

Uticaj kardiotioničnog glikozida oleandrina na srce žabe

U ovom radu je već poznato kardiotionično dejstvo oleandrina iz lijandera (Nerium oleander) opisano na model sistemu srca žabe (Rana esculenta). Oleandrin je primenjivan u vidu alkoholnog rastvora, koji je dobijen nakon hromatografskog razdvajanja na koloni iz sirovog ekstrakta. Preparati srca pravljani su tako što su žabe uvedene u anesteziju, bez dekapitacije, kako bi se očuvao periferni krvotok, a zatim je grudni koš otvaran, kako bi se omogućio pristup srcu. Rastvor oleandrina je direktno nakapavan na srce, a odgovor sistema praćen preko osciloskopa povezanog na računar. Rezultati pokazuju da oleandrin na model sistemu srca žabe pojačava intenzitet kontrakcije srca, a da pri tom ne menja frekvenciju rada srca.

Uvod

Lijander (*Nerium oleander*) je žbun ili nisko drvo koje raste u zemljama Mediterana. List ove biljke sadrži 1.5% kardiotioničnih heterozida, od kojih je najvažniji oleandrin (Kovačević 2004).

Oleandrin (C₃₂H₄₈O₉) je polifenolni kardiotionični glikozid. U čistom obliku oleandrin je igličast kristal, bez boje i mirisa, gorkog ukusa. Nerastvorljiv je u vodi, a rastvorljiv u koncentrovanom etanolu i hloroformu. Oleandrin je fotosenzibilan, ali je termostabilan (www.inchem.org).

Kao kardiotionik, oleandrin ispoljava snažno delovanje na kontraktilnost srca. Dva osnovna mehanizma kojima kardiotionici deluju su inhibicija enzima Na⁺/K⁺ ATP-aze i dejstvo na metabolizam kalcijuma.

Pod uticajem kardiotioničnih heterozida dolazi do smanjenja aktivnosti enzima Na⁺/K⁺ ATP-aze, a

time se smanjuje i energija potrebna za funkcionisanje natrijumske pumpe. Usled nesposobnosti da reguliše osmotsko i elektrohemijsko stanje putem izmene jona natrijuma i kalijuma, ćelija ovo kompenzuje ubacivanjem jona kalcijuma. Ovo dovodi do pojačanja akcionog potencijala, pojačanja snage i srčane kontrakcije. Kardiotionični glikozidi zbog ovakvog farmakološkog dejstva imaju terapijsku primenu, međutim, razlika između terapijskih i smrtnih doza je veoma mala (Lukić 1993).

Cilj ovog rada je ispitivanje promene energije signala i frekvencije srca žabe pod uticajem rastvora oleandrina izolovanog iz lijandera.

Materijal i metode

Energije izlaznih signala srca žaba tretiranih rastvorima oleandrina (za koje smo uzeli da su srazmerne jačini kontrakcije srca) određivane su pomoću za tu svrhu montirane aparature priključene na osciloskop povezan sa računarom. Merenja su vršena na 10 žaba, podeljenih u dve grupe po pet, a srce svake jedinke je prvo bilo tretirano Ringerovim rastvorom. Pet žaba iz prve grupe tretirane su sa 0.1 mL rastvora oleandrina koncentracije 0.13 g/L. Prvo merenje je vršeno odmah, a drugo 15 do 20 sekundi nakon delovanja glikozidnog rastvora na srce u vremenskim intervalima od 3 sekunde. Na srca pet žaba iz druge grupe nakapavano je po 0.2 mL rastvora oleandrina koncentracije 0.13 g/L, a energija izlaznog signala određivana je u vremenskim intervalima od 5 i 10 sekundi. Istom aparaturom meren je i sam izlazni signal. Upoređivanjem filtriranih spektara izlaznih signala određivana je promena frekvencije rada srca žaba tretiranih Ringerovim rastvorom i rastvorima oleandrina. Za potrebna merenja srce žabe je preparirano na način opisan u sledećem delu teksta.

Aleksandra Mandić (1989), Subotica, Jovana Mikića 48, učenica 2. razreda Gimnazije "Svetozar Marković" u Subotici

Preparat srca žabe *in situ*

Prilikom preparacije srca korišćen je Ringerov rastvor za hladnokrvne životinje. Ringerov rastvor sadržao je:

- 120 mM natrijum-hlorid – 7.02 g
- 2 mM kalijum-hlorid – 0.149 g
- 2 mM kalcijum-hlorid – 0.222 g
- 5 mM TRIS-HCl – 0.182 g HCl i 5 mL TRIS-a

Za model sistem korišćene su žabe koje su skupljane u Petničkom jezeru u julu 2006. Mase žaba su iznosile od 60 do 80 g.

Žabe su bile anestetizirane etrom, pri čemu je srce ostajalo u organizmu vezano za krvotok. Pošto je bilo neophodno sačuvati krvotok, žabe nisu bile dekapitovane. Žabe su bile okrenute ventralnom stranom na gore, a ekstremiteti su bili pričvršćeni čiodama za podlogu. U gornjoj polovini tela je bilo potrebno da se napravi trouglast izrez na koži i telesnom zidu. Izrez se završavao presecanjem ključnjača. Odstranjivanjem telesnog zida srce je ostajalo otkriveno u perikardijalnoj duplji. Perikardijalna opna je pažljivo skidana tako što je zasecana pored srca (Nešić 2000).

