatechin improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. *Arch Biochem Biophys*. 2016;599:13-21.
- Dacey LJ, Braxton JH Jr, Kramer RS. Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. Long-term outcomes of endoscopic vein harvesting after coronary artery bypass grafting. *Circulation*. 2011;123:147–153.
- Dart C, Standen NB. Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol*. 1993;471:767–86.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115:1285–129.
- Dell’Agli M, Buscialà A, Bosio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Resear*. 2004;63:593–602.
- Dellsperger KC. Potassium channels and coronary circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23:1096-1101.
- Dixon R, Pasinetti G. Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiol*. 2010;154:453–57.
- Dower JJ, Geleijnse JM, Gijsbers L, Zock PL, Kromhout D, Hollman PC. Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am J Clin Nutr*. 2015;101:914-21.
- Downing LE, Daniel E, Patricia A, Ellison M, Louise R. Mechanistic insight into nuclear receptor-mediated regulation of bile acid metabolism and lipid homeostasis by grape seed procyanidin extract (GSPE). *Cell Biochem Funct*. 2017;35:12-32.
- Duarte J, Pérez Vizcaíno F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol*. 1993;24:857-62.
- Duncker DJ, Oei HH, Hu F, Stubenitsky R, Verdouw PD. Role of K_{ATP} channels in regulation of systemic, pulmonary, and coronary vasomotor tone in exercising swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:22–33.
- Ellinger S, Reusch A, Stehle P, Helfrich HP. Epicatechin ingested via cocoa products reduces blood pressure in humans: a nonlinear regression model with a Bayesian approach. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:1365-77.
- Elstner EF, Kleber E. Radical scavenger properties of leucocyanidine. In: Das, N. P., ed. *Flavonoids in biology and medicine III: current issues in flavonoids research*. Singapore: Natl Univ of Singapore Press. 1990:227-35.
- Enseleit F, Sudano I, Périat D, Winnik S, Wolfrum M, Flammer AJ, Fröhlich GM, Kaiser P, Hirt A, Haile SR, Krasniqi N, Matter CM, Uhlenhuth K, Högger P, Neidhart M, Lüscher TF, Ruschitzka F, Noll G. Effects of pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over study. *Eur Heart J*. 2012;33:1589-97.
- Fang LH, Mu YM, Lin, LL, Xiao PG, Du GH. Vasorelaxant effect of euxanthone in the rat thoracic aorta. *Vascul. Pharmacol*. 2006;45:96–101.
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Couraud PO, Romero I, Weksler B, Freitas V, Mateus N. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food Funct*. 2008;2:39-44.

- Faxon DP, Borst C. Remodelling: historical perspectives and definition of terms. *Semin Interv Cardiol*. 2004;2:145-6.
- Félétou M. Endothelium-dependent hyperpolarization and endothelial dysfunction. *J Cardiovas Pharmacol*. 2016;67:373-87.
- Fenercioglu AK, Saler T, Genc E, Sabuncu H, Altuntas Y. The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus without complications. *J Endocrin Investig* 2010;33:118–24.
- Fernandez-Millan E, Cordero-Herrera I, Ramos S, Escriva F, Alvarez C, Goya L. Cocoa-rich diet attenuates beta cell mass loss and function in young Zucker diabetic fatty rats by preventing oxidative stress and beta cell apoptosis. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59:820–4.
- Ferri C, Desideri G, Ferri L, Proietti I, Di Agostino S, Martella L, Mai F, Di Giosia P, Grassi D. Cocoa, blood pressure, and cardiovascular health. *J Agric Food Chem*. 2015;63:9901-9.
- Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens*. 2003;21:2281–2286.
- Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:616–626.
- Fitzpatrick D, Bing B, Maggi D, Fleming RC, O'Maley RM. Vasodilating procyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:78-89.
- Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 2010;49:835–842.
- Foster MN, Coetzze WA. K_{ATP} Channels in the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 2015;96:177-252.
- Fox K, Garcia MA, Ardissino D. Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary: The Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2006;27:1341-81.
- Fraga CG, Litterio MC, Prince PD, Calabró V, Piotrkowski B, Galleano M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;48:63-70.
- Fraga CG, Actis-Goretta L, Ottaviani JJ, Carrasquedo F, Lotito SB, Lazarus S, Schmitz HH, Keen CL. Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clin Dev Immunol*. 2005;12:11–17.
- Freedman JE, Parker C, Li L. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*. 200;103:2792–98.
- Fröjdö S, Durand C, Pirola L. Metabolic effects of resveratrol in mammals-a link between improved insulin action and aging. *Curr Aging Sci*. 2008;1:145-51.
- Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2001;12:41–8.
- Galleano M, Bernatova I, Puzserova A, Balis P, Sestakova N, Pechanova O, Fraga CG. (-)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. *IUBMB Life*. 2013;65:710–15.
- Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides*

