

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**



Jovana N. Rajković

**Efekti otvarača kalijumovih kanala
na izolovane bajpas graftove bolesnika sa
dijabetes melitusom tip 2**

doktorska disertacija

BEOGRAD, 2020

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE**



Jovana N. Rajković

**The effects of the potassium channel
openers on bypass grafts isolated from
patients with type 2 diabetes mellitus**

Doctoral Dissertation

BELGRADE, 2020

MENTOR:

prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica _____

redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

prof. dr Miodrag Perić _____

upravnik Klinike za kardiohirurgiju na Institutu za kardiovaskularne bolesti "Dedinje", vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

prof. dr Miroslav Radenković _____

redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

prof. dr Gordana Dragović Lukić _____

vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

prof. dr Svetozar Putnik _____

vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

doc. dr Sofija Glumac _____

docent Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

prof. dr Milica Atanacković-Krstonošić _____

vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu

DATUM ODBRANE: _____

Na početku i na kraju, pre svega, HVALA mojoj mentorki prof. dr Ljiljani Gojković-Bukarici koja me je uvela u svet farmakologije jonskih kanala i omogućila da svoj rad obavljam u prostorijama njene laboratorije. HVALA što mi je bez ikakve protekcije i krajnjih namera, iz čiste ljubavi prema nauci, omogućila da se posvetim svom radu i da sve vreme bude podrška u tom procesu deleći svoje znanje, ideje i vizije. HVALA što je omogućila saradnju sa vrhunskim inostranim laboratorijama ostavljajući mnogo prostora za lični napredak.

HVALA mom komentoru prof. dr Miodragu Periću koji je svoju veličinu pokazao lakoćom naše saradnje, podršci i brzom reakciji na svakom koraku izrade ove teze.

HVALA članovima komisije na izdvojenom vremenu, savetima, volji da podrže ovaj rad i stanu iza njega svojom stručnošću i kredibilitetom, kao i da svojim korekcijama doprinesu njegovoj izradi.

HVALA najdivnijem profesoru Helmutu Hajnleu bez čije ogromne pomoći u nabavci supstanci izrada ove teze nikada ne bi bila moguća, a koji je u međuvremenu postao veliki lični prijatelj.

HVALA Mileni, najcenjenijem laboratorijskom tehničaru, na svim savetima, instrukcijama, bezrezervnoj pomoći i nesebičnosti da me uvede u osnove laboratorijskog rada i otkrije sve tajne metodologije koja će predstavljati osnovu ove teze. Učeći vas strpljenju i poštenju pokazala je svima šta znači etičnost u eksperimentalnom radu.

HVALA kolegama iz laboratorije Radi, Vladi i Milošu na svakoj sugestiji, pomoći u tumačenju rezultata, smernicama i izdvojenom vremenu u čitanju ovog rada. HVALA mojoj kumi Nati koja je u međuvremenu postala deo naše laboratorije i našeg tima.

HVALA glavnoj sestri sa hirurškog odeljenja Instituta za kardiovaskularne bolesti "Dedinje" Branki Ilić, na višegodišnjoj saradnji i pomoći pri prikupljanju uzoraka i svih podataka, radeći sve volonterski uz divnu komunikaciju i trud.

HVALA kolegama iz laboratorije za endokrinologiju Instituta Vinča, kao i kolegama iz laboratorije za histologiju dr Aleksandar Đ. Kostić, koju su razumevajući osnovu jednog rada i neophodnosti saradnje, širom mi otvorili vrata svojih laboratorija, obučili za rad, radili deo eksperimenata i bili tu za svaku pomoć, nedoumicu, a posebno HVALA Jeci, Sneži, Goranu, Jeleni i prof. dr Labudović-Borović.

HVALA mom čoveku što je bio podrška i mirna luka tokom svih turbulentnih perioda koje izrada jedne teze nosi sa sobom. HVALA Ejmi na svojoj pozitivnoj energiji koju je širila. HVALA mami i tati, što su bili vetar u leđa i što su znali da podele prave savete i budu oslonac tokom čitavog mog školovanja. HVALA bratu i snajci na podršci i razumevanju.

Jovana Rajković

SAŽETAK

Efekti otvarača kalijumovih kanala na izolovane bajpas graftove bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2

Ciljevi studije bili su da ispitamo ulogu različitih kalijumovih (K) kanala u kontroli vaskularnog tonusa i antivazokonstriktornoj ulozi na bajpas graftovima dobijenim od pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) nakon bajpas operacije.

Preostali segmenti humane vene safene (HVS) i unutrašnje torakalne arterije (ITA) dobijeni su od pacijenata bez i sa DMT2. U eksperimentalnom radu koristili smo sistem za izolovane organe kojim smo ispitivali farmakološka svojstva otvarača K kanala i molekularno-biološke tehnike kako bismo detektovali promene u ekspresiji i lokalizaciji K kanala na ovim graftovima.

Farmakološki eksperimenti su pokazali da pinacidil daje uporedivu relaksaciju HVS pacijenata sa i bez DMT2. Takođe, pinacidil produkuje relaksaciju dijabetične ITA uporedivu sa dijabetičnom HVS bez razlike u senzitivnosti. Molekularne tehnike su pokazale smanjenu ekspresiju SUR2B subjedinice kod HVS pacijenata sa DMT2 ukazujući da je povećana osetljivost HVS kod NDM pacijenata uslovljena većom ekspresijom funkcionalnih K_{ATP} kanala u vaskularnom glatkom mišiću. Subjedinice Kir6.x koje ulaze u sastav K_{ATP} kanala su pokazale smanjenu ekspresiju na dijabetičnoj ITA.

Dobijeni rezultati studije pokazali su da pinacidil ima komparabilno vazodilatatorno i antivazokonstriktorno dejstvo na humanim bajpas graftovima kod pacijenata bez i sa DMT2. Podaci mogu biti klinički korisni pružajući dokaz da dijabetes izaziva oslabljenu dilataciju humane vene i arterije i da se efekti pinacidila delimično ostvaruju preko različitih K kanala na glatko-mišićnom sloju grafta. Takođe, njima se može analizirati opravdanost rezultata kliničkih ispitivanja koji favorizuju bajpas operaciju umesto perkutane koronarne intervencije za direktnu revaskularizaciju srca kod pacijenata sa DMT2.

Ključne reči: otvarači kalijumovih kanala, bajpas graftovi, dijabetes melitus tip 2, kalijumovi kanali, humana vena safena, humana unutrašnja torakalna arterija, pinacidil, imunohistohemijsko bojenje, Western blot.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Medicinska farmakologija

UDK:

SUMMARY

Effects of potassium channel openers on isolated bypass grafts from patients with type 2 diabetes mellitus

The objectives of our study were to examine the role of different potassium (K) channels in the control of vascular tone and the antivasoconstrictive role on bypass grafts obtained from patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) after bypass surgery.

Leftover segments of human saphenous vein (HSV) and internal thoracic artery (ITA) were obtained from patients with and without T2DM. In our experimental work, we used an isolated organ system to examine the pharmacological properties of K channel openers and molecular-biological techniques to detect changes in the K channels expression and their localization in bypass grafts.

The pharmacological experiments showed that the relaxation caused by pinacidil was comparable in HVS patients with and without T2DM. Also, pinacidil produced relaxation of diabetic ITA comparable to diabetic HVS without difference in the sensitivity. Molecular techniques have shown decreased expression of the SUR2B subunit in HVS T2DM patients indicated that the increased sensitivity of HVS in patients without T2DM is due to higher expression of functional K_{ATP} channels in the vascular smooth muscle. Significantly lower expression of the Kir6.x subunits of the K_{ATP} channels was observed in diabetic ITA.

The obtained results of our study showed that pinacidil has a comparable vasodilatory and antivasoconstrictory effects on human bypass grafts in patients with and without T2DM. These data may be clinically useful since they provide evidence that diabetes causes impaired dilatation of the human vein and artery indicated that the effects of pinacidil are partially mediated through various K channels on the smooth muscle of the graft. They can, also, serve as an objective to justify the results of clinical trials that favor CABG surgery instead of percutaneous coronary intervention for direct heart revascularization in patients with T2DM.

Key words: potassium channel openers, bypass grafts, type 2 diabetes mellitus, potassium channels, human saphenous vein, human internal thoracic artery, pinacidil, immunohistochemical staining, Western blot.

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Medical Pharmacology

UDK:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kalijumovi kanali	1
1.2. Uloga i tipovi K-kanala u glatkom mišiću krvnih sudova	4
1.2.1. K_{ATP} kanali	5
1.2.2. BK_{Ca} kanali	7
1.2.3. K_v kanali	8
1.3. Modulatori aktivnosti K-kanala	9
1.3.1. Otvarači kalijumovih kanala (OKK)	9
1.3.2. Blokatori kalijumovih kanala (BKK)	10
1.4. Bajpas graftovi – sličnosti i razlike između arterijskih i venskih krvnih sudova	11
1.5. Dijabetes melitus i KVS	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1. Farmakološki eksperimenti	17
3.1.1. Vazodilatatorni efekat	19
3.1.2. Antivazokonstriktorni efekat - noradrenalin	19
3.1.3. Antivazokonstriktorni efekat - električna stimulacija	20
3.2. Molekularno biološke metode: Western blot i imunohistohemijska analiza	20
3.2.1. Western blot analiza	20
3.2.2. Imunohistohemijska analiza	21
3.3. Supstance i rastvori	21
3.4. Statistička analiza	22
4. REZULTATI	23
4.1. Sociodemografske i kliničke karakteristike bolesnika	23
4.2. Poređenje vazodilatatornog efekta pinacidila na graftovima bolesnika sa različitim kliničkim profilom	25
4.3. ULOGA K-KANALA U VAZODILATATORNOM EFEKTU PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI	27
4.3.1. Efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2	27
4.3.2. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2	28
4.4. ULOGA K-KANALA U VAZODILATATORNOM DEJSTVU PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI	34
4.4.1. Efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2	34

