

**UTICAJ EKSTRAKTA LISTA MASLINE (*OLEA EUROPEA* L.)  
NA HEMODINAMSKI STATUS I NIVO LIPIDNE  
PEROKSIDACIJE KOD PACOVA SA UROĐENOM  
HIPERTENZIJOM\***

***EFFECT OF OLEA EUROPEA L. LEAF EXTRACT ON HAEMODYNAMIC  
STATUS AND LIPID PEROXIDATION IN SPONTANEOUSLY  
HYPERTENSIVE RATS***

**Miloradović Z., Gvozdenov Maja, Jovović Đurđica,  
Mihailović-Stanojević Nevena, Ivanov M., Vajić Una Jovana,  
Karanović Danijela, Milanović D. S., Grujić Milanović Jelica\*\***

*Hipertenzija je jedan od vodećih uzroka nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Listovi masline se još od davnina koriste u lečenju hipertenzije, međutim mehanizmi njihovog antihipertenzivnog delovanja još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Glavni cilj naše studije bio je da ispitamo akutno dejstvo ekstrakta lista masline na hemodinamiku i lipidnu peroksidaciju pacova sa urođenom hipertenzijom u uslovima normalne i blokirane sinteze azotnog monoksida. Korišćeni su ekstrakt lista masline EFLA®943 i blokator enzima azot monoksid sintaze L-NAME. Blokada sinteze azotnog monoksida je dovela do statistički značajnog povećanja srednjeg arterijskog pritiska, smanjenja frekvence i minutnog volumena srca, povećanja ukupnog perifernog otpora i povećanja lipidne peroksidacije u plazmi. Tretman ekstraktom lista masline je doveo do sniženja srednjeg arterijskog pritiska, smanjenja frekvence i minutnog volumena srca, bez promena lipidne peroksidacije. Ekstrakt lista masline u uslovima blokade azotnog monoksida je doveo do sniženja srednjeg arterijskog pritiska, ukupni periferni otpor je ostao visok, minutni volumen nizak, a lipidna peroksidacija značajno povišena. Opšti zaključak je da ekstrakt lista masline iskazuje snažno antihiperten-*

\* Rad primljen za štampu 08. 11. 2012. godine

\*\* Dr sc. biol. Zoran Miloradović, viši naučni saradnik, Maja Gvozdenov, dipl. mol. biol., dr sc. med. Đurđica Jovović, naučni savetnik, dr sc. biol. Nevena Mihailović-Stanojević, viši naučni saradnik, dr sc. biol., Milan Ivanov, istraživač saradnik, Una Jovana Vajić, dipl. ing. tehnol., Danijela Karanović, dipl. biol., istraživač saradnik, dr sc. neuro. Slađan D Milanović, viši naučni saradnik, dr sc. biol., Jelica Grujić Milanović, naučni saradnik, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, Srbija

*zavno dejstvo, smanjuje volemijsko i tenziono opterećenje srčanog mišića i ne menja stepen lipidne peroksidacije. U uslovima blokirane sinteze azotnog monoksida, ovaj ekstrakt zadržava antihipertenzivno svojstvo, ali usled izazvane snažne endotelne disfunkcije ne poboljšava sistemska hemodinamiku i povećanu lipidnu peroksidaciju.*

*Ključne reči: eksperimentalna hipertenzija, ekstrakt lista masline, smanjena produkcija azot monoksida, lipidna peroksidacija*

## **Uvod / Introduction**

Hipertenzija je jedan od vodećih uzroka nastanka kardiovaskularnih oboljenja, kao i prevremenog morbiditeta i mortaliteta. Mnogi antihipertenzivni lekovi korišćeni u uobičajenim dozama, iskazuju štetne efekte, zbog čega ih treba primenjivati sa velikim oprezom. Iz pomenutih razloga, poslednjih godina su istraživanja u terapiji umerene hipertenzije usmerena ka ispitivanju supstanci prirodnog porekla, koje se najčešće koriste kao dodaci ishrani, a za koje je poznato da imaju pozitivne efekte na sniženje krvnog pritiska. Listovi masline se još od vremena Hipokrata koriste u lečenju rana, groznice, dijabetesa, kostobolje, arteroskleroze i hipertenzije, međutim mehanizmi njihovog antihipertenzivnog delovanja još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Ekstrakt lista masline, EFLA®943 (Fruitarom Switzerland Ltd.), proizvod je koji se koristi kao dodatak ishrani i razvijen je primenom specijalne procedure sušenja lišća evropske masline (*Olea europaea* L). Glavni aktivni princip ovog ekstrakta je oleuropein, koji pripada hemijskoj porodici sekoiridoid glikozida, a za koje je utvrđeno da snižavaju krvni pritisak. (Zarzuolo i sar., 1991). Pokazano je takođe, da oleuropein povećava produkciju snažnog vazodilatatornog molekula, azotnog monoksida (NO) (Visioli i sar., 1998).