- margaritatus venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem.* 1993;268:18866-74.
- Gebremedhin D, Kaldunski M, Jacobs ER, Harder DR, Roman RJ. Coexistence of two types of Ca^{2+} activated K^{+} channels in rat renal arterioles. *Am J Physiol.* 1996;270:69–81.
- Geleijnse J, Launer L, Hofman A, Pols H, Witteman J. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: The Rotterdam Study. *Arch Intern Med.* 1999;159:2170–74.
- Goldman S, Zadina K, Moritz T. Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:2149–56
- Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Galindo P, Quintela AM, López-Sepúlveda R, Romero M, Tamargo J, Vargas F, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:70-79.
- Gonçalves RL, Lugnier C, Keravis T, Lopes MJ, Fantini FA, Schmitt M, Cortes SF, Lemos VS. The flavonoid dioclein is a selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 1 (PDE1) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) vasorelaxant in human vascular tissue. *Eur J Pharmacol.* 2009;620:78-83.
- Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G. Shortterm administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:611–14.
- Grassi D, Desideri G, Ferri C. Blood pressure and cardiovascular risk: what about cocoa and chocolate? *Arch Biochem Biophys.* 2010;501:112-5.
- Grønbaek M. Alcohol and life expectancy. *Br J Hosp Med.* 1995;54:306-7.
- Gutiérrez-Salmeán G, Ortiz-Vilchis P, Vacaseydel CM, Rubio-Gayosso I, Meaney E, Villarreal F, Ramírez-Sánchez I, Ceballos G. Acute effects of an oral supplement of (-)-epicatechin on postprandial fat and carbohydrate metabolism in normal and overweight subjects. *Food Funct.* 2014;5:521-7.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57:473-508.
- Hamauzu Y, Iijima E. Polyphenolic composition and antioxidative activity of apple flesh extracts, *J Japan Soc Food Sc.* 1999;46:645–651.
- Han C, Abel PW, Minneman K.P. Alpha 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature.* 1987;329:333–5.
- Haslam E. Polyphenol-protein interaction. *Biochem J.* 1974;139:285-8.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96:67-202.
- He GW. Nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries and veins. *J card surg.* 2001;17:317-23.
- He WJ, Fang, TH, Ma X, Zhang K, Ma ZZ, Tu PF. Echinacoside elicits relaxation in rat aortic rings via an NO-cGMP pathway. *Planta Med.* 2009;75:1400–4.