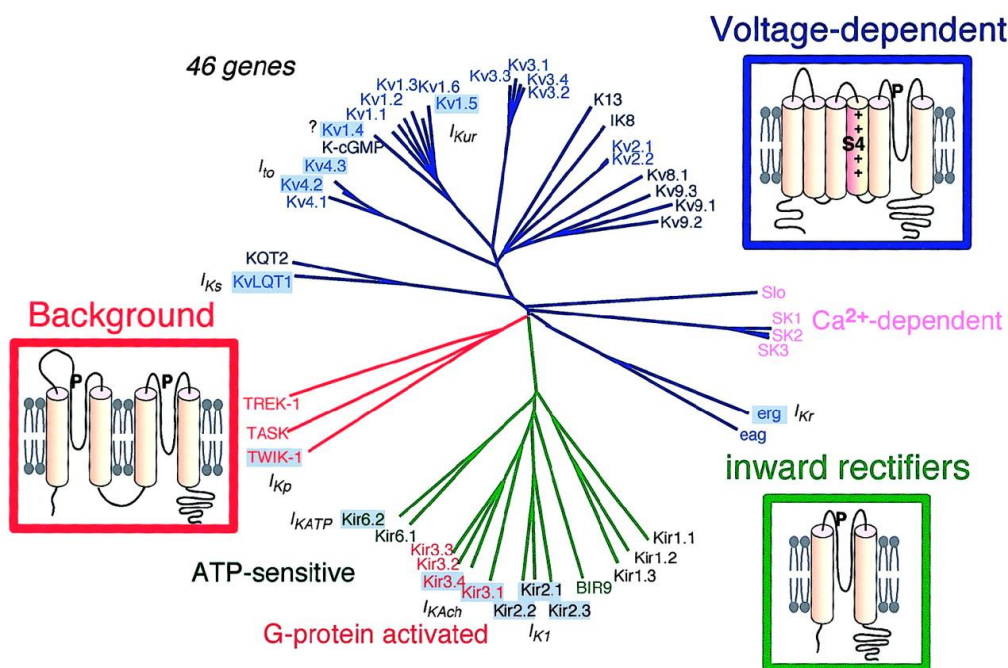
4.4.2. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2	34
4.5. KALIJUM-NEZAVISNI EFEKAT PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI PACIJENATA SA I BEZ DMT2	40
4.6. KALIJUM-NEZAVISNI EFEKAT PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI PACIJENATA SA DMT2	47
4.7. EFEKAT P1075 NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI PACIJENATA SA I BEZ DMT2.....	48
4.8. EFEKAT NS1619 NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI PACIJENATA SA DMT2	49
4.9. ULOGA K-KANALA U ANTIVAZOKONTRIKTORNOM DEJSTVU PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI	50
4.9.1. Efekat pinacidila na kontrakciju humane vene safene pacijenata sa DMT2 prouzrokovanu električnom stimulacijom	50
4.9.2. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na električnu stimulaciju humane vene safene pacijenata sa DMT2	51
4.9.3. Efekat pinacidila na kontrakciju humane vene safene pacijenata sa DMT2 prouzrokovanu egzogenim noradrenalinom	52
4.9.4. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na noradrenalinske kontrakcije humane vene safene pacijenata sa DMT2	53
4.9.5. Efekat pinacidila na kontrakciju humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa DMT2 prouzrokovanu egzogenim noradrenalinom	55
4.9.6. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na noradrenalinske kontrakcije humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa DMT2	56
4.9.7. Upporedna analiza efekata pinacidila na neurogene i noradrenalinske kontrakcije na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa DMT2	58
4.10. EKSPRESIJA RAZLIČITIH (POD)TIPOVA K-KANALA NA HUMANIM BAJPAS GRAFTOVIMA PACIJENATA SA/BEZ DIJABETES MELITUSA TIP 2	59
4.10.1. Identifikacija subjedinica K-kanala na humanoj veni safeni pacijenata sa/bez dijabetes melitusa tip 2 imunohistohemijskim bojenjem.....	59
4.10.2. Identifikacija subjedinica K-kanala na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa/bez dijabetes melitusa tip 2 imunohistohemijskim bojenjem.....	61
4.10.3. Ekspresija subjedinica K-kanala na humanoj veni safeni pacijenata sa/bez dijabetes melitusa tip 2 Western blot analizom.....	61
4.10.4. Ekspresija subjedinica K-kanala na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa/bez dijabetes melitusa tip 2 Western blot analizom	63
5. DISKUSIJA	66
ZAKLJUČCI	77
LITERATURA	79

1. UVOD

Graftovi humane vene safene (HVS) i unutrašnje torakalne arterije (ITA) predstavljaju najčešće korišćeni materijal za transplantaciju u kardiovaskularnoj hirurgiji. Adekvatna struktura i funkcija ovih graftova je od presudnog značaja za uspeh operacije aortokoronarnog premošćivanja (CABG). Pored performansi samih graftova, smanjenju postoperativnog morbiditeta doprinosi endotelna očuvanost krvnih sudova pacijenata i njihova sposobnost prilagođavanja varijabilnom krvnom protoku i potrebama organizma. Ipak, sve veći udeo u ukupnom broju pacijenata koji podležu ovom zahvatu čine pacijenti sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2). Kod ovih bolesnika postoji smanjena vazorelaksacija i povećana sklonost ka vaskularnim komplikacijama, što povećava rizik od postoperativnog spazma graftova. Sam proces relaksacije krvnih sudova uključuju faktore koji potiču od endotela i one koje su posledica hiperpolarizacije membrane vaskularnih glatkih mišića nakon aktivacije različitih kalijumovih (K) kanala. Kako je kod pacijenata sa DMT2 endotelna funkcija kompromitovana, otvara se pitanje kvalitativne i kvantitativne analize endotel-nezavisnih mehanizama kojima vazoaktivne supstance ostvaruju svoj povoljan uticaj na vaskularni tonus. Efekat pomenutih supstanci se postiže otvaranjem različitih K kanala (otud njihov naziv – otvarači kalijumovih kanala (OKK)) a to posledično dovodi do relaksacije vaskularne glatke mišićne ćelije. Zahvaljujući tome, dugi niz godina se ispitala njihova potencijalna terapijska vrednost.

1.1. Kalijumovi kanali

Jonski kanali predstavljaju imponantnu grupu transmembranskih proteina koji su uključeni u širok dijapazon različitih uloga na ćelijskom nivou. Njihova podela je zasnovana na tipu jona koji propuštaju kroz svoju poru, a najraznovrsnija grupa su kalijumovi kanali. Kalijumovi (K) kanali su identifikovani kako kod prokariota, tako i kod eukariota, a humani genom sadrži preko 90 gena koji kodiraju subjedinice kalijumovih kanala (1). Osnovnu organizacionu jedinicu K-kanala čini tetramer, čiji svaki monomer sadrži domen koji učestvuje u formiranju pore koja prolazi kroz membranu ćelije ili ćelijske organele (Slika 1).



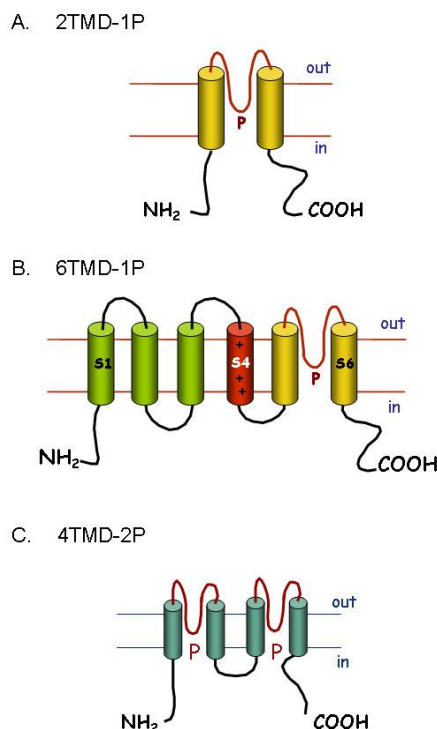
Slika 1. Dendrogram stepena sličnosti između α subjedinica (subjedinice koja formira poru kanala) tri velike klase K-kanala. Preuzeto iz (2)

Jedna od osnovnih karakteristika K-kanala jeste P-petlja koju čine dva transmembranska heliksa i kratka petlja između njih. P-petlja sadrži aminokiselinsku sekvencu treonin-valin-glicin-tirozin-glicin koja predstavlja selektivni filter koji je najodgovorniji za selektivno propuštanje jona K^+ kroz kanal. Zato su K-kanali visoko selektivni i najmanje 10 000 puta propustljiviji za jon K^+ u odnosu na, takođe jednovalentni i sličan po dimenzijama, jon Na^+ . Pored ovih osobina, bitno je napomenuti i da su K-kanali strogo regulisani, a interesantna karakteristika mnogih K-kanala je da oni mogu biti inaktivisani, odnosno da ulaze u stabilna neprovodna stanja ubrzo nakon otvaranja. Jedna vrsta inaktiviranog stanja je usko povezana sa konformacijskom promenom selektivnog filtera.