Endotelna disfunkcija je fenomen koji je često prisutan kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom. Procesi koji doprinose smanjenom vazorelaksantnom odgovoru u endotelnoj disfunkciji su: smanjena bioraspoloživost vazodilatatornog molekula NO-a (De Artinano i Gonzalez, 1999), usled smanjene ekspresije enzima endotelne azot monoksid sintaze (eNOS) ili nedostatka kofaktora i substrata za eNOS, kao i degradacija NO-a usled dejstva reaktivnih oblika kiseonika (Cai i Harrison, 2000).

Glavni cilj naše studije bio je da ispitamo akutno dejstvo ekstrakta lista masline EFLA®943 na pacovima sa urođenom hipertenzijom (SH), kao eksperimentalnom modelu genetski uzrokovane hipertenzije kod ljudi. Želeli smo takođe, da ispitamo kakav je efekat ovog ekstrakta u uslovima blokirane sinteze azotnog monoksida u hipertenziji, čime smo na izvestan način indukovali uslove izražene endotelne disfunkcije i maligne hipertenzije.

## **Materijal i metode / *Material and methods***

### ***Eksperimentalne životinje i tretman /***

#### ***Experimental animals and treatment***

U eksperimentu su korišćeni odrasli pacovi sa urođenom hipertenzijom (spontaneously hypertensive rats-SHR), muškog pola i prosečne telesne mase oko 300 g, koji su odgajani u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Svi eksperimenti na životinjama su izvođeni u saglasnosti sa nacionalnim i lokalnim institutskim pravilnikom o upotrebi i čuvanju eksperimentalnih životinja (No. 0100-1/10/IMR). Za izvođenje eksperimenta je dobijena i dozvola Etičkog komiteta Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu (br. 0316-1/11).

Životinjama smo davali: L-NAME (N<sup>G</sup>-L-Arginine Methyl Ester; SIGMA); kompetitivni inhibitor enzima azot monoksid sintaze (NOS); ekstrakt lista masline (Olive leaf extract EFLA® 943, Frutarom Switzerland Ltd) i fiziološki rastvor.

### ***Eksperimentalni protokol / Experimental protocol***

Svi naši eksperimenti su izvođeni na anesteziranim životinjama (natrijum-pentobarbital, Nembutal, i.p., 35 mg/kg telesne mase). Životinje smo podelili u četiri eksperimentalne grupe: kontrolnu grupu životinja (Kontrola; n\* = 8); grupu životinja tretiranu L-NAME-om (L-NAME; n = 9); grupu životinja tretiranu ekstraktom lista masline, (OLIVA; n = 9); grupu životinja koje su dobijale i.v. bolus L-NAME pre tretmana ekstraktom lista masline (L-NAME+OLIVA; n = 9); \* broj životinja.

### ***Hemodinamska merenja / Haemodynamic measurements***

Femoralna arterija je preparirana i u nju je ubačen polietilenski kateter (PE-50, Clay-Adams Parsippany, NY, USA) ispunjen fiziološkim rastvorom sa heparinom, koji je spojen sa uređajem za registraciju hemodinamskih signala (9800TCR Cardiomax III-TCR, Columbus Instruments, USA). Na isti način preparirana je i kanulirana desna jugularna vena, preko koje je vršena infuzija (u bolusu) ispitivanih supstanci ili fiziološkog rastvora. Izmerene su početne vrednosti srednjeg arterijskog pritiska (SAP) i frekvence srca (FS) u svim grupama. Kontrolna grupa je preko jugularne vene dobila bolus fiziološkog rastvora (0,2 ml). L-NAME grupa je dobila bolus L-NAME-a (10 mg/kg t.m.) rastvorenog u 0,2 ml fiziološkog rastvora. OLIVA grupa je dobila bolus ekstrakta lista masline (50 mg/kg t.m.) rastvorenog u 0,2 ml fiziološkog rastvora. Ova doza ekstrakta je izabrana na osnovu naše ranije pilot studije (neobjavljeni rezultati) gde je ova doza dovela do promena krvnog pritiska kod SHR, ali ne i kod normotenzivnih *Wistar* pacova. L-NAME+OLIVA grupa je pretretirana bolusom L-NAME-a (10 mg/kg t.m.), a zatim je nakon 5 minuta dobila bolus ekstrakta lista masline (50 mg/kg t.m.). Vrednosti

SAP i FS su registrovane u 5., 10., 15. i 30. minutu posle bolusa i izražavane u mmHg (pritisci) i otkucaji/minutu (frekvence).

Minutni volumen srca je meren metodom termodilucije na uređaju Cardiomax III-TCR i izražavan je u ml/min/kg. Ukupni periferni vaskularni otpor izračunavan je iz vrednosti srednjeg arterijskog pritiska i minutnog volumena prema formuli:  $UPO = SAP/MV$  (UPO- ukupni periferni otpor izražen u mmHg min kg/ml; SAP- srednji arterijski pritisak u mmHg i MV- minutni volumen srca izražen u ml/min/kg t. m.).

#### **Određivanje stepena lipidne peroksidacije (TBARS) / Lipid peroxidation measurement (TBARS)**

Stepen lipidne peroksidacije u plazmi je procenjivan na osnovu određivanja reaktivnih supstanci tiobarbituricne kiseline (engl. Thiobarbituric acid reactive substances – TBARS), a po metodi Ohkawa-e (Ohkawa i sar., 1979) i izražavan u  $\mu\text{mol/ml}$ .