- Heptinstall S, May J, Fox S, Kwik-Urbe C, Zhao L. Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent in vitro and ex vivo studies in healthy adults. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47:197-205;
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993;342:1007–11
- Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 1995;155:381–6.
- Hester RK. Effects of 2-nicotinamidoethyl nitrate on agonist-sensitive Ca^{2+} release and Ca^{2+} entry in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985;233:100–11.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*. 2010;90:291-366.
- Higami T, Maruo A, Yamashita T. Histological and physiological evaluation of skeletonized internal thoracic artery harvesting with an ultrasonic scalpel. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;120:1142-47.
- Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:779–85.
- Hodgson DM, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Bienengraeber M, Ozcan C. Cellular remodeling in heart failure disrupts K_{ATP} channel-dependent stress tolerance. *EMBO J*. 2003;8:1732-42.
- Hollman PC, Katan MB. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res*. 1999;31:75-80.
- Holt RR, Schramm DD, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH. Chocolate consumption and platelet function. *JAMA*. 2002;287:2212–13.
- Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu, QY. Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:798–804.
- Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:740-51.
- Hosseini S, Lee J, Sepulveda RT, Rohdewald P, Watson RR. A randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective, 16 week crossover study to determine the role of Pycnogenol in modifying blood pressure in mildly hypertensive patients. *Nutr Res*. 2001;21:1251–60.
- Hu XQ, Zhang L. Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today*. 2012;17:974–87.
- Huang Y, Chan NW, Lau CW, Yao XQ, Chan FL, Chen ZY. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)epicatechin. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1427:322–28.
- Huang Y, Yao XQ, Tsang SY, Lau CW, Chen ZY. Role of endothelium/nitric oxide in vascular response to flavonoids and epicatechin. *Acta Pharmacol Sin*. 2000;21:1119–24.
- Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci*. 1998;63:275–83.

- Huraux C, Makita T, Kurz S, Yamaguchi K, Szlam F, Tarpey MM, Wilcox JN, Harrison DG, Levy JH. Superoxide production, risk factors, and endothelium-dependent relaxations in human internal mammary arteries. *Circulation*. 1999;99:53–9.
- Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1985;25:171–91.
- Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta analysis. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2010;26:631–640.
- Irvine JC, Favalaro JL, Kemp-Harper BK. NO-Activates Soluble Guanylate Cyclase and Kv Channels to Vasodilate Resistance Arteries. *Hypertension*. 2003;41:1301–07.
- Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension*. 2000;35:173–8.
- Jackson WF. Potassium channels and regulation of the microcirculation. *Microcirculation*. 1998;5:85–90.
- Jalil AM, Ismail A, Pei CP, Hamid M, Kamaruddin SH. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. *J Agric Food Chem*. 2008;56:7877–84.
- Janszky I, Mukamal KJ, Ljung R, Ahnve S, Ahlbom A, Hallqvist J. Chocolate consumption and mortality following a first acute myocardial infarction: the Stockholm Heart Epidemiology Program. *J Intern Med*. 2009;266:248–57.
- Jin J, Park S, Bae J, Cho HC, Lim JG, Park WS. Uncoupling by (–)-epigallocatechin-3-gallate of ATP-sensitive potassium channels from phosphatidylinositol polyphosphates and ATP. *Pharmacol Res*. 2007;56:237–47.
- Jorgensen R. Co-suppression, flower color patterns, and metastable gene expression states. *Science*. 1995;268:686–91.
- Jung Y, Kim H, Min SH, Rhee SG, Jeong W. Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-kappaB through the redox-dependent interaction with Ikappa B alpha. *J Biol Chem*. 2008;283:23863–71.
- Jung JH, Yun M, Choo EJ, Kim SH, Jeong MS, Jung DB, Lee H, Kim EO, Kato N, Kim B, Srivastava SK, Kaihatsu K, Kim SH. A derivative of epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis via SHP-1-mediated suppression of BCR-ABL and STAT3 signalling in chronic myelogenous leukaemia. *Br J Pharmacol*. 2015;172:3565–78.
- Karaki H, Urakawa N, Kutsky P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi*. 1984;20:427–44.
- Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semi. Immunol*. 2000;12:85–98.
- Kawakami K, Aketa S, Sakai H, Watanab Y, Nishida H, Hirayama M. Antyhipertensive and vasorelaxant effects of water-soluble proanthocyanidins from persimmon leaf tea in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75:1435–39.
- Kawata T, Mimuro T, Onuki T, Tsuchiya K, Nihei H, Koike T. The K_{ATP} channel opener nicorandil: Effect on renal hemodynamics in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Kidney Int Suppl*. 1998;67:231–3.