U skladu sa današnjom klasifikacijom, svi K-kanali se na osnovu strukture i funkcije, a u skladu sa brojem transmembranskih (TM) domena koji ulaze u sastav subjedinice koja učestvuje u formiranju pore, mogu razvrstati u sledeće tri velike klase (Slika 2):

1. K-kanali sa 2 TM domena, ili ulazno ispravljajući K (Kir) kanali
2. K-kanali sa 4 TM domena, ili K-kanali sa 2 pore (K2P)
3. K-kanali sa 6 TM domena, ili voltažno zavisni K (Kv) kanali

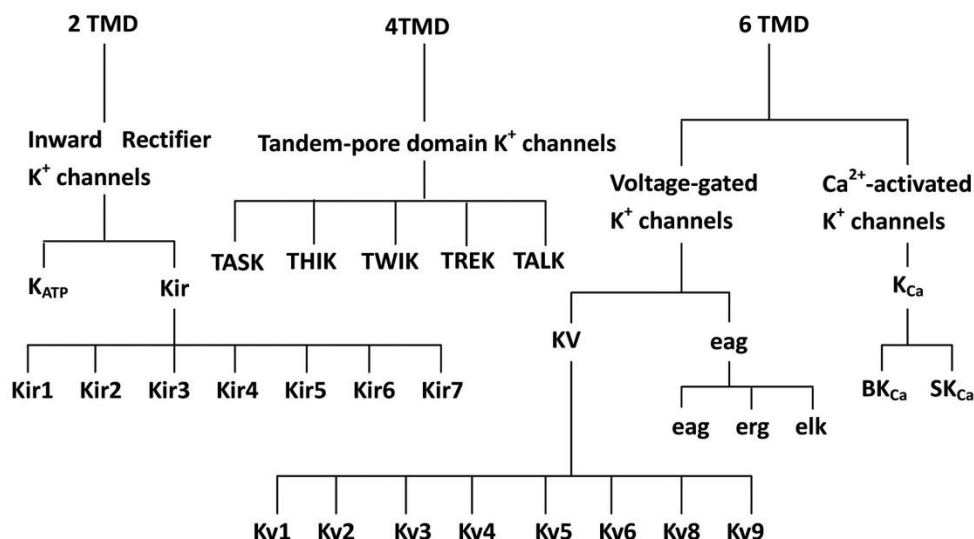
Dodatno, tu su i ligand zavisni K-kanali, koji mogu imati 2 ili 6 TM domena i koji su stimulisani različitim glasnici (mesendžerima).



Slika 2. Struktura K-kanala na osnovu koje je izvršena njihova klasifikacija. Preuzeto od (3)

Svaki K-kanal, nezavisno od klase kojoj pripada, sastoji se iz subjedinice koja učestvuje u formiranju pore (α subjedinica), čija je struktura upravo u visokom stepenu slična kod svih K-kanala, i od regulatorne, pomoćne subjedinice (β) čija struktura varira između klasa.

1. *Kanali sa 2 TM domena*, ili ulazno ispravljajući K (K_{ir}) kanali su voltažno-nezavisni kanali. Najbolje su proučeni u cerebralnoj cirkulaciji gde imaju ulogu u održavanju bazalnog vaskularnog tonusa i vazodilataciji izazvanoj protokom (4). ATP-senzitivni K-kanali (K_{ATP} kanali) pripadaju ovoj grupi i predstavljaju metaboličke senzore koji povezuju električnu ekscitabilnost ćelijske membrane sa promenama u energetsom stanju ćelije. Oni igraju značajnu ulogu u uslovima ishemije, gde ostvaruju protektivno dejstvo na miokard, a uključeni su i u proces vazodilatacije i obezbeđivanja adekvatnog protoka (5).
2. *Kanali sa 4 TM domena* ili K-kanali sa 2 pore (K_{2P}) su, takođe, voltažno-nezavisni kanali odgovorni za održavanje mirovnog membranskog potencijala i pasivno provođenje jona K^+ u miru. Genomske i funkcionalne studije su pokazale da imaju značajne funkcije u neuronima, bubrezima i kardiovaskularnom sistemu (6, 7).
3. *Kanali sa 6 TM domena*, ili voltažno zavisni K (K_v) kanali uključuju dve velike podgrupe: voltažno-zavisne (K_v) i kalcijum-senzitivne (K_{Ca}) kanale. K_v kanali mogu biti homo- ili heterodimeri, aktiviraju se pri depolarizaciji i omogućavaju kretanje K^+ jona kroz ćelijsku membranu. K_v kanali doprinose održavanju mirovnog membranskog potencijala i vaskularnog tonusa (8). K_{Ca} kanali ispoljavaju najvažnije funkcije u regulaciji vaskularnog tonusa (9) (Slika 3).



Slika 3. Klasifikacija K-kanala. Preuzeto od (10)

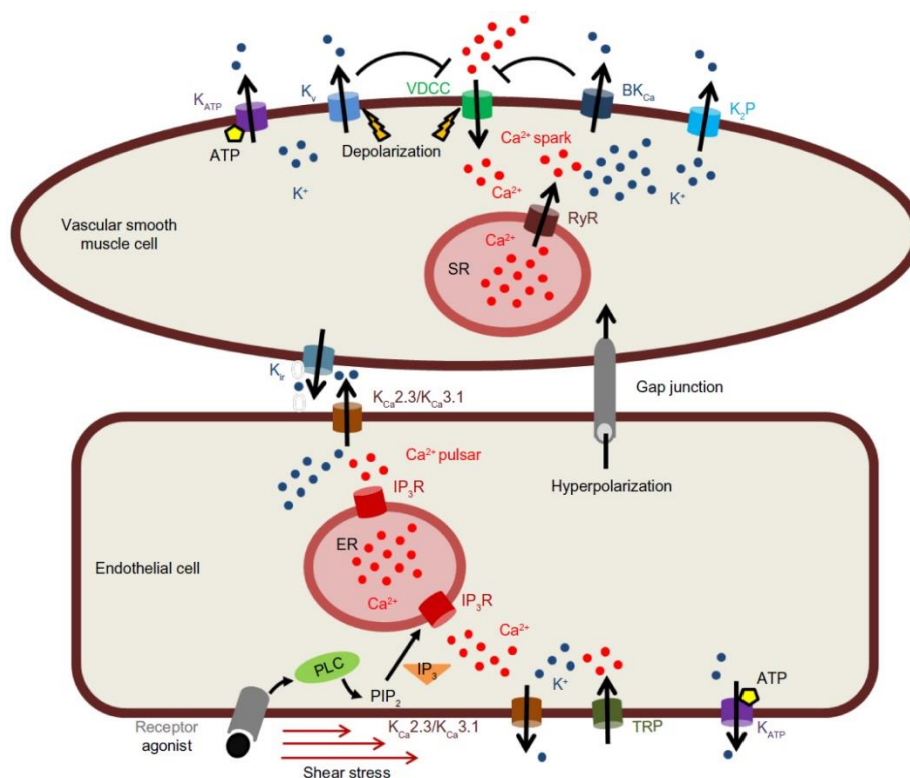
TMD, transmembranski domen; K_{ATP}, ATP-senzitivni K-kanal; Kir, ulazno ispravljajući K-kanal; TASK, K-kanal sa dve pore; Kv, voltažno-zavisni K-kanal; EAG, ether-a-go-go kanal; K_{Ca}, Ca²⁺-senzitivni K-kanal; BK_{Ca}, K_{Ca} kanal velike provodljivosti; SK_{Ca}, K_{Ca} kanal male provodljivosti

K-kanali imaju brojne, važne uloge u organizmu, kako u ekscitabilnim tako i u neekscitabilnim ćelijama. Učestvuju u fazi repolarizacije ćelijske membrane ekscitabilnih ćelija, relaksaciji glatkog mišića, oslobađanju neurotransmitera i modulaciji sinaptičke transmisije, imunom odgovoru i sekreciji hormona (npr. insulina iz beta ćelija pankreasa). Mutacije u genima koji kodiraju K-kanale dovode do razvoja kanalopatija kao što je *Anderson-Tawil* sindrom, Barterov sindrom, neonatalni dijabetes melitus, epilepsija, epizodične ataksije, kongenitalni LQT sindrom i periodična paraliza (11, 12). Takođe, promene u funkciji K-kanala su povezane sa srčanom hipertrofijom, apoptozom i onkogenezom, kao i različitim neurodegenerativnim i neuromuskularnim poremećajima (13).

1.2. Uloga i tipovi K-kanala u glatkom mišiću krvnih sudova

K-kanali predstavljaju raznovrsnu grupu jonskih kanala koji igraju važnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa i membranskog potencijala preko regulacije protoka K⁺ jona. Uloga K-kanala u regulaciji tonusa je indirektna, delujući na homeostazu Ca²⁺. S druge strane, uloga Ca²⁺ ključna je u električnoj aktivnosti glatke mišićne ćelije, od određivanja potencijala mirovanja do aktivnosti pejsmejker ćelija koje daju ritam spontanoj aktivnosti, kao i modulacije frekvencije akcionih potencijala i procesa repolarizacije. Proces relaksacije krvnih sudova, iako predominantno uključuje endotel krvnih sudova, delimično obuhvata i mehanizme koji ne zavise od endotela, poput hiperpolarizacije membrane glatkih mišića, kao posledice aktiviranja različitih K-kanala.

Do sada je identifikovano pet različitih tipova K-kanala u vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama (VGMC): K_{ATP}, BK_{Ca}, Kv, Kir i K2P (14) (Slika 4). Ekspresija K_{ATP}, BK_{Ca} i Kv kanala potvrđena je u glatkom mišiću različitih krvnih sudova, kako na animalnim modelima, tako i na humanim krvnim sudovima. Ekspresija Kir kanala do sada je potvrđena samo na krvnim sudovima malog dijametra, arteriolama i rezistentnim malim arterijama (15, 16). K2P su do danas najmanje istražena grupa K-kanala, i usled nedostatka nama dostupnih farmakoloških jedinjenja koja se koriste u ispitivanju ovih kanala, oni nisu bili predmet razmatranja ovog rada.