#### **Statistička obrada podataka / Statistical processing of data**

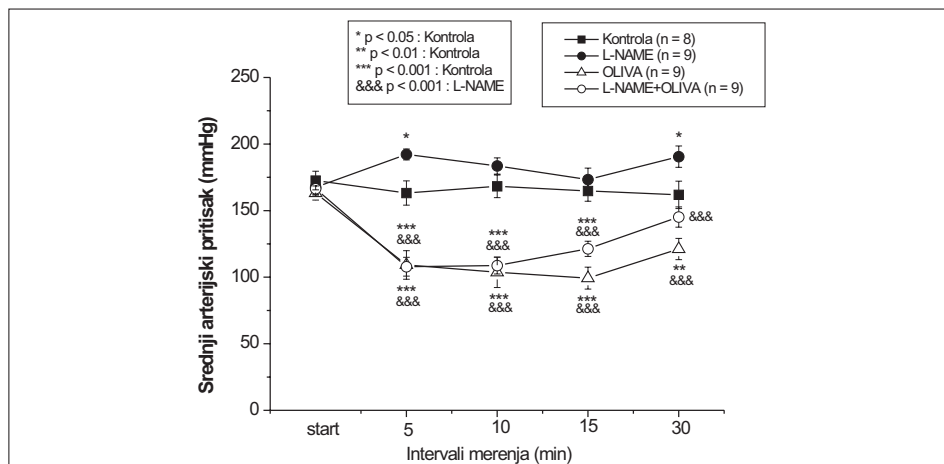
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost sa standardnom greškom srednje vrednosti. Za obradu je korišćena jednostepena analiza varijanse (ANOVA). U slučaju da je ANOVA pokazala statistički značajnu razliku, za određivanje stepena značajnosti između grupa korišćen je Fišerov test, a sve verovatnoće sa stepenom od  $p < 0.05$  smatrane su značajnom. Svi dobijeni rezultati su obrađeni upotrebom *Statistica for Windows 6.0* softvera.

### **Rezultati / Results**

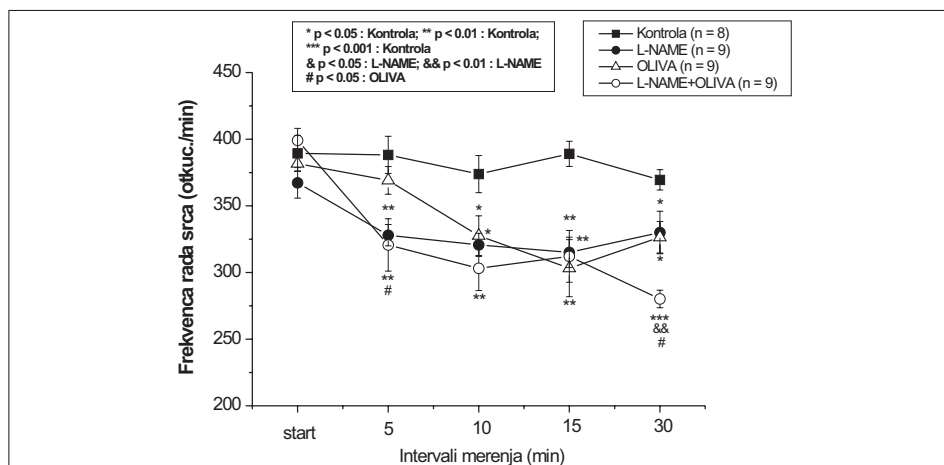
#### **Hemodinamske studije / Haemodynamic studies**

Nakon 5 minuta od početka tretmana, uočava se statistički značajno povećanje SAP kod L-NAME grupe životinja u odnosu na kontrolnu grupu, kao i statistički značajno smanjenje SAP kod OLIVA i L-NAME+OLIVA grupa životinja u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 1). Kod poslednje dve grupe, ovakvo smanjenje arterijskog krvnog pritiska zabeleženo je i nakon 10.-og i 15.-og minuta od početka tretmana. U poslednjem merenju, nakon 30 minuta, uočava se statistički značajno povećanje SAP kod grupe životinja tretirane L-NAME-om, kao i statistički značajno smanjenje SAP kod OLIVA grupe životinja u poređenju sa Kontrolom (slika 1).

Frekvencija srčanog rada bila je statistički značajno smanjena kod L-NAME i L-NAME+OLIVA grupe u odnosu na kontrolnu nakon 5 minuta od početka eksperimenta. Nakon 10 minuta, zapaža se statistički značajno smanjenje FS kod svih tretiranih grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakav trend nastavlja se i u 15. i u 30. minutu (Slika 2).