- Khan SA, Higdon NR, Meisneri KD. Coronary vasorelaxation by nitroglycerin: involvement of plasmalemmal calcium-activated K^+ channels and intracellular Ca^{2+} stores. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284:838–46.
- Kim SH, Kang KW, Kim KW, Kim ND. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci*. 2000;67:121–131.
- Kirch N, Ellinger S. Cocoa flavanols and cardioprotective effects. Which flavanols may contribute to vascular health? *Ernahrungs Umschau*. 2014;61:144–51.
- Kitamura K, Kamouchi M. K channel openers activate different K channels in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1994;7:539–46.
- Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Alcohol and mortality. *Ann Intern Med*. 1992;117:646–54.
- Ko EA, Park WS, Son YK, Kim H, Kim N, Kim HK. The effect of tyrosine kinase inhibitor genistein on voltage-dependent K^+ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol*. 2009;50:51–6.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*. 2008;44:65–81.
- Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, Ariga T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin- rich extract from grape seeds. *J Agric Food Chem*. 1999;47:1892–97.
- Köhler R, Schönfelder G, Hopp H, Distler A, Hoyer J. Stretch-activated cation channel in human umbilical vein endothelium in normal pregnancy and in preeclampsia. *J Hypertens*. 1998;16:1149–56.
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*. 1992;5:834–42.
- Ku DD, Caulfield JB, Kirklin JK. Endothelium-dependent responses in long-term human coronary artery bypass grafts. *Circulation*. 1991;83:402–11.
- Kuhnle G, Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C, Hahn U. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277:507–12.
- Kukovetz WR, Holzmann S, Wurm A, Pösch G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. *J Cycl Nucleotide Res*. 1979;5:469–76.
- Kwan CY, Zhang WB, Nishibe S, Seo S. A novel in vitro endothelium dependent vascular relaxant effect of Apocynum venetum leaf extract. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32:789–795.
- Leclerc PC, Lanctot PM, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *Br J Pharmacol*. 2006;148:306–13.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*. 2006;21:69–78.
- Lee JS, Kang SU, Hwang HS, Pyun JH, Choung YH, Kim CH. Epicatechin protects the auditory organ by attenuating cisplatin-induced ototoxicity through inhibition of ERK. *Toxicol Lett*. 2010;199:308–16.
- Lewis DH, Mellander S. Competitive effects of sympathetic control and tissue metabolites on resistance and capacitance vessels and capillary filtration in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 1962;56:162–88.

- Li H, Shin SE, Seo MS, An JR, Choi IW, Jung WK, Firth AL, Lee DS, Yim MJ, Choi G, Lee JM, Na SH, Park WS. The anti-diabetic drug dapagliflozin induces vasodilation via activation of PKG and Kv channels. *Life Sci.* 2018;197:46-55.
- Li H, Xia N, Brausch I, Yao Y, Forstermann U. Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus L.*) upregulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:926–32.
- Lin J, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Rimm EB. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am J Epidemiol.* 2007;165:1305–13.
- Lin MT, Jian MY, Taylor MS, Cioffi DL, Yap FC, Liedtke W, Townsley MI. Functional coupling of TRPV4, I_K, and S_K channels contributes to Ca²⁺-dependent endothelial injury in rodent lung. *Pulm Circ.* 2015;5:279-90.
- Litterio MC, Jaggars G, SagdicogluCelep G, Adamo AM, Costa MA, Oteiza PI, Fraga CG, Galleano M. Blood pressure-lowering effect of dietary (-)-epicatechin administration in L-NAME-treated rats is associated with restored nitric oxide levels. *Free Radic Biol Med.* 2012;53:1894–1902.
- Liu Y, Pleyte K, Knaus HG, Rusch NJ. Increased expression of Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension.* 1997;30:1403–9.
- Lotito SB, Actis-Goretti L, Renart ML, Caligiuri M, Rein D, Schmitz HH, Steinberg FM, Keen CL, Fraga CG. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276:945–951.
- Louagie YA, Buche M, Schröder E, Schoevaerdt JC. Coronary bypass with both internal mammary and inferior epigastric arteries. *Ann Thorac Surg.* 1992;53:1117–1119.
- Lu Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* 2000;68:81-5.
- Luna-Vázquez FJ, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Rojas-Molina I, Zavala-Sánchez MA. Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. *Molecules.* 2013;18:5814–57.
- Kim MJ, Ryu GR, Kang JH. Inhibitory effects of epicatechin on interleukin-1 β -induced inducible nitric oxide synthase expression in RINm5F cells and rat pancreatic islets by down-regulation of NF- κ B activation. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1775–85.
- Machha A, Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46:36–40.
- Mackenzie GG, Adamo AM, Decker NP, Oteiza PI. Dimeric procyanidin B2 inhibits constitutively active NF- κ B in Hodgkin's lymphoma cells independently of the presence of I κ B mutations. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:1461-1471.
- Mackenzie GG, Oteiza PI. Modulation of transcription factor NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cell lines: effect of (-)-epicatechin. *Free Radic Res.* 2006;40:1086-94.
- Mackenzie GG, Carrasquedo F, Delfino JM, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.* 2004;18:167–69.
- Magos GA, Mateos JC, Páez E, Fernández G, Lobato C, Márquez C, Enríquez RG. Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol.* 2008;117:58–68.

- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727-47.
- Mao JT, Nie WX, Tsu IH, Jin YS, Rao JY, Lu QY, Zhang ZF, Go VL, Serio KJ. White tea extract induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells: the role of peroxisome proliferator-activated receptor- μ and 15-lipoxygenases. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:1132-40.
- Martin MA, Fernandez-Millan E, Ramos S, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58:447–56.
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229–65.
- Matsui T, Korematsu S, Byun EB, Nishizuka T, Ohshima S, Kanda T. Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K^+ channel activations. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73:2246-51.
- McGahon MK, Dash DP, Arora A, Wall N, Dawicki J, Simpson DA. Diabetes downregulates large conductance Ca^{2+} -activated potassium beta1 channel subunit in retinal arteriolar smooth muscle. *Circ Res*. 2007;100:703–11.
- Mehrinfar R, Frishman WH. Flavanol-rich cocoa: a cardioprotective nutraceutical. *Cardiol Rev*. 2008;16:109-15.
- Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52:673–751.
- Middleton EJ. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*. 1998;439:175–82.
- Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels (BK_{Ca}) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1998;124:113140.
- Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr*. 2001;131:27–32.
- Miyamoto A, Laufs U, Pardo C, Liao JK. Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-proteins by nitric oxide. *J Biol Chem*. 1997;272:1960-08.
- Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest*. 2005;127:2254–63.
- Moridani MY, Pourahmad J, Bui H, Siraki A. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic Biol*. 2003;34:243–253.
- Morrison M, van der Heijden R, Heeringa P, Kaijzel E, Verschuren L, Blomhoff R, Kooistra T, Kleemann R. Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts antiinflammatory effects on diet-induced human-CRP and NF κ B in vivo. *Atherosclerosis*. 2014;233:149–156.
- Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol*. 1995;486:47-58.
- Naik JS, Walker BR. Endothelial-dependent dilation following chronic hypoxia involves TRPV4-mediated activation of endothelial BK channels. *Pflugers Arch*. 2018;470:633-648.

- Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors*. 2000;13:49–54.
- Nelson CP, Rainbow RD, Brignell JL, Perry MD, Willets JM, Davies NW, Standen NB, Challiss RA. Principal role of adenylyl cyclase 6 in K^+ channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2011;91:694–702.
- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995;268:799–822.
- Ngamukote S, Mäkynen K, Thilawech T, Adisakwattana S. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. *Molecules*. 2011;16:5054–61.
- Nie H, Meng LZ, Zhou JY, Fan XF, Luo Y, Zhang GW. Imperatorin is responsible for the vasodilatation activity of *Angelica Dahurica* var. *Formosana* regulated by nitric oxide in an endothelium-dependent manner. *Chin J Integr Med*. 2009;15:442–447.
- Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature*. 1986;305:147–8.
- Okabe K, Kitamura K, Kuriyama H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. *Pflugers Arch*. 1987;409:561–8.
- Orallo F, Camiña M, Alvarez E, Basaran H, Lugnier C. Implication of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition in the vasorelaxant activity of the citrus fruits flavonoid (+/-)-naringenin. *Planta Med*. 2005;71:99–107.
- Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *J Nutr Biochem*. 2003;14:104–110.
- Overturf KE, Russell SN, Carl A, Vogalis F, Hart PJ, Hume JR, Sanders KM, Horowitz B. Cloning and characterization of a K_v 1.5 delayed rectifier K^+ channel from vascular and visceral smooth muscles. *Am J Physiol*. 1994;267:1231–8.
- Owens CD, Wake N, Conte MS, Herman MG, Beckman JA. In vivo human lower extremity saphenous vein bypass grafts manifest flow mediated vasodilation. *J Vasc Surg*. 2009;50:1063–70.
- Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:704–24.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6853–66.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2:270–8.
- Aron PM, Kennedy JA. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological Activity. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52:79–104.
- Pearson DA, Paglioni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on *ex vivo* platelet function. *Thromb Res*. 2002;106:191–7.
- Peng N, Clark JT, Prasain JI, Kim H, White CR, Wyss JM. Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen depleted, female, spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289:771–75.

- Peng X, Ma J, Chao J, Sun Z, Chang RCC. Beneficial Effects of Cinnamon Proanthocyanidins on the Formation of Specific Advanced Glycation Endproducts and Methylglyoxal-Induced Impairment on Glucose Consumption. *J Agric Food Chem*. 2010;58:6692-6.
- Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exper Therap*. 2002;302:66–72.
- Perić MS. Arterijski graftovi u revaskularizaciji miokarda. Monografija, Reprograf, Beograd, 2002.
- Peters U, Poole C, Arab L. Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2001;154:495–503.
- Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:1150–1155.
- Piskula MK, Terao J. Accumulation of (–)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr*. 1998;128:1172–8.
- Plumb GW, De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Cheynier V, Williamson G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation, *Free Rad. Res*. 1998;29:351–8.
- Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF-kappa B and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem*. 2010;336:25–37.
- Putter M, Grotemayer KHM, Wurthwein G, Araghi-Nikam M, Watson RR, Hosseini S, Rohdewald P. Inhibition of smoking-induced platelet aggregation by aspirin and Pycnogenol. *Thromb Res*. 1999;95:155-61.
- Quettier-Deleu C, Voiselle G, Fruchart JC, Duriez P, Teissier E, Bailleul F, Vasseur J, Trotin F. Hawthorn extracts inhibit LDL oxidation. *Pharmazie*. 2003;58:577-81.
- Raguž M. Ateroskleroza. U: *Klinička patofiziologija*. Kujundžić M i sur. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003, str. 148-158.
- Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (–)-Epicatechin Activation of Endothelial Cell Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Hypertension*. 2010;55:1398-1405.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JN, Moore PM. *Pharmacology*. Elsevier Science. 2016: 367-372.
- Ras RT, Zock PL, Draijer R. Tea consumption enhances endothelial-dependent vasodilation; a meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6:1974-8.
- Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:30–5.
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr*. 2000;130:2109–14.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-6.
- Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*. 2001;8:797–807.