Slika 4. Uloga K-kanala u modulaciji membranskog potencijala u vaskularnim ćelijama, glatkoj mišićnoj i endotelnoj ćeliji humanog krvnog suda. Preuzeto od (17)

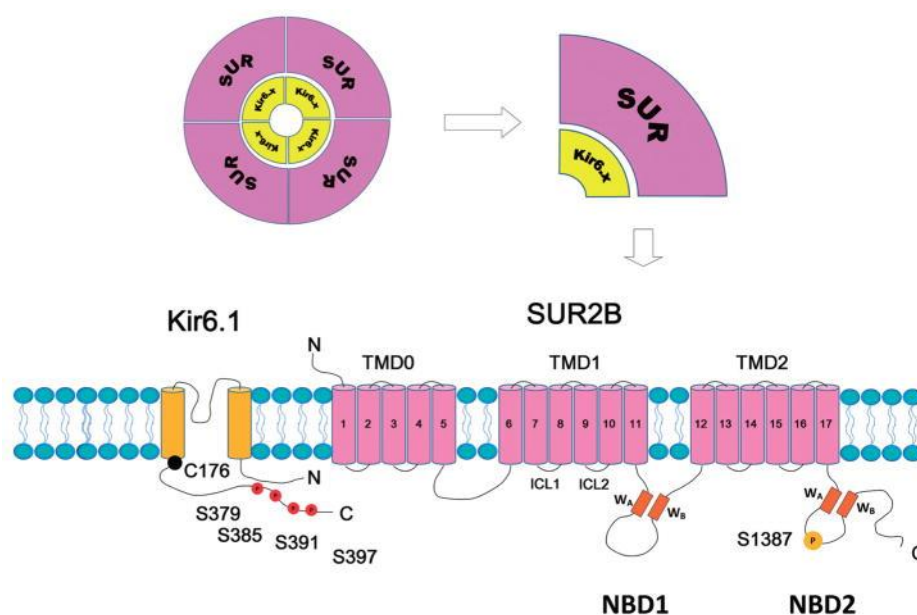
Rezultati istraživanja su pokazali da se aktivnost i ekspresija vaskularnih K-kanala menja tokom većine vaskularnih bolesti kao što su hipertenzija, plućna hipertenzija, hiperholesterolemija, ateroskleroza i dijabetes melitus (14). Izmenjena funkcija K-kanala koja je u korelaciji sa smanjenim vaskularnim odgovorima verovatno je rezultat promene u aktivnosti i/ili ekspresiji K-kanala tokom vaskularnih bolesti.

1.2.1. K_{ATP} kanali

K_{ATP} kanali glatkih mišića imaju važnu ulogu u kontroli vaskularnog tonusa. Ovi kanali su prvi put identifikovani od strane Noma (18), u srčanim miocitima, a nakon toga njihova ekspresija je potvrđena na membrani beta ćelija endokrinog pankreasa, glatkim mišićnim ćelijama, ćelijama skeletnih mišića, neuronima i kardiomiocitima. Ovi kanali se nalaze kako u plazma membrani ćelija, tako i u intracelularnim membranama mitohondrija, sarkoplazmatskog retikuluma (19), zimogenih granula i na membrani nukleusa (20). K_{ATP} kanali su uglavnom zatvoreni pod normalnim fiziološkim uslovima i otvoreni kao odgovor na promene u izmenjenim ćelijskim metaboličkim stanjima, kao što su ishemija i hipoksija. Stoga su K_{ATP} kanali označeni kao "metabolički senzor" koji metabolički status pretvaraju u električnu aktivnost (21). K_{ATP} kanali su heterooktamerni kompleksi koji se sastoje od četiri subjedinice koje formiraju poru i koje pripadaju klasi unutrašnjih ispravljajućih K-kanala (Kir6.1 ili Kir6.2) i četiri sulfonil urea receptorske (SUR) subjedinice (22). Subjedinice Kir6.x su kodirane od strane 2 različita gena, KCNJ8 i KCNJ11, koji dele 71% identičnosti u sastavu aminokiselina (23). Kir6.x subjedinice se sastoje od dva transmembranska heliksa povezana P-petljom koja definiše selektivni filter kanala. Citoplazmatski ATP inhibira Kir6.x subjedinice (24). Dok je Kir6.2 predominantna subjedinica koja formira poru K_{ATP} kanala u srčanim i ćelijama pankreasa, Kir6.1 je predominantna subjedinica u glatkom mišićnom tkivu. Poru K_{ATP} kanala

formiraju ili četiri Kir6.1 ili četiri Kir6.2 subjedinice, mada postoje dokazi i da ove dve subjedinice mogu zajedno formirati poru kanala (25). SUR subjedinice (SUR1 i SUR2) kodirane su od strane dva različita gena, ABCC8 i ABCC9, dok SUR2A i SUR2B subjedinice predstavljaju varijante istog, drugopomenutog, gena čije razlike su posledica alternativne posttranskripcione obrade (26, 27). SUR2A i SUR2B subjedinice se međusobno razlikuju u sekvenci od 42 amino-kiseline koje doprinose farmakološkim razlikama utičući na to da SUR2B ima veći afinitet za OKK u poređenju sa SUR2A (28). Delujući preko SUR_x subjedinice, sulfonilurea inhibira K_{ATP} kanal, dok je isti aktiviran diazoksidom (SUR1) i pinacidilom (SUR2) (29). Takođe, SUR subjedinice sadrže i nukleotid vezujuće domene (*nucleotid binding domain* – NBD; NBD1 i NBD2) sa kojima interaguje MgADP, a u zavisnosti od energetskeg statusa ćelije, ovo vezivanje može savladati inhibiciju uzrokovanu vezivanjem ATP za Kir6.x i stimulirati otvaranje kanala (30). Vezivanje MgADP za NBD2 dovodi do otvaranja K_{ATP} kanala, odnosno MgATP mora biti hidrolizovan do MgADP da bi došlo do aktivacije kanala (31). SUR subjedinice pokazuju izrazitu tkivno-zavisnu distribuciju.

K_{ATP} kanal na glatkom mišiću krvnih sudova sadrži četiri Kir6.1 subjedinice i četiri SUR-2B subjedinice i samo u okviru ovog kompleksa mogu se eksprimirati na plazma membrani ćelije glatkog mišića (32) (Slika 5). Subjedinice SUR su molekularne mete za sulfonilurea klasu antidiabetičkih lekova, kao što je glibenklamid, selektivni blokator K_{ATP} kanala, kao i za otvarače kalijumovih kanala (OKK) (33). Takođe, vrsta subjedinica prisutnih SUR subjedinica određuje specifičnost i selektivnost agonista i antagonist K_{ATP} kanala (34).



Slika 5. Molekularna struktura vaskularnog K_{ATP} kanala. Preuzeto od (35)

U VGM su identifikovana dva glavna podtipa K_{ATP} kanala, na osnovu razlika u provodljivosti, osetljivosti na nukleotide i farmakoloških karakteristika (36). Jedan od njih je K_{ATP} kanal srednje provodljivosti (50–70 pS), koji funkcionalno podseća na K_{ATP} kanale u kardiomiocitima (37), mada njegova molekularna struktura nije do kraja ispitana. Međutim, preovlađujući podtip vaskularnog K_{ATP} kanala je K_{NDP} kanal niske provodljivosti (20–50 pS) (30). Ovaj K_{NDP} kanal se ne može spontano aktivirati u odsustvu nukleotida i takođe je inhibiran intraćelijskim ATP, ali potrebne koncentracije za njegovu inhibiciju su veće nego one koje inhibiraju K_{ATP} kanal u kardiomiocitima i β-ćelijama pankreasa (38, 39).

1.2.2. BK_{Ca} kanali

Ca²⁺-senzitivni K (K_{Ca}) kanali imaju važnu ulogu u ćelijskoj ekscitabilnosti, registrujući i reagujući na promene koncentracije intracelularnog [Ca²⁺]. K_{Ca} kanali se dalje na osnovu provodljivosti dele na kanale sa velikom (BK_{Ca}, maxi K, ~200-300 pS), intermedijernom (IK_{Ca}, ~32-39 pS) i malom provodljivošću (SK_{Ca}, ~4-14 pS). BK_{Ca} kanale aktivira depolarizacija membrane i/ili vezivanje Ca²⁺ za kanal, dok su SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali voltažno-nezavisni i aktiviraju se vezivanjem Ca²⁺ za kalmodulin koji se konstitutivno vezuje sa kanalima (40). Sve tri grupe K_{Ca} kanala nalaze se u vaskulaturi, s tim što su BK_{Ca} kanali predominantno eksprimirani na VGMĆ u znatno većoj proporciji u odnosu na ostale K-kanale (41), dok su SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali prisutni na endotelnim ćelijama krvnih sudova. Kada se BK_{Ca} kanal u VGMĆ aktivira omogućen je izlazak K⁺, što dovodi do hiperpolarizacije membrane. Sa druge strane, aktivacija SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala indirektno utiče na hiperpolarizaciju u VGMĆ endotel-zavisnim mehanizmima koji uključuju stvaranje azotnog oksida (NO). BK_{Ca} (koji su još poznati i kao K_{Ca}1.1 ili maxi K) kanali se sastoje od četiri α kanalske i četiri β pomoćne subjedinice (Slika 6). Smatra se da su voltažna zavisnost, otvorenost kanala i provodljivost funkcija α subjedinice, dok se senzitivnost na Ca²⁺ pripisuje β subjedinici (42, 43), koje predstavljaju Ca²⁺ senzor koji se aktivira sa povećanjem koncentracije Ca²⁺ unutar ćelije. Subjedinica α BK_{Ca} kanala homologa je sa proteinima koji sadrže S1-S6 transmembranskih segmenata i poput Kv kanala sadrži domen S4 koji predstavlja voltažni senzor (17). Stoga se smatra da je BK_{Ca} voltažno-zavisni kanal kome je dodat deo sa četiri nove subjedinice S7-S10.