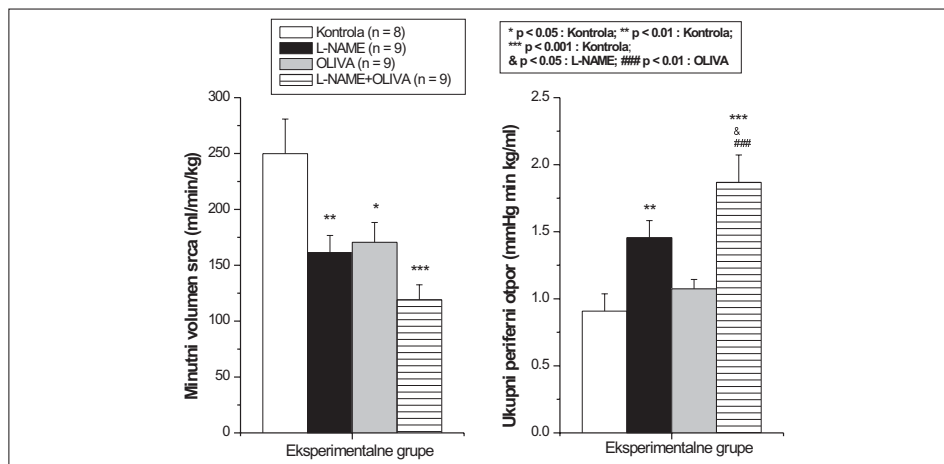


Slika 1. Prikaz promene srednjeg arterijskog pritiska kod eksperimentalnih grupa; n-broj životinja u grupi /  
Picture 1. Display of mean arterial pressure changes in the experimental groups: n-number of animals per group



Slika 2. Prikaz promene frekvence rada srca kod eksperimentalnih grupa; n-broj životinja u grupi /  
Picture 2. Display of heart work frequency in the experimental groups: n-number of animals per group

Usporedni prikaz minutnog volumena srca i ukupnog perifernog otpora predstavljen je na slici 3. Uočava se statistički značajno smanjenje minutnog volumena kod svih tretiranih grupa u odnosu na kontrolnu grupu, kao i statistički značajno povećanje ukupnog perifernog otpora kod L-NAME i L-NAME+OLIVA grupe u odnosu na kontrolnu grupu.

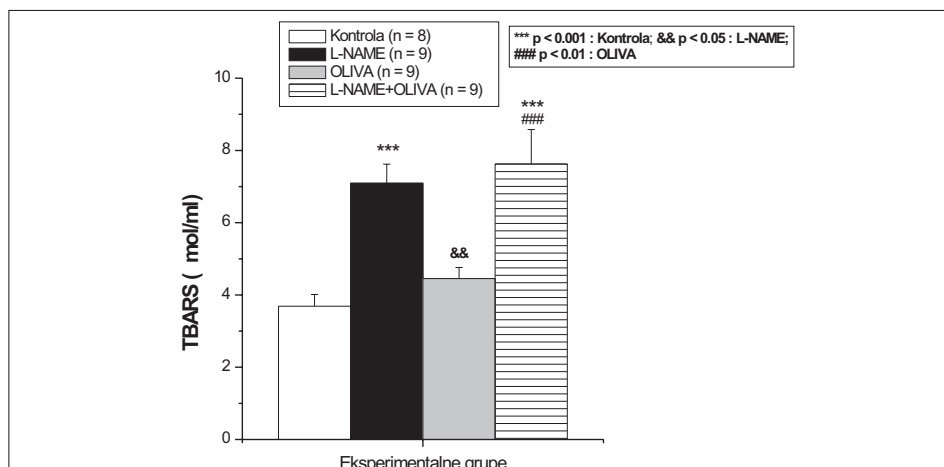


Slika 3. Upporedni prikaz minutnog volumena srca i ukupnog perifernog otpora kod eksperimentalnih grupa; n-broj životinja u grupi /

Picture 3. Comparative review of cardiac output and peripheral resistance in the experimental groups; n-number of animals per group

#### Određivanje stepena lipidne peroksidacije (T-BARS) u plazmi / Lipid peroxidation (T-BARS) in plasma

Na slici 4. uočava se statistički značajno veći stepen lipidne peroksidacije kod L-NAME grupe u odnosu na kontrolnu grupu. Stepem lipidne peroksi-



Slika 4. Prikaz reaktivnih vrsta tiobarbiturine kiseline (TBARS), kao merilo stepena lipidne peroksidacije u plazmi kod eksperimentalnih grupa; n-broj životinja u grupi

Picture 4. Review of reactive kinds of thiobarbituric acid (TBARS), as a measure of lipid peroxidation level in plasma in the experimental groups; n-number of animals per group

dacije bio je značajno niži kod OLIVA grupe u odnosu na L-NAME grupu. Kod L-NAME+OLIVA grupe stepen lipidne peroksidacije je bio značajno veći u poređenju sa OLIVA grupom i kontrolnom grupom.

### **Diskusija i zaključak / Discussion and Conclusion**

Rezultati naše studije ukazuju da blokada sinteze NO-a dovodi do značajnog povećanja srednjeg arterijskog pritiska. Ovi rezultati su slični rezultatima studije u kojoj je hronična primena L-NAME-a (50 mg/L) kod SH pacova dovela do povećanja srednjeg arterijskog pritiska u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Ono i sar., 1995). Dobijeni efekat je i očekivan, jer NO svojim vazodilatatornim delovanjem učestvuje u regulaciji tonusa krvnih sudova (Vane i sar., 1990), tako ovaj rezultat predstavlja potvrdu uspešne blokade sinteze NO-a, odnosno delom uspostavljanjene endotelne disfunkcije.