- Richelle M, Tavazzi I, Enslen M, Offord EA. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53:22-6.
- Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner AE. Polyphenols from cocoa and vascular health-a critical review. *Int J Mol Sci.* 2009;10:4290-309.
- Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1106–10
- Rowley TJ, Bitner BF, Ray JD, Lathen DR, Smithson AT, Dallon BW, Plowman CJ, Bikman BT, Hansen JM, Dorenkott MR, Goodrich KM, Ye L, O'Keefe SF, Neilson AP, Tessem JS. Monomeric cocoa catechins enhance β -cell function by increasing mitochondrial respiration. *J Nutr Biochem.* 2017;49:30-41.
- Samanta A, Das G, Das S. Roles of flavonoids in plants. *Int J Pharm Sci Tech.* 2011;6:12–35.
- Samari HR, Seglen PO. Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4 carboxamide riboside, and N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1998;273:23758–63.
- Sandow SL, Grayson TH. Limits of isolation and culture: intact vascular endothelium and BK_{Ca}. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:1-7.
- Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric.* 2000;80:1094–117.
- Saponara S, Carosati E, Mugnai P, Sgaragli G, Fusi F. The flavonoid scaffold as a template for the design of modulators of the vascular Cav 1.2 channels. *Br J Pharmacol.* 2011;164:1684–97.
- Saponara S, Testai L, Iozzi D, Martinotti E, Martelli A, Chericoni S, et al. (+/-)-Naringenin as large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK_{Ca}) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2006;149:1013–21.
- Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res.* 2006;71:794–802.
- Sarriá B, Martínez-López S, Sierra-Cinos JL. Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans. *Food Chem.* 2015;174:214–18.
- Satake N, Shibata M, Shibata S. The inhibitory effects of iberiotoxin and 4-aminopyridine on the relaxation induced by beta 1- and beta 2-adrenoceptor activation in rat aortic rings. *Br J Pharmacol.* 1996;119:505–10.
- Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27:209-15.
- Schramm DD, Wang JF, Holt RR. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:36–40.
- Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:1024–1029.
- Shapherd JT, Vanhoutte PM. Veins and Their Control. Philadelphia: W B Saunders, 1975.
- Shen M, Zhao L, Wu RX, Yue SQ, Pei JM. The vasorelaxing effect of resveratrol on abdominal aorta from rats and its underlying mechanisms. *Vasc Pharmacol.* 2013;58,64–70.

- Shrestha SP, Thompson JA, Wempe MF, Gu M, Agarwal R, Agarwal C. Glucuronidation and methylation of procyanidin dimers b2 and 3,3"-di-o-galloyl-b2 and corresponding monomers epicatechin and 3-o-galloyl-epicatechin in mouse liver. *Pharm Res.* 2012;29:856-65.
- Si H, Fu Z, Babu PV, Zhen W, Leroith T, Meaney MP, Voelker KA, Jia Z, Grange RW. Dietary epicatechin promotes survival of obese diabetic mice and *Drosophila melanogaster*. *J Nutr.* 2011;141:1095-100.
- Sies H, Peter CH, Hollman M, Grune T, Stahl W, Biesalski HK, Wilianson G. Protection by Flavanol-Rich Foods Against Vascular Dysfunction and Oxidative Damage:27th Hohenheim Consensus. Conference Adv Nutr. 2012;3:217-22.
- Sims FH, Gavin JB. The early development of intimal thickening of human coronary arteries. *Coronary Artery Dis.* 1990;1:205-213.
- Spencer JPE, Chaudry F, Pannala AS, Srai SK, Debnam E, Rice-Evans C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272:236-41.
- Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev.* 2009;89:1025-78
- Szentiványi M, Bérczi V, Hüttl T, Reneman RS. Venous myogenic tone and its regulation through K⁺ channels depends on chronic intravascular pressure. *Circulation.* 1997;81:109-14.
- Tanaka Y, Tang G, Takizawa K, Otsuka K, Eghbali M, Song M, Nishimaru K, Shigenobu K, Koike K, Stefani E, Toro L. Kv channels contribute to nitric oxide- and a trial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317:341-54.
- Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007;298:49-60.
- Tsang C, Auger C, Mullen W, Bornet A, Rouanet, JM, Crozier A, Teissedre PL. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr.* 2005;94:170-181.
- Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol.* 2017;7:485-581.
- Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng MC. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Throm Res* 1991;64:91-100.
- Valls RM, Llauradó E, Fernández-Castillejo S, Puiggrós F, Solà R, Arola L, Pedret A. Effects of low molecular weight procyanidin rich extract from french maritime pine bark on cardiovascular disease risk factors in stage-1 hypertensive subjects: Randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention trial. *Phytomedicine.* 2016;23:1451-61
- Vazquez-Prieto MA, Bettaieb A, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. (-)-Epicatechin prevents TNF α -induced activation of signaling cascades involved in inflammation and insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2012;527:113-18.
- Virgili F, Kobuchi H, Packer L. Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activate murine RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:1120-9.
- Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 1990;81:491-7.