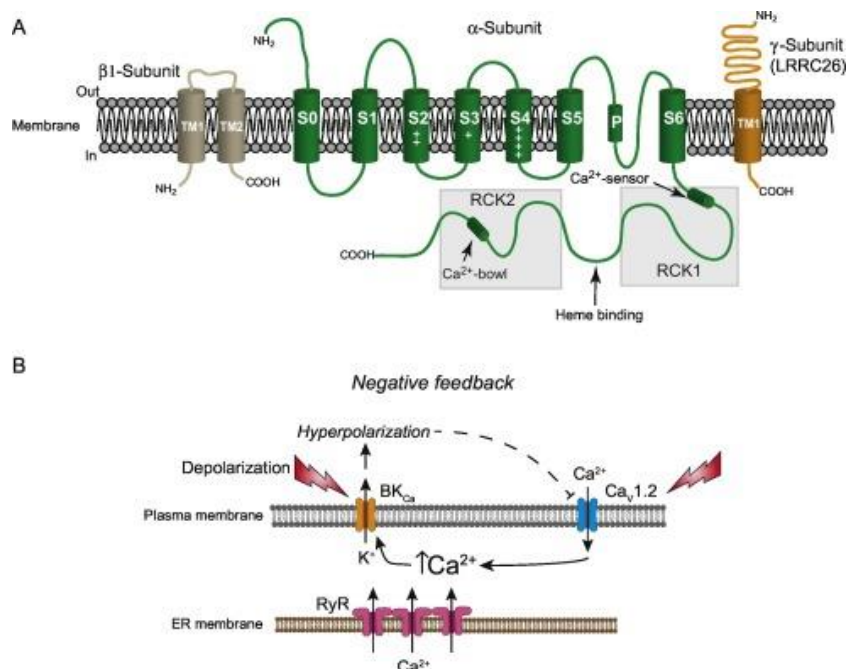
Humani genom sadrži 8 gena koji kodiraju K_{Ca} kanale (17). I dok je subjedinica α BK_{Ca} kanala kodirana od strane samo jednog (*Slo*) gena, njena fenotipska raznovrsnost postiže se visokim nivoom alternativnog splajsovanja (*engl. splicing*) na posttranskripcionom nivou. S druge strane, β subjedinice su kodirane od strane četiri gena čija je ekspresija tkivno specifična, a β1 subjedinica dominantna forma u VGMĆ (44, 45). β1 subjedinica u interakciji sa α subjedinicom povećava senzitivnost kanala na napon i Ca²⁺ (46). Teoretski, α i β subjedinice BK_{Ca} kanala se nalaze u stehiometrijskom odnosu 1:1. Međutim, studije su pokazale da postoje grupacije BK_{Ca} kanala sa manje od 4 β subjedinice. Brojni dokazi upućuju na to da stehiometrija α i β subjedinica može biti dinamična.

BK_{Ca} kanali, pod eksperimentalnim uslovima, mogu biti aktivirani promenom napona u prisustvu ili odsustvu Ca²⁺. Vrednost membranskog potencijala koja je potrebna za aktivaciju BK_{Ca} kanala nema fiksne vrednosti, već zavisi od koncentracije Ca²⁺. U uslovima kada je koncentracija Ca²⁺ niska, BK_{Ca} kanali se ponašaju kao čisti voltažno-zavisni kanali. Ipak, povećanje intracelularnog Ca²⁺ dolazi do pomeranja parametara voltažne zavisnosti ka više negativnim potencijalima što dozvoljava aktivnost kanala u fiziološkom opsegu membranskih potencijala (-60 do -30 mV) u relaksiranim ćelijama (47, 48).

U VGMĆ, BK_{Ca} kanali regulišu membranski potencijal produkcijom spontanih prolazno-izlaznih struja (tzv. STOC struje) kao odgovor na visoko lokalizovano oslobađanje Ca²⁺, tzv Ca²⁺ iskre (*engl. Ca²⁺ sparks*), kroz rijanodinske receptore (RyR) na sarkoplazmatskom retikulumu (SR) (49). Stoga, lokalizacija BK_{Ca} kanala u ćelijskoj membrani i RyR na SR, mora biti u neposrednoj blizini kako bi BK_{Ca} kanali bili izloženi relativno visokim nivoima Ca²⁺ jona (> 10 μM Ca²⁺) (50). Pokazano je da blokada RyR, bilo rijanodinom ili deplecijom intracelularnog Ca²⁺ tapsigarginom, dovodi do redukcije Ca²⁺ iskri, a samim tim i BK_{Ca} struje (51, 52). Takođe, influks Ca²⁺ kroz voltažno-zavisne Ca-kanale L-tipa (Cav1.2) stimuliše aktivnost BK_{Ca} (49, 50). Otvaranje BK_{Ca} kanala omogućuje izlazak K⁺ vodeći do hiperpolarizacije membrane koja dovodi do zatvaranja voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa čime se redukuje koncentracija Ca²⁺ i indukuje vazorelaksacija. Nasuprot tome, zatvaranje BK_{Ca} kanala dovodi do depolarizacije membrane koja otvara voltažno-zavisne Ca-kanale L-tipa, što rezultira porastom Ca²⁺ i posledično vazokonstrikcijom. Uopšteno, BK_{Ca} kanali u

VGMĆ učestvuju u podešavanju membranskog potencijala (V_m), regulaciji vaskularnog tonusa i kompenzatornom mehanizmu amortizovanja vazokonstrikcije (53).

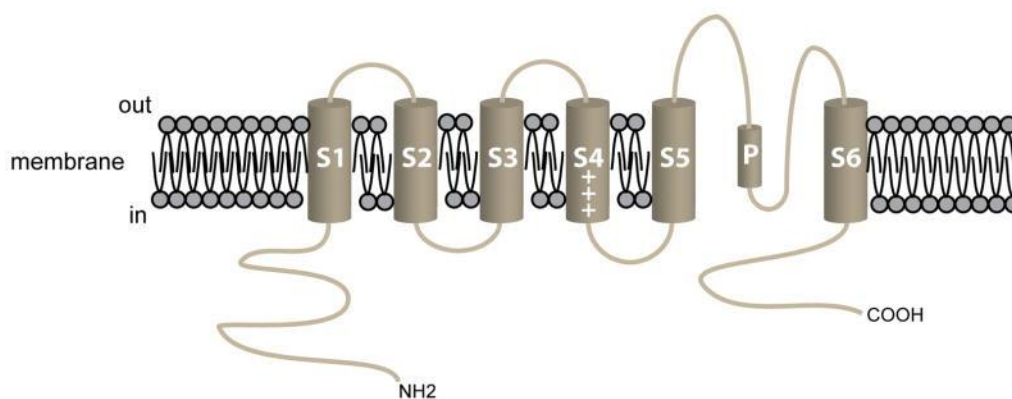
BK_{Ca} kanal se može aktivirati različitim sintetskim OKK poput NS1619, ili njegovog potentnijeg analoga NS11021. Ovi OKK vezujući se za BK_{Ca} kanal uzrokuju hiperpolarizaciju, vazodilataciju ili redukciju vazokonstrikcije (54). Benzoimidazol NS1619 aktivira BK_{Ca} kanale, ali njegovi funkcionalni efekti, takođe, uključuju i inhibiciju Ca^{2+} struja i K_v kanala (55).



Slika 6. Molekularna struktura vaskularnog BK_{Ca} kanala i njegova uloga u regulaciji vaskularnog tonusa. Preuzeto od (56)

1.2.3. K_v kanali

K_v kanali su najveća superfamilija K-kanala, podeljena na 12 subfamilija kodiranih od strane oko 40 gena (57). K_v kanali su heteromultimeri sastavljeni od četiri α subjedinice koje formiraju poru, i od pomoćnih β subjedinica. Prema podeli K_v kanali pripadaju kanalima sa šest transmembranskih domena, jer strukturno, α subjedinica ovih kanala koja ima citoplazmatski N- i C-kraj, sadrži šest transmembranskih domena (S1-S6), sa porom između S5 i S6 domena i voltažnim senzorom u sastavu S4 domena (58). S4 domen sadrži specifičnu aminokiselinsku sekvencu u kojoj se lizin ili arginin pojavljuju na svakoj trećoj ili četvrtoj poziciji što daje pozitivno naelektrisanje ovom segmentu i odgovorno je za voltažno-zavisnu aktivaciju kanala. N-kraj α subjedinica odgovoran je za inaktivaciju ovih kanala (59) (Slika 7). Funkcionalan K_v kanal sadrži četiri α subjedinice koje mogu biti iste ili različite, ali koje uvek pripadaju istoj familiji. Pošto mogu biti homo- ili heterotetrameri, biofizičke osobine, fiziološka regulacija i farmakološke osobine K_v kanala veoma variraju. Vaskularni K_v kanali su uglavnom K_v1 , K_v2 i K_v3 izoforme kanala. U VGMĆ, glavne izoforme K_v kanala su $K_v1.2$, $K_v1.5$, $K_v1.6$, $K_v2.1$ i $K_v3.1$, ali obrazac ekspresije je zavistan od vaskularnog odeljka. U slučaju $K_v1.3$ kanala u VGMĆ brojnih arterija i arteriola moguće je detektovati njegovu iRNK, ali ne i sam protein (60). Istraživanja su pokazala da je ekspresija proteina $K_v1.3$ kanala karakteristična za proliferišuće VGMĆ, i da se ova proliferacija može blokirati upotrebom specifičnog blokatora $K_v1.3$ kanala, margatoksinom (61).



Slika 7. Molekularna struktura α subjedinice Kv kanala. Modulatorna, β subjedinica (nije prikazana na slici) interaguje sa NH_2 krajem α subjedinice. Preuzeto od (62)

Pripadnici K_v7 (KCNQ) i K_v11 (HERG) familija, takođe, su identifikovani u VGMC (63, 64). Kv kanali, kako im samo ime i govori, ispoljavaju snažnu voltažnu zavisnost. Depolarizacija ćelijske membrane dovodi do njihove aktivacije i do povećanja hiperpolarizujućih izlaznih struja. Nastala hiperpolarizacija VGMC inaktivira voltažno-zavisne Ca-kanale i posledično smanjuje vaskularni tonus. Prag za aktivaciju Kv kanala iznosi oko -30 mV (7, 8).