Nakon tretmana ekstraktom lista masline došlo je do značajnog smanjenja srednjeg arterijskog pritiska, što sugerise da EFLA®943, veoma brzo nakon akutne aplikacije, iskazuje snažno i trajno antihipertenzivno dejstvo kod SHR. Cherif (Cherif i sar., 1996) je u svojoj studiji pokazao da vodeni ekstrakt lista masline dovodi do značajnog smanjenja krvnog pritiska kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom. Antihipertenzivni efekat ekstrakta lista masline, EFLA®943, prikazan je takođe kod *Wistar* soja pacova, kod kojih je hipertenzija indukovana davanjem L-NAME-a (Khayyal i sar., 2002). Studija u kojoj su izolovani triterpenoidi iz listova *Olea europea* L. poreklom iz Grčke, divlje afričke masline i kultivisane *Olea europea* L. uzgajane u Kejptaunu, pokazala je da sva tri izolata, koji sadrže različite procenete oleanolinske i ursolinse kiseline, sprečavaju pojavu hipertenzije i arterioskleroze kod Dahl salt-sensitive insulin rezistentnih pacova, kao genetskog modela hipertenzije (Somova i sar., 2004). Naši rezultati, podržani podacima o antihipertenzivnom delovanju ovog ekstrakta u nabrojanim studijama, nas navode na zaključak da bi EFLA®943 mogla imati primenu kao efikasna terapija u akutnom sniženju krvnog pritiska.

U prikazanoj studiji, tretman ekstraktom lista masline, nakon blokiranosti sinteze NO-a, doveo je do značajnog, ali kratkotrajnijeg smanjenja srednjeg arterijskog pritiska kod SHR. Stanje u kome je kod SHR blokirana sinteza NO-a, dovodi do značajnog povećanja krvnog pritiska, koje po svojim karakteristikama odgovara stanju maligne hipertenzije (Sventek i sar., 1996). U uslovima kada je sinteza NO-a blokirana, kao i u uslovima urođene hipertenzije, ekstrakt lista masline svoje antihipertenzivno dejstvo može ostarivati preko inhibicije angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE inhibitorno dejstvo), gde glavno dejstvo ostvaruju metaboliti oleuropeina i oleacina, nastali delovanjem enzima  $\beta$ -glikozilaze (Hansen i sar., 1996). Tretman u trajanju od 8 nedelja ekstraktom lista masline i antihipertenzivnim lekom kaptoprilom (ACE inhibitor), doveo je do statistički značajnog smanjenja krvnog pritiska kod obe tretirane grupe (Susalit i sar., 2011), što je

ukazalo na sličan mehanizam delovanja ove dve supstance. Još jedan od mogućih mehanizama antihipertenzivnog delovanja ekstrakta lista masline je i blokada kalcijumovih kanala L-tipa. Kalcijum antagonističko dejstvo ekstrakta lista masline pokazano je u prekliničkoj studiji u kojoj su ovim ekstraktom tretirani izolovano srce zeca i kardiomiociti pacova (Scheffler i sar., 2008), a glavni sastojak ekstrakta koji ispoljava ovakav način delovanja je 3,4-dihidroksi-fenil-etanol, produkt degradacije oleuropeina (Rauwald i sar., 1994). Rezultati naše studije navode nas na zaključak da u stanjima hipertenzivne krize, tretman ekstraktom lista masline može da dovede do sniženja krvnog pritiska, ali je taj efekat slabije izražen i manje trajan nego u slučaju kada je očuvana endotelna funkcija.

U našoj studiji, akutna inhibicija sinteze NO-a dovodi do značajnog smanjenja frekvence srčanog rada kod SHR, što se može objasniti kompenzatornim refleksnim odgovorom usled naglog porasta krvnog pritiska i odsustvom delovanja NO-a na srčani mišić. U studiji Chen-a (Chen i Hu, 1997) u kojoj je L-NAME akutno aplikovan u različitim dozama (1–30 mg/kg) kod *Wistar* (WKY) i *SH* pacova, pokazano je dozno-zavisno smanjenje frekvence srčanog rada kod oba soja, sa maksimalnim efektom pri dozi od 10 mg/kg L-NAME. U studiji Kojda (Kojda i sar., 1999) u kojoj je ispitivana uloga endotelne NOS u kontroli srčane frekvence, pokazano je da nakon aplikacije L-NAME-a, kod kontrolnih miševa (koji poseduju eNOS) dolazi do sniženja srčane frekvence u većoj meri nego kod eNOS<sup>-/-</sup> miševa (koji ne poseduju gen za eNOS). Takođe, u studiji u kojoj je izolovan sinoatrijalni čvor morskog praseta, a potom aplikovani donori NO-a u različitim koncentracijama, pokazano je da NO dozno-zavisno utiče na srčanu frekvencu delujući preko NO-cGMP signalnog puta (Musialek i sar., 1997). Ovi podaci ukazuju da endogena produkcija NO-a, učestvuje u regulaciji frekvence srčanog rada, a da blokada sinteze NO-a usporava srčani rad, što je potvrđeno i rezultatima naše studije.