Ekstrakcija oleandrina iz lijandera

Postupak izolacije oleandrina iz lijandera i pravljenja rastvorâ potrebnih za ispitivanje njegovog uticaja izvršen je prema uputstvima opisanim na sajtu <http://www.inchem.org>.

Priprema ekstrakta. Isitnjeno je 10 g lista lijandera u keramičkom avanu. Napravljena je smeša etanol-voda u odnosu 2 : 3 (v/v). Odmereno je 175 mL smeše i sve sipano u balon zapremine 500 mL, a zatim dodat isitnjeni list lijandera. Sve je refluktovano 20 minuta, a potom presuto u erlenmajer i profiltrirano kroz filter papir. Dobijeno je 148 mL ekstrakta. Posle filtracije ekstrakt je uparen do 5 mL.

Hromatografija na koloni. Kolona je pripremljena tako što je izmešano 20 g aluminijum-oksida (Al_2O_3) i 50 mL etanola. Kada se adsorbent istaložio, supernatant je dekantovan, a talog je ekvilibrisan etanolom. Nakon ekvibracije kolone naneto je 2.5 mL uzorka i sipano oko 50 mL etanola, a u 12 epruveta hvatane su frakcije od 3 mL.

Određivanje apsorbance frakcija. Apsorbanca frakcija određivana je spektrofotometrom na talasnoj dužini 220 nm. Frakcije koje su imale najveću apsor-

bancu korišćene su daljem toku eksperimenta, s tim što je jedna frakcija izbačena zbog sumnje da osim oleandrina sadrži još neke primese. Preostale dve frakcije su spojene, i ponovo izmerena apsorbancu, a zatim izračunata koncentracija pomoću Lambert-Beer-ovog zakona:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A – apsorbancu

b – širina kivete (1 cm)

c – koncentracija

ϵ – ekstinkcioni koeficijent (za oleandrin iznosi 15849).

Dobijeno je 5 mL rastvora oleandrina masene koncentracije 0.13 g/L koji je korišćen za tretiranje žabljih srca.

Rezultati i diskusija

Iz tabele 1 se vidi da do povećanja energije signala dolazi kod svih jedinki, osim kod žabe 2, gde je energija izlaznog signala srca tretiranog samo Ringerovim rastvorom bila veća od energije izmerene nakon delovanja rastvora oleandrina.

Tabela 1. Energije signala za prvih 5 žaba

	Energija signala [10^{-6} W]			Povećanje energije (puta)	
	R	O1	O2	O1	O2
žaba 1	0.6	1.6	8.7	2.67	14.5
žaba 2	2.2	2.5	1.0	1.14	0.45
žaba 3	0.04	1.0	0.9	25.0	22.5
žaba 4	0.03	0.1	0.4	3.33	13.33
žaba 5	0.3	6.1	5.6	20.33	18.67

R – Ringer, O1 – oleandrin 1, O2 – oleandrin 2 (15–20 s)

Iz tabele 2 se primećuje da je rastvor kardiotoičnog glikozida izazvao povećanje energije signala kod većine jedinki. Do smanjenja energije izlaznih signala došlo je u drugom merenju kod žabe 7, u prvom merenju kod žabe 8 i žabe 9, dok je kod žabe 10 rastvor oleandrina izazvao isključivo smanjenje energije izlaznog signala.

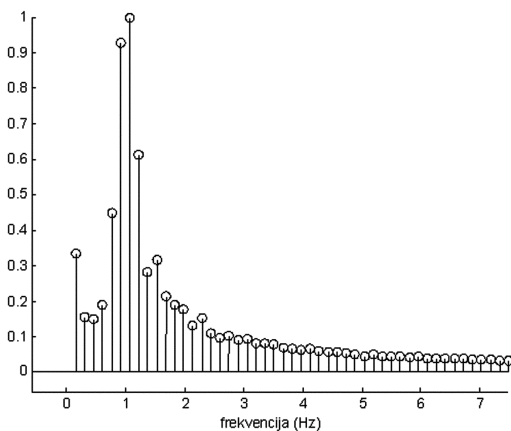
Rastvor oleandrina je na srca svih žaba, osim na srce žabe 10, delovao tako što je povećao snagu kontrakcije. Ovo se može zaključiti jer je samo kod žabe

10 došlo do smanjenja energije izlaznog signala nakon delovanja rastvorom oleandrina, što nije u skladu sa očekivanim rezultatima. Ovo odstupanje se može objasniti samom prirodom ovog kardiotonika ili činjenicom da se merenja ne vrše na jednom već na 10 različitih srca.