1.3. Modulatori aktivnosti K-kanala

Modulatori aktivnosti K-kanala, kako im samo ime i kaže, predstavljaju grupu jedinjenja koja utiču na funkciju K-kanala, menjajući je, blokirajući ili podstičući aktivnost ove grupe kanala. Razumevajući ulogu ovih kanala u različitim fiziološkim, ali i patofiziološkim procesima, otvorilo je jedan novi pristup u medicini i farmaciji prepoznajući terapijski potencijal zasnovan na modulaciji aktivnosti ovih kanala. Poslednjih godina, detekcija promene ekspresije K-kanala, takođe, predstavlja značajno dijagnostičko sredstvo u različitim patološkim stanjima, pre svega u onkologiji (65). Do danas je razvijen širok spektar lekova i supstanci koji utiču na propustljivost ćelijske membrane za K^+ jone. Modulatori aktivnosti K-kanala imaju značajne terapijske mogućnosti na polju kardioprotekcije (66), korekcije funkcija vaskularnih (67) i ne vaskularnih mišića (68), neuralnog (69), imunog (70) i endokrinog sistema (71). Modulatori K-kanala se mogu podeliti na otvarače K-kanala (OKK) i blokatore K-kanala (BKK).

1.3.1. Otvarači kalijumovih kanala (OKK)

OKK su egzogeni modulatori koji obuhvataju heterogenu grupu jedinjenja. Modulacija aktivnosti K-kanala je poslednjih godina omogućila novi pristup u kardiovaskularnoj farmakologiji u cilju terapijske primene u akutnom koronarnom sindromu, hipertenziji, insuficijenciji srca, spazmu bajpas graftova, kao i kardioprotektivnom delovanju. Prema svojoj hemijskoj strukturi OKK se mogu podeliti u nekoliko grupa:

- *Cijanogvanidini*, kojima pripada pinacidil i njegov analog P1075
- *Benzopirani*, čiji su najpoznatiji predstavnici kromakalim, levkromakalim, HOE 234

- *Tioformamidi*, predstavnik ove grupe je aprikalim
- *Piridini*, u koje se ubraja nikorandil
- *Pirimidini*, jedini predstavnik u ovoj grupi je minoksidil sulfat
- *Benzotiadiazini*, čiji je najznačajniji predstavnik diazoksid

OKK, raznolika grupa organskih jedinjenja, repolarizuju ili hiperpolarizuju ćelijsku membranu, delujući preko K_{ATP} kanala. Stoga, vrlo bitan efekat OKK je posledica delovanja na K_{ATP} kanale na plazma membranama srčanih i glatkih mišićnih ćelija. OKK smanjuju mogućnost otvaranja voltažno-zavisnih Ca-kanala, L i T tipa, i inhibiraju agonistima indukovano oslobađanje Ca^{2+} iz intracelularnih depoa kroz inhibiciju formiranja inozitol-trifosfata (IP_3) i smanjenje efikasnosti Ca^{2+} kao aktivatora kontraktilnih proteina. Dodatno, OKK mogu ubrzati klirens slobodnog intracelularnog $[Ca^{2+}]$ kroz Na^+/Ca^{2+} razmenu (72), dovodeći glatke mišićne ćelije u stanje relaksacije i redukcije ekscitabilnosti ćelijske membrane. Uzimajući u obzir da je GMC vaskulotornog sistema posebno osetljiva na OKK oni mogu imati veliki terapijski značaj.

Diazoksid i minoksidil su OKK koji otvaraju K_{ATP} kanale u vaskulaturi i dovode do vazodilatacije i smanjenja povišenog krvnog pritiska (73). Ipak, klinička upotreba oba leka je ograničena njihovim neželjenim efektima, kao što su retencija tečnosti, edemi i hiperglikemija. Nikorandil je vazodilatatorni lek koji se koristi u terapiji angine, povećavajući koronarni protok krvi usled njihove vazodilatacije.

Pinacidil, koji pripada grupi cijanogvanidina, je stari antihipertenzivni lek (74) koji se dugi niz godina zbog izraženih neželjenih dejstava (perifernih edema i aritmije) više ne primenjuje u kardiovaskularnoj terapiji. Danas je upotreba pinacidila ograničena na eksperimentalne uslove. Pinacidil je prvi put sintetisan 1970. godine, da bi tek godinama kasnije bio klasifikovan kao OKK (75), iako su kasnija brojna istraživanja ukazala i na njegove dodatne mehanizme dejstva nezavisne od otvaranja kalijumovih kanala. Mehanizam delovanja pinacidila još uvek nije u potpunosti utvrđen, ali brojni radovi potvrđuju da je vazorelaksacija posledica otvaranja K-kanala vaskularnih glatkih mišića (75). Za razliku od nekih drugih OKK, kao npr. levkromakalima i nikorandila, mehanizam delovanja pinacidila nije tako dobro definisan, a predloženi su i dodatni mehanizmi pored hiperpolarizacije vaskularnog glatkog mišića (76). Vazodilataciju izazvanu pinacidilom uspešno blokira glibenklamid, oralni antidijabetik koji se koristi u terapiji DMT2. Dokazano je da OKK hiperpolarišu VGMC delujući dominantno preko K_{ATP} kanala. Drugi blokatori K-kanala, kao što su iberiotoksin, apamin ili niske koncentracije TEA ne deluju na K_{ATP} kanale (77). Sintetski analog pinacidila koji pokazuje veću aktivnost od njega je P1075.

1.3.2. Blokatori kalijumovih kanala (BKK)

Blokatori kalijumovih kanala (BKK) obuhvataju širok spektar supstanci, od najjednostavnijih neorganskih katjona do prirodnih toksina izolovanih iz različitih biljnih i životinjskih vrsta.

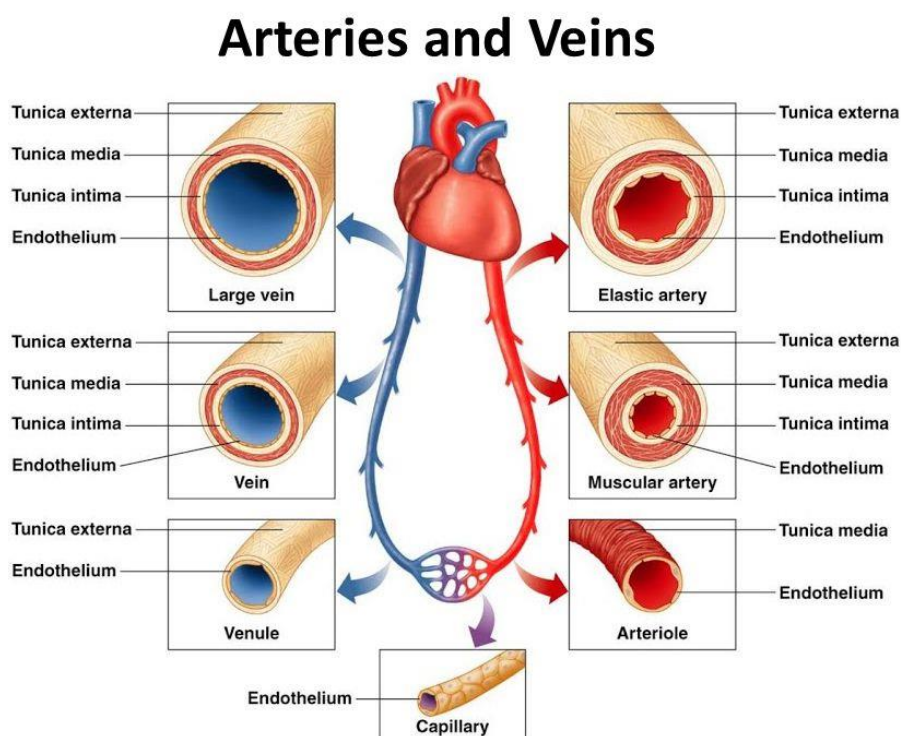
Prvi i najviše korišćeni BKK u eksperimentalne svrhe su kvarterne amonijum soli i tetraetilamonijum (TEA) kao njihov najpoznatiji predstavnik. U milimolarnim koncentracijama TEA selektivno blokira BK_{Ca} kanale, dok pri većim koncentracijama neselektivno blokira i druge tipove K-kanala. U BKK se ubrajaju i aminopiridini čiji je najznačajniji predstavnik 4-aminopiridin (4-AP), koji je pri niskim milimolarnim koncentracijama relativno selektivan za kasno i prolazno ispravljачke K-kanale, a čije je ciljno mesto vezivanja kod K_v kanala u pori između segmenata S5-S6 subjedinice kanala. U većim koncentracijama (1 – 10 mM) ovaj blokator je relativno neselektivan, blokirajući i K_{ATP} kanale i BK_{Ca} kanale (78).

Posebno su interesantni BKK koji predstavljaju prirodne toksine, a u koje se ubrajaju iberiotoksin i karibdotoksin – visoko selektivni blokatori BK_{Ca} kanala izolovani iz otrova škorpije. Zatim ovoj grupi pripada i margatoksin, toksin takođe izolovan iz otrova jedne druge vrste škorpije, a koji ima veliku selektivnost za $Kv1.3$ kanal. Friksotoksin je, pak, toksin izolovan iz otrova tarantule, koji je visoko selektivan za $Kv4.2$ i $Kv4.3$ kanale, a apamin je toksin izolovan iz pčelinjeg otrova, visoko selektivan za SK_{Ca} kanale.