Frekvencija srčanog rada kod OLIVA grupe tretirane ekstraktom lista masline bila je značajno smanjena u odnosu na kontrolnu grupu. Mogući razlog za ovakav efekat lista masline je kalcijum antagonističko dejstvo njegovih aktivnih komponenti. U studiji Higuchi-ja (Higuchi i sar., 1985) pokazano je da blokatori kanala za kalcijum dovode do promena u funkcionisanju autonomnog nervnog sistema i do dozno-zavisnog opadanja krvnog pritiska i frekvence srčanog rada. Takođe, pokazano je da ekstrakt lista masline blokira L-tip kalcijumovih kanala u izolovanom srcu zeca i neonatalnim kardiomiocitama pacova gajenih u kulturi i posledično dovodi do smanjenja srčane frekvence (Scheffler i sar., 2008). Kod OLIVA+L-NAME grupe uočeno je statistički značajno smanjenje srčane frekvence u odnosu na kontrolnu grupu. Po našem mišljenju, do smanjenja frekvence srčanog rada u pomenutim okolnostima može doći usled refleksnih posledica blokade sinteze NO-a i kalcijum antagonističkog delovanja ekstrakta lista masline.

Rezultati naše studije su pokazali da je minutni volumen srca statistički značajno smanjen, dok je ukupni periferni otpor statistički značajno po-



većan nakon akutnog tretmana u kome je blokirana sinteza NO-a u odnosu na kontrolnu grupu pacova. Po Chen-u (Chen i Hu, 1997), pad minutnog volumena kod SH pacova koji su akutno tretirani L-NAME-om, verovatno je uzrokovan padom frekvence srčanog rada, povećanjem ukupnog perifernog otpora i smanjenom perfuzijom miokarda usled smanjenja protoka krvi kroz koronarne arterije. Ova studija je takođe pokazala da nakon akutnog aplikovanja L-NAME-a (10 mg/kg) kod SH pacova, dolazi do snažnijeg povećanja ukupnog perifernog otpora (u odnosu na L-NAME-om tretirane WKY pacove), što ukazuje na poremećenu vazomotornu kontrolu kod ovog soja pacova.

Nakon tretmana ekstraktom lista masline u našoj studiji, zapaža se statistički značajno smanjenje minutnog volumena u odnosu na kontrolnu grupu životinja, dok se ukupni periferni otpor nije statistički značajno promenio. Triterpenoidi izolovani iz listova afričke divlje masline (*Olea europaea*, *subsp. africana*) u koje spadaju oleanolinska kiselina, urosolinska kiselina i uvaol, kao i metilmaslinat izolovan iz listova *Olea europaea* L., ispoljavaju kardioprotektivno i antidisritmično dejstvo, a deluju i kao antagonisti  $\beta$ -adrenergičkih receptora (Somova i sar., 2004), što posledično može dovesti do smanjenja minutnog volumena srca. Po našem mišljenju, ovakav rezultat ukazuje na potencijalno kardioprotektivno dejstvo ekstrakta lista masline, jer smanjivanjem minutnog volumena i krvnog pritiska, bez promene ukupnog perifernog otpora, dolazi do smanjenog opterećenja srčanog mišića.

Kod grupe životinja kojoj je najpre blokirana sinteza NO-a, a potom aplikovan ekstrakt lista masline, došlo je do statistički značajnog smanjenja minutnog volumena i povećanja ukupnog perifernog otpora u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakav rezultat je najverovatnije posledica (pored  $\beta$ -antagonističkog dejstva terpenoida i pada krvnog pritiska) poremećaja kontrole vaskularnog tonusa. Poznato je da NO ima značajnu ulogu u kontroli tonusa malih krvnih sudova (Oparil i sar., 2003), pa zbog toga u tretmanu L-NAME-om, pored pada minutnog volumena, dolazi do povećanja ukupnog perifernog otpora.

U našoj studiji, nakon akutne inhibicije sinteze NO-a, došlo je do značajnog povećanja lipidne peroksidacije u plazmi, što sugeriše da je u toj grupi došlo do snažnog oksidativnog stresa. Ovaj rezultat sličan je sa rezultatom dobijenim u eksperimentu u kojem je kod adultnih mužjaka albino pacova *Wistar* soja nakon tretmana L-NAME-om (40 mg/kg tel. mase/dan) u trajanju od 4 nedelje, došlo do razvoja hipertenzije i povećanja lipidne peroksidacije u plazmi (Saranakumar i Raja, 2011). Antioksidativni potencijal ekstrakta lista masline EFLA® 943 je prikazan u mnogim eksperimentalnim studijama. Dekanski i sar. (Dekanski i sar., 2011) su pokazali da je koncentracija malondialdehida, koji je korišćen kao indikator stepena lipidne peroksidacije, smanjen kod *Wistar* pacova pretretiranih ekstraktom lista masline i izloženih stresu uzrokovanim hladnoćom. Polifenolna jedinjenja ekstrakta lista masline uzrokuju smanjen stepen lipidne peroksidacije *in vivo* u mikrozomima jetre pacova (Gutierrez i sar., 2001), kao i u oksidativnom stresu indukovanom vodonik peroksidom ili ksantin oksidazom *in vitro* (Manna i