Tabela 2. Energije signala za pet žaba iz druge grupe

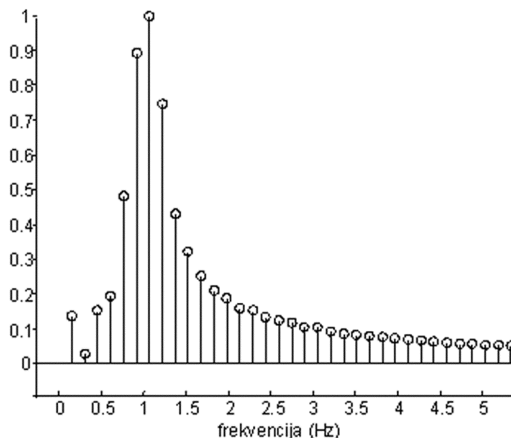
	Energija signala [10 ⁻⁵ W]				Povećanje energije (puta)	
	R1	R2	O1	O2	O1	O2
žaba 6	4.9	1.7	5.8	13	1.18	7.65
žaba 7	4.0	15.2	8.6	9.8	2.15	0.64
žaba 8	17.6	66.7	5.1	76.4	0.29	1.15
žaba 9	9.2	47.5	1.5	50.8	0.16	1.07
žaba 10	320	3480	300	890	0.94	0.26

R1 – Ringer 5 s, R2 – Ringer 10 s, O1 – oleandrin 5s, O2 – oleandrin 10 s



Slika 1. Spektar signala (nakon filtriranja) srca koje je tretirano samo Ringerovim rastvorom

Figure 1. Spectrum of heart signal (after filtration), after treatment with Ringer's solution



Slika 2. Spektar signala (nakon filtriranja) srca koje je tretirano Ringerovim rastvorom i rastvorom oleandrina

Figure 2. Spectrum of heart signal (after filtration), after treatment with Ringer's solution and oleandrin solution

Upoređivanjem filtriranih spektara signala srca svih žaba obe grupe može se primetiti da se na frekvenciji od 1 Hz konstantno pojavljuju 2 pika približno jednakih intenziteta, bez obzira da li je srce tretirano samo Ringerovim rastvorom (slika 1) ili i rastvorom oleandrina (slika 2). Ovaj rezultat pokazuje da rastvor ovog kardiotoničnog glikozida ne utiče na frekvenciju rada srca, odnosno da mu ne remeti normalan ritam.

Zaključak

Iz rezultata dobijenih delovanjem rastvora oleandrina na srce žabe, može se zaključiti da dolazi do povećanja energije izlaznog signala, odnosno jačine srčane kontrakcije, a da se pri tom frekvencija srca bitno ne menja. U većini slučajeva rastvor oleandrina izazvao je povećanje energije izlaznog signala. U pojedinim slučajevima, verovatno zbog faktora kao što je sama priroda oleandrina, rastvor nije odmah ili uopšte delovao. Činjenica da ovaj kardiotonični glikozid utiče na pojačanje srčane kontrakcije, a da ne remeti normalan ritam srca, može se upotrebiti kao opravdanje za njegovu potencijalnu upotrebu.

Literatura

Kovačević N. 2004. *Osnovi farmakognozije*. Beograd: Srpska školska knjiga

Lukić P. B. 1993. *Farmakognozija*. Beograd

Nešić O., Antić S., Gašić-Milenković J., Radenović L., Andus P. 2000. *Eksperimentalna fiziologija I sa praktikumom*. Beograd

www.inchem.org

Aleksandra Mandić

The Effect of Cardiac Glycoside Oleandrin on Frog's Heart

Oleander (*Nerium oleander*) is an evergreen shrub, native only in the Mediterranean region. This plant contains about 1.5% of cardiac glycosides. The most important one is oleandrin which shows a strong effect on the heart muscle.

The purpose of this project was to show oleandrin's effect on the outgoing signal energy and frequency of a frog's heart (*Rana esculenta*).

Oleandrin was extracted by column chromatography from leaves and flowers of oleander. Alcoholic solutions of oleandrin were used. The frogs' hearts were prepared by *in situ* method (Nešić 2000).

Measurements were done on 10 frogs. There were two groups and each contained 5 frogs. First, each heart was treated with Ringer's solution. In the first group an oleandrin solution with a 0.013 g/L concentration was used. In the second group frogs were treated with a 0.026 g/L oleandrin solution. The solutions were poured out in drops directly on frogs' hearts. The outgoing signal and frequency of hearts were measured by the registration system in time periods of 3, 5 and 10 seconds.

The results show that the oleandrin solution had an effect on the heart muscle and it increased the signal energy in almost every case. The only frog's heart that the oleandrin solution did not affect was the heart of Frog 10. In this case, the solution did not increase signal energy, it decreased it in both measurements. Comparing heart signals of every frog from both groups it can be seen that on a frequency of 1 Hz two peaks constantly show up, regardless of whether the heart was treated with the Ringer or oleandrin solution. This means that oleandrin solutions had no effect on the frequency of the hearts. From the results it can be concluded that oleandrin increases outgoing signal energy, while the frequency of the heart is not changed. In some cases, probably because of the nature of this cardiac glycoside, the solution had no effect on frog's hearts. The fact that oleandrin increases the force of contraction, but has no effect on the frequency of the heart, can be used for its potential use as a medicine.