- Vural KM, Sener E, Tasdemir O. Long-term patency of sequential and individual saphenous vein coronary bypass grafts. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2001;19:140–144.
- Wang S, Tan D, Zhao Y, Gao G, Gao X, Hu L. The effect of Pycnogenol on the microcirculation, platelet function and ischemic myocardium in patients with coronary artery disease. *Eur Bull Drug Res*. 1999;7:19–25.
- Wang N, Ko SH, Chai W, Li G, Barrett EJ, Tao L, Cao W, Liu Z. Resveratrol recruits rat muscle microvasculature via a nitric oxide-dependent mechanism that is blocked by TNF α . *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:195–201.
- Wang SP, Zang WJ, Kong SS, Yu XJ, Sun L, Zhao XF, Wang SX, Zheng XH. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol*. 2008;579:283–8.
- Weisbrod RM, Griswold MC, Yaghoubi M, Komalavilas P, Lincoln TM, Cohen RA. Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1998;125:1695–1707.
- Wellman GC, Quayle JM, Standen NB. ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol*. 1998;507:117–29.
- Wen-Chang C, Feng-Lin H. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1989;32: 181–8.
- WHO. World Health Report 2010: Changing history, Geneva: WHO, 2010.
- Wiecha J, Schlager B, Voisard R, Hannekum A, Mattfeldt T, Hombach V. Ca²⁺-activated K⁺ channels in human smooth muscle cells of coronary atherosclerotic plaques and coronary media segments. *Basic Res Cardiol*. 1997;92:233–9.
- www.heart.org/en/health-topics/peripheral-artery-disease/about-peripheral-artery-disease-pad.
Prisupljeno dana 24.12.2019.
- Xia N, Bollinger L, Steinkamp-Fenske K, Förstermann U, Li H. *Prunella vulgaris* L. Upregulates eNOS expression in human endothelial cells. *Am J Chin Med*. 2010;38:599–611.
- Xu C, Lu Y, Tang G, Wang R. Expression of voltage-dependent K(+) channel genes in mesenteric artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1999;277:1055–63.
- Xu YC, Leung GPH, Wong PYD, Vanhoutte PM, Man RYK. Kaempferol stimulates large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK_{Ca}) channels in human umbilical vein endothelial cells via a cAMP/PKA-dependent pathway. *Br J Pharmacol* 2008;154:1247–53.
- Yang H, Lei X, Yue Y, Xiaoqin L, Manli J, Jiahua N, Nanping W. Procyanidin B2 inhibits NLRP3 inflammasome activation in human vascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2014; 14:599–606.
- Yang JA, He GW. Surgical preparation abolishes endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization in human saphenous vein. *Ann Thorac surg*. 1997;63:429–33.
- Yang Y, Shi Y, Guo S, Zhang S, Cui N, Shi W, Zhu D, Jiang C. PKA-dependent activation of the vascular smooth muscle isoform of K_{ATP} channels by vasoactive intestinal polypeptide and its effect on relaxation of the mesenteric resistance artery. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778:88–96.
- Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR, Herrington DM. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120:502–9.

Zhang J, Huang Y, Shao H, Bi Q, Chen J, Ye Z. Grape seed procyanidin B2 inhibits adipogenesis of 3T3-L1 cells by targeting peroxisome proliferator-activated receptor γ with miR-483-5p involved mechanism. *Biomed Pharmacother.* 2017;86:292-296.

Zhang L, Wang Y, Li D, Ho CT, Li J, Wan X. The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. *Food Funct.* 2016;7:1273-81.

Zhou K, Parker JD. The role of vascular endothelium in nitroglycerin-mediated vasodilation. *Br J Clin Pharmacol.* 2019;85:377-84.

Zhu X, Fang L, Li Y, Du G. Endothelium-dependent and -independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. *Vascul Pharmacol.* 2007;46:160–5.

Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev.* 1997;49:1–52.