sar., 2004). U našem eksperimentalnom dizajnu, tretman ekstraktom lista masline, nije doveo do značajne promene stepena lipidne peroksidacije. Ovaj rezultat nas navodi na zaključak da primenjena doza ekstrakta lista masline nije dovela do takvih metaboličkih promena koje bi uzrokovale pojačano formiranje peroksidnih molekula, kao i da stepen oksidativnog stresa nije značajno izražen kod korišćenog soja SHR. Sa druge strane, blokada sinteze NO-a dovela je do značajno povećanog nivoa TBARS-a, kako primenjena samostalno, tako i tokom udruženog tretmana sa EFLA® 943. Ovakav rezultat ukazuje na to da u uslovima akutne inhibicije sinteze NO-a kod SHR, dolazi do snažnog oksidativnog stresa, a da antioksidativno svojstvo ekstrakta lista masline gubi potencijal u sprečavanju procesa lipidne peroksidacije, odnosno da je nivo oksidativnog stresa u takvim okolnostima nadvladao efekte EFLA® 943.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se izvesti zaključak da ekstrakt lista masline primenjen u dozi od 50 mg/kg, i.v., nakon akutne primene iskazuje snažno antihipertenzivno dejstvo, smanjuje volemijsko opterećenje srčnog mišića i ne menja stepen lipidne peroksidacije kod SHR. U uslovima blokiranog sinteze NO-a, ovaj ekstrakt zadržava antihipertenzivno svojstvo, ali je ono kraćeg trajanja i intenziteta tako da ne uspeva da vrati pogoršanu sistemska hemodinamiku i povećan stepen lipidne peroksidacije nastale usled snažne endotelne disfunkcije kod SHR.

#### ZAHVALNOST / ACKNOWLEDGEMENT:

Ovaj rad je urađen u okviru projekta osnovnih istraživanja br. 175096 pod nazivom „Ispitivanje antihipertenzivnog potencijala supstanci prirodnog i sintetskog porekla u eksperimentalnim modelima kardiovaskularnih i bubrežnih oboljenja“ finansiranim od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. /

*This work has been carried out as a part of the basic research N<sup>o</sup> 175096 entitled: An investigation of antihypertensive potential of substances of natural and synthetic origin in experimental models of cardiovascular and renal diseases, financed by Ministry of Education, Science and Technology Development of the Republic of Serbia.*

#### Literatura / References

1. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87(10): 840-4.
2. Chen HI, Hu CT. Endogenous nitric oxide on arterial hemodynamics: a comparison between normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol* 1997; 273: H1816-23.
3. Cherif S, Rahal N, Haouala M, Hizaoui B, Dargouth F, Gueddiche M, Kallel Z, Balansard G, Boukef K. A clinical trial of a titrated *Olea* extract in the treatment of essential arterial hypertension. *J Pharm Belg* 1996; 51: 69-71.
4. De Artinano AA, Gonzalez VL. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacol Res* 1999; 40(2): 113-24.
5. Dekanski D, Ristić S, Radonjić NV, Petronijević ND, Dekanski A, Mitrović DM. Olive leaf extract modulates cold restraint stress-induced oxidative changes in the rat liver. *Journal of the Serbian Chemical Society* 2011; 76(9): 1207-18.

6. Gutierrez VR, de la Puerta R, Catalá A. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 2001; 217(1-2): 35-41.
7. Hansen K, Adersen A, Brogger Christensen S, Rosendal Jensen S, Nyman U, Wagner Smitt U. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine* 1996; 2:319-25.
8. Higuchi S, Takeshita A, Ito N, Imaizumi T, Matsuguchi H, Nakamura M. Arterial pressure and heart rate responses to calcium channel blockers administered in the brainstem in rats. *Circulation Research* 1985; 57: 244-51.
9. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, Abdallah DM, Nassar NN, Okpanyi SN, Kreuter MH. Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung* 2002; 52(11): 797-802.
10. Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG, Harrison DG. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res* 1999; 42(1): 206-13.
11. Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M, Zappia V. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 461-6.
12. Musialek P, Lei M, Brown HF, Paterson DJ, Casadei B. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current  $I_h$ . *Circ Res* 1997; 81: 60-8.
13. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
14. Ono H, Ono Y, Frohlich ED. Nitric oxide synthase inhibition in spontaneously hypertensive rats. Systemic, renal, and glomerular hemodynamics. *Hypertension* 1995; 26: 249-55.
15. Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med* 2003; 139(9): 761-76.
16. Rauwald HW, Brehm O, Odenthal KP. Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. *Phytother Res* 1994; 8: 135-40.
17. Saravanakumar M, Raja B. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats. *Europ J Pharmacol* 2011; 671: 87-94.
18. Scheffler A, Rauwald HW, Kampa B, Mann U, Mohr FW, Dhein S. *Olea europaea* leaf extract exerts L-type  $Ca^{2+}$  channel antagonistic effects. *J Ethnopharmacol* 2008; 120: 233-40.
19. Somova LI, Shode FO, Mipando M. Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine* 2004; 11(2-3): 121-9.
20. Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Nofiarny D, Perrinjaquet-Mocchetti T, Verbruggen M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine*. 2011; 18(4): 251-8.
21. Sventek P, Li JS, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL. Vascular structure and expression of endothelin-1 gene in L-NAME-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 27(1):49-55.