Potencijal i značaj blokiranja K-kanala je, takođe, prepoznat u farmaceutskoj industriji i danas postoje brojne klase lekova čiji mehanizam se zasniva na tom principu. Tako antiaritmici III grupe blokiraju K-kanale koji učestvuju u repolarizaciji i na taj način produžavaju trajanje akcionog potencijala, suprimiraju pojavu aritmija i smanjuju normalni automatizam srčanih ćelija (79). Glibenklamid, visoko selektivni blokator K_{ATP} , pripada grupi oralnih antidijabetika i svoju primenu ima u terapiji dijabetes melitusa tip 2. Glibenklamid je derivat sulfonilureje i ciljno mesto njegovog dejstva su β -ćelije Langerhansovih ostrvaca gde stimuliše sekreciju insulina (80). Koncentracije glibenklamida potrebne da se blokira K_{ATP} kanal u pankreasu (u nM) značajno su niže od koncentracija neophodnih za njihovu blokadu ili u krvnim sudovima (1-20 μ M) (81) ili u uterusu (10 mM) (82).

1.4. Bajpas graftovi – sličnosti i razlike između arterijskih i venskih krvnih sudova

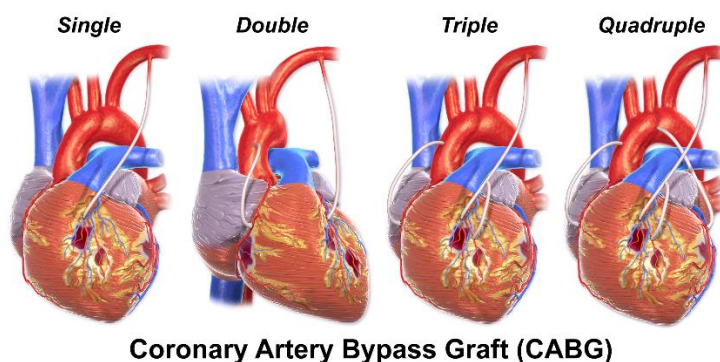
Krvni sudovi različitih organa mogu različito odgovoriti na prisustvo istih supstanci i lekova. Pored toga različiti efekti se mogu očekivati i zavisno od toga da li je u pitanju venski ili arterijski sistem. Anatomske i fiziološke razlike između ova dva tipa krvnih sudova najpre se uočava u tanjem zidu vena, koje imaju i manje elastina i glatkih mišića, ali više kolagena i prisustvo valvula (Slika 8). Takođe, uočava se i razlika u položaju sarkoplazmatskog retikuluma u ćelijama vaskularnog mišića arterija i vena, koji je pozicioniran bliže plazma membrani u vaskularnim ćelijama vena (83). Opisano je i da su vene, za razliku od arterija, manje osetljive na delovanje vazodilatatornih metabolita iz cirkulacije, i da pri tome imaju intenzivniju simpatičku inervaciju (84, 85).



Slika 8. Shematski prikaz anatomskih razlika između arterija i vena. Preuzeto sa <https://cheap-library.com/>

Bajpas graftovi su upravo segmenti vena i arterija koji se koriste u premošćavanju neprohodnih delova koronarnih arterija. Za razliku od početnih pristupa u tretmanu bajpas graftova, kada su posmatrani samo kao prosti provodnici, danas se svakako više pažnje posvećuje njihovom tretmanu u cilju produžavanja njihove prohodnosti i funkcionalnosti tokom godina.

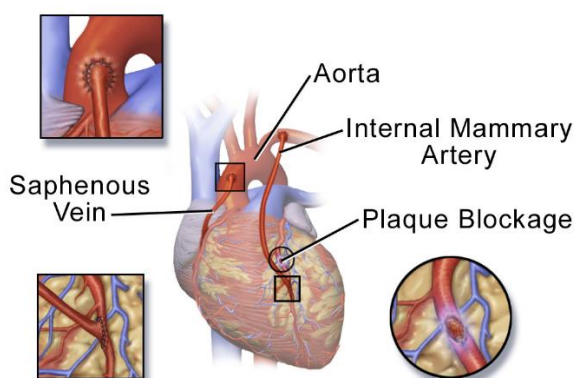
Aorto-koronarni bajpas (CABG - *coronary artery bypass grafting*), je hirurška procedura razvijena sredinom prošlog veka, koje je dramatično promenila tretman pacijenata sa ishemijskom bolešću srca (Slika 9). Bajpas operacija je jedna od najčešćih operativnih procedura kako kod nas, tako i u svetu. Procena je da se godišnje u Sjedinjenim Američkim Državama obavi skoro 400 000 bajpas operacija (86), dok za Srbiju ne postoje zvanični podaci. Svakako treba uzeti u obzir da se u zapadnim zemljama uočava trend smanjenja CABG operacije, dok su iste u porastu u zemljama u razvoju. Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u svetu, a po mortalitetu od kardiovaskularnih bolesti Srbija se danas nalazi u samom vrhu (87). Faktori rizika za koje se pouzdano zna da utiču na razvoj koronarne bolesti srca su između ostalog: hipertenzija, hiperlipidemija, pušenje, dijabetes i način ishrane.



Slika 9. Tipovi aorto-koronarnog bajpasa na osnovu broja upotrebljenih graftova. Preuzeto sa https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_Blausen_Medical_2014

Istorijski gledano prvi upotrebljeni graft, i to uspešno, u direktnoj revaskularizaciji miokarda bio je graft unutrašnje torakalne (mamarne) arterije (*eng.* HIMA – *human internal mammary artery*; *lat.* *arteria thorasica interna*; dok smo mi u radu koristili skraćenicu ITA – internal thorasic artery). Ipak, zbog teže preparacije, zahtevnijeg pristupa u konstrukciji anastomoza, kao i veće mogućnosti za nastanak peri- i post-operativnih komplikacija, primarni graft u CABG postaje graft vene safene (*eng.* HSV - *human saphenous vein*; *lat.* *vena saphena magna*; dok smo mi u radu koristili skraćenicu HVS – humana vena safena) (Slika 10). Venski graft zbog svoje dužine i jednostavne preparacije postaje, tokom sledećih godina, najupotrebljiviji graft u bajpas operacijama. Međutim, tokom godina veliki nedostatak HVS grafta dolazi do izražaja, a to je smanjenje prohodnosti; 10% do čak 25% HVS graftova okludira u prvih godinu dana od operacije, dok je, u najvećem broju studija, nakon 10 godina samo 50-60% HVS graftova prohodno (88). Faktori koji su odgovorni za stenotične i okluzivne promene na HVS graftu nastaju pre svega kao posledica izlaganja vene visokom pritisku i pulzativnom protoku u arterijskom sistemu. Pored toga, poslednjih godina veća pažnja u propadanju HVS grafta poklonjena je stanju endotela pre same implementacije grafta. Naime, veliki broj studija ukazao je da status endotela u ugrađenom graftu predstavlja ključni korak u dugovečnosti samog

grafta. Histološkom i imunohistohemijskom analizom preko 600 aortokoronarnih venskih graftova uzetih sa autopsije pacijenata koji su prethodno bili operisani na Klinici za grudnu i kardijalnu hirurgiju u Beogradu od sedamdesetih godina do 2000. godine pokazano je da su najranije histološke promene u venskim graftovima oštećenja endotelnih ćelija (89). Takođe, u preko 100 analiziranih isečaka HVS pre njihovog ugrađivanja kao grafta nađena su manja ili veća oštećenja endotela. Kako je period preživljavanja nakon operacije rastao tako su češće na analiziranim graftovima nakon autopsije uočena zadebljanja intime venskog grafta. Zaključak autora je bio da oštećenje endotela HVS nastalo tokom života ili pre implementacije, tokom pripreme grafta za ugradnju, dovodi do ranih postoperativnih komplikacija i to najčešće tromboze lumena vene. Nasuprot tome, duži rok trajanja imaju neoštećeni graftovi ili oni sa hiperplazijom intime kod kojih u kasnijem periodu dolazi do komplikacija u vidu tromboze grafta ili stenozе lumena zbog hiperplazije grafta.



Coronary Artery Bypass Surgery

Slika 10. Ilustracija dvostrukog aorto-koronarnog bajpasa sa upotrebom vene safene i unutrašnje torakalne arterije. Preuzeto sa

https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_Blaesen_Medical_2014

Danas, arterijski bajpas graftovi imaju dominantnu poziciju u CABG. Zlatni standard predstavlja *in situ* graft leve grane ITA. Više od 90% graftova ITA su posle 10 godina prohodni, dok manje od 4% razvije aterosklerozu, a samo 1% ima aterosklerotične stenozе od hemodinamskog značaja (88). Pored ITA (koja se u anglosaksonskoj literaturi mnogo češće nalazi pod nazivom unutrašnja mamarna arterija), sledeći arterijski graft po učestalosti korišćenja je radijalna arterija. Osim ove dve arterije, u CABG se koriste još i donja epigastrična arterija, desna gastroepiploična arterija, kao i međurebarne arterije. Praksa u Srbiji po pitanju bajpas operacija predstavlja upotrebu grafta velike vene safene, grafta unutrašnje torakalne arterije i daleko ređe grafta radijalne arterije (87).