Vet. glasnik 67 (5-6) 303 - 315 (2013) Miloradović Z. i sar.: Uticaj ekstrakta lista masline (*Olea europea* L.) na hemodinamski status i nivo lipidne peroksidacije kod pacova sa ...

23. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27-36.
24. Visioli F, Bellosta S, Galli C. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci* 1998; 62: 541-6.
25. Zarzuelo A, Duarte J, Jimenez J, Gonzalez M, Utrilla MP. Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med* 1991; 57: 417-9.

## ENGLISH

### EFFECT OF *OLEA EUROPEA* L. LEAF EXTRACT ON HAEMODYNAMIC STATUS AND LIPID PEROXIDATION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Miloradović Z., Gvozdеноv Maja, Jovović Đurđica, Mihailović-Stanojević Nevena, Ivanov M., Vajić Una Jovana, Karanović Danijela, Milanović D. S., Grujić Milanović Jelica

Hypertension is one of the main causes of cardiovascular disorders and since ancient times olive tree leaves have been used in its therapy. However the mechanisms of their antihypertensive effect have not been sufficiently explained yet. The main objective of our study was to investigate acute effect of olive tree leaves extract on haemodynamics and lipid peroxidation in rats with congenital hypertension under normal and blocked synthesis of nitric oxide. For the purpose of our research, there were used olive tree leaf extract EFLA® 943 as well as inhibitor of nitric oxide synthase enzyme L-NAME. Nitric oxide synthesis inhibition led to statistically significant increase of mean arterial pressure, reducing heart rate and cardiac output, increase of total vascular resistance and lipid peroxidation in plasma. Treatment by olive leaf extract led to decrease of mean arterial pressure, reducing the frequency and cardiac output, without change in lipid peroxidation. Olive leaf extract under blockade of nitric oxide led to decrease of mean arterial pressure, total peripheral resistance remained high, cardiac output low, and lipid peroxidation significantly increased. General conclusion is that olive leaf extract has a strong antihypertensive effect, decreases cardiac pre and after load and does not influence lipid peroxidation. Under blockade of nitric oxide synthesis, this extract keeps antihypertensive properties, but due to strong endothelial dysfunction, it is unable to regulate increased total peripheral resistance and marked lipid peroxidation

Key words: experimental hypertension, olive tree leaf extract, decreased nitric oxide production, lipid peroxidation

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ОЛИВКОВЫХ ЛИСТЬЕВ (*OLEA EUROPEA* L.) НА ХЕМОДИНАМИЧЕСКИЙ СТАТУС И УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У КРЫС С ВРОЖДЕННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**

**Милорадович З., Гвозденев Майа, Йованович Джурджица,  
Михаилович-Станоевич Невена, Иванов М., Ваич Уна Йована,  
Каранович Даниела, Миланович Д. С., Груич Миланович Елица**

Гипертензия является одной из основных причин сердечно-сосудистых заболеваний. Оливковые листья с древних времен используются для лечения гипертонии, но механизмы их антигипертензивного действия еще не полностью изучены. Главная цель нашего исследования была испытать действие экстракта оливковых листьев на гемодинамику и перекисное окисление липидов у крыс с врожденной гипертензией в условиях нормального и заблокированного синтеза оксида азота. Были использованы экстракт оливковых листьев EFLA 943 и блокатор синтеза оксида азота L-NAME. Блокада синтеза оксида азота приводит к увеличению общего периферического сопротивления и к увеличению перекисного окисления липидов в плазме, уменьшает частоту сердечных сокращений и сердечный выброс. Лечение экстрактом оливковых листьев привело к снижению среднего артериального давления, снижению частоты сердечных сокращений и сердечного выброса без изменения перекисного окисления липидов.

Экстракт оливкового листа в условиях блокады оксида азота привел к снижению среднего артериального давления, общее периферическое сопротивление осталось высоким, сердечный выброс низким, а перекисное окисление липидов значительно увеличилось. Общий вывод таков: экстракт оливковых листьев является сильным антигипертензивным средством, он уменьшает нагрузку на сердце: нагрузку объемом и нагрузкой сопротивлением, и не меняет уровень перекисного окисления липидов. В условиях блокады синтеза оксида азота, этот экстракт задерживает антигипертензивные свойства, но из-за сильной эндотелиальной дисфункции не улучшает системную гемодинамику и увеличенное перекисное окисления липидов.

Ключевые слова: экспериментальная гипертония, экстракт оливковых листьев, уменьшение производства оксида азота, перекисное окисление липидов