Spazmi arterijskih i venskih graftova mogu se javiti u svim fazama pripreme grafta za implantiranje, ali i nakon što je graft implantiran. Dok je perioperativan spazam HVS povremena, ali ozbiljna komplikacija, postoperativni spazam ovog grafta je daleko ređi. U slučaju humane unutrašnje torakalne arterije podjednaka je verovatnoća razvoja i peri- i postoperativnog spazma (87). Prijavljeno je da inhibicija BK_{Ca} kanala endogenim vazokonstriktorima tokom bajpas operacije može da izazove spazam (90). Arterijski graftovi, prema klasifikaciji koju su napravili He i Yang (91), mogu se razvrstati u tri grupe. U prvoj grupi se nalaze somatske arterije (ITA i donja epigastrična arterija), u drugoj visceralne arterije i u trećoj limbične arterije. Arterije druge i treće grupe pokazuju veću sklonost ka razvoju spazma u odnosu na prvu grupu. Međutim, i sami segmenti ITA se razlikuju u odnosu na reaktivnost prema vazokonstriktorima, pa tako su ispitivanja pokazala da je distalni deo

ITA najreaktivniji. Danas se ne preporučuje korišćenje najdistalnih 3-4 cm ITA pre bifurkacije usled visoke reaktivnosti datog segmenta. Poslednjih godina sa većom upotrebom arterijskih graftova problem razvoja spazma grafta postaje sve učestaliji. Zbog toga je važno da se razumeju uzroci razvoja vaskularnog spazma, da se poboljša provodljivost grafta i koristi najoptimalniji vazodilatator u cilju sprečavanja razvoja spazma. Ipak, mehanizam nastanka spazma bajpas graftova još uvek nije razjašnjen. Smatra se da vazospazam nastaje pod uticajem brojnih, različitih stimulusa koji mogu biti fizičke ili farmakološke prirode. Perioperativan spazam se može javiti kao odgovor glatkih mišićnih ćelija na mehaničku stimulaciju tj. manipulaciju graftom pre i tokom same operacije, ali i kao odgovor na promenu temperature. Različite endogene i egzogene vazokonstriktorne supstance su uključene u razvoj peri- i postoperativnih spazama, pre svega kod arterijskih graftova (92). U cilju prevencije i reverzije spazma arterijskih i venskih graftova ispitivano je vazodilatatorno i antivazokonstriktorno dejstvo različitih supstanci, ali do sada nije pronađen idealan vazodilatator. I dok se neki vazodilatatori uprkos određenim nedostacima rutinski koriste u CABG u tretmanu spazma (papaverin, nitroglicerina, Na-nitroprusid), veće nade se polažu u nove kombinacije vazodilatatora koji se trenutno nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja (Heovi rastvori - verapamil + nitroglicerina i nikardipin + nitroglicerina) (93).

Kalijumovi kanali u krvnim sudovima, a samim tim i u bajpas graftovima, jesu prepoznati kao ciljno mesto tretmana spazma grafta. Naša laboratorija za kardiovaskularnu farmakologiju intenzivno se bavi proučavanjem uloge K-kanala u krvnim sudovima, kao i ispitivanjem OKK i njihove uloge u reverziji i/ili sprečavanju razvoja spazma na različitim animalnim i humanim modelima. Prethodnih godina pokazano je *in vitro* da različiti OKK poput levkromakalima, aprikalima, kromakalima, pinacidila, diazoksida, nikorandila dovode do relaksacije krvnih sudova, ali vrlo često njihov efekat zavisi od tipa krvnog suda, ali i vrste primenjenog vazokonstriktora. Dodatno, pokazano je i da neke novootkrivene prirodne supstance, poput rezveratrola, svoj vazodilatatorni efekat ostvaruju delom putem aktivacije K-kanala. Ukazujući na važnu ulogu K-kanala u hiperpolarizaciji s jedne strane, ali i na moguću promenu u ekspresiji i/ili funkciji K-kanala u različitim patofiziološkim stanjima, ispitivanje OKK u reverziji i/ili sprečavanju razvoja spazma grafta mora biti ispitano u prisustvu odnosno odsustvu različitih vaskularnih bolesti.

1.5. Dijabetes melitus i KVS

Diabetes mellitus predstavlja primarni faktor rizika za razvoj neželjenih kardiovaskularnih događaja. Insulin zavisni DMT2 ubrzava razvoj i delovanje drugih faktora rizika u nastanku i komplikaciji kardiovaskularnih bolesti (87). Dijabetes indukuje vaskulopatije kroz endotel-zavisne i endotel-nezavisne vaskularne disfunkcije kako u slučaju tip 1, tako i u slučaju dijabetes melitusa tip 2 (DMT2) putem različitih mehanizama. Faktori rizika za razvoj DMT2 su gojaznost, pušenje, nedostatak vežbanja, etnička pripadnost, kao i HbA_{1C} iznad 6.0%. Poslednjih godina, kako u svetu tako i kod nas, uočen je trend porasta broja CABG kod bolesnika sa dijabetesom. Raza i sar. (94) su u svom radu iz 2014.god objavili podatke velike studije koja je obuhvatila više od 57 hiljada pacijenata koji su imali bajpas operaciju u periodu od 40 godina na klinici Klivlend. Rezultati studije su potvrdili ono što je većina kliničara već ranije konstatovala, a to je da je ishod bajpas operacije lošiji po pacijente sa dijabetesom u poređenju sa pacijentima bez dijabetesa. Takođe, incidenca pacijenata sa dijabetesom koji imaju bajpas operaciju je tokom perioda od 40 godina uvećana petostruko. Pacijenti sa dijabetesom su osim veće intrahospitalne smrtnosti, imali i veću incidencu komplikacija, pre svega infekcije sternuma, moždanog udara, bubrežne insuficijencije, kao i prolongiranu postoperativnu hospitalizaciju. Rezultati studije su, takođe, pokazali da je kod svega 8% pacijenata bila korišćena bilateralna unutrašnja torakalna arterija. Međutim, prema savremenim studijama upotreba obe ITA se ne preporučuje u gojaznih i bolesnika sa dijabetesom, zbog povećane verovatnoće infekcije sternuma (88).

Rezultati multicentričnih randomizovanih kliničkih studija (FREEDOM, CARDia, SYNTAX, VA CARDS, BARI i ARTS I) i meta analiza ukazuju na prednosti CABG operacije u odnosu na primenu stentova, sa i bez otpuštajućih lekova i angioplastiku, u bolesnika sa dijabetesom (95). Mehanizmi kojima dijabetes povećava kardiovaskularne komplikacije nisu u potpunosti rastumačeni, ali izgleda da je promena funkcije vaskularnih glatkih mišića jedan od ovih patoloških mehanizama (96). Dokazano je da je kod bolesnika sa dijabetesom smanjena vazorelaksacija, što bi moglo da potencira spazme bajpas graftova u ovoj populaciji. *In vitro* vazoreaktivne studije na animalnim modelima su pokazale da je dijabetična vaskularna disfunkcija povezana sa smanjenom aktivnošću K-kanala u glatkim mišićnim ćelijama, uključujući tu K_{ATP} kanale, K_v kanale, kao i male SK_{Ca} i BK_{Ca} kanale (97).

In vitro studije pružile su dokaz da je dijabetična vaskularna disfunkcija povezana sa smanjenom aktivnošću K-kanala glatkih mišića (98, 99), pre svega K_{ATP} kanala (100). Mutacije u $KCNJ11$ genu koji kodira subjedinicu pore pankreasnog K_{ATP} kanala, uzrok je razvoja neonatalnog DM (101). Takođe, smanjena funkcija K_{ATP} kanala primećena je u koronarnim arteriolama kod pacijenata sa DMT2 (102). Jontem i sar. (103) potvrdili su da prisustvo DMT2 umanjuje relaksaciju HVS nakon aplikacije OKK, kromakalima. Pored toga, pokazano je da je količina mRNA SUR2B subjedinice K_{ATP} kanala smanjena u ćelijama glatkih mišića izolovanih iz aorte pacova kod kojih je prethodno došlo do razvoja dijabetesa primenom streptozotocina (104).

Svojim uticajem na intracelularne mehanizme, OKK relaksiraju vaskularne glatke mišićne ćelije i smanjuju ekscitabilnost njihovih membrana. Zato OKK imaju potencijalnu terapijsku vrednost kao lekovi u lokalnoj i sistemske terapiji u cilju prevencije i reverzije spazma bajpas graftova. Međutim, efekti OKK na izolovanim bajpas graftovima bolesnika sa dijabetesom su nepoznati. Ovi nalazi bi mogli uticati na razvoj specifičnih rešenja za očuvanje transplantata bajpas graftova, kao i na različito postoperativno lečenje pacijenata sa i bez DMT2. Ova tema je izuzetno važna kada se istakne da je u ukupnom broju pacijenata koji su bili na operaciji CABG povećan broj pacijenata sa DMT2. Istovremeno, rezultati različitih kliničkih ispitivanja preporučili su operaciju CABG umesto perkutane koronarne intervencije za direktnu revaskularizaciju srca kao prednost za pacijente sa DMT2 (95).

Modulacija aktivnosti K-kanala molekularnim pristupima i selektivnim razvojem lekova može biti novi način lečenja vaskularne disfunkcije u budućnosti. Modulatori aktivnosti K-kanala se ne odnose samo na OKK, već se izmena njihove aktivnosti može vršiti i primenom blokatora K-kanala. Danas se na tržištu nalaze lekovi iz grupe modulatora K-kanala koji se primenjuju u terapiji neuroloških i kardiovaskularnih oboljenja, kao i u terapiji dijabetesa (13, 105).

Kapitulirajući sve prethodno navedeno u našem istraživanju je postavljena sledeća **Radna hipoteza**:

- OKK izazivaju vazodilataciju i/ili antivazokonstrikciju bajpas graftova aktivacijom K-kanala na ćelijskoj membrani mišićnih ćelija krvnih sudova izolovanih od pacijenata bez i sa dijabetes melitusom tip 2. Ovo dejstvo je koncentracijski-zavisno. Postoje razlike u tipovima K-kanala koji učestvuju u vazodilataciji i/ili antivazokonstrikciji između arterijskih i venskih bajpas graftova. OKK (pinacidil) ima i relaksantna dejstva koja ne zavise od modulacije K-kanala. U ovim dejstvima učestvuju i membranski Ca-kanali, kao i Na^+/Ca^{2+} pumpa.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su bili:

- ispitati vazodilatatorno i antivazokonstriktorno dejstvo OKK na segmentima krvnih sudova bolesnika sa/bez DMT2
- definisati tipove K-kanala uključene u vazodilatatorne i antivazokonstriktorne efekte OKK na graftovima bolesnika sa/bez DMT2
- utvrditi da li ispitivani OKK imaju dejstva nezavisna od aktivacije plazmamembranskih K-kanala
- ispitati uticaj različitih faktora rizika na vazodilatatorne i antivazokonstriktorne efekte OKK na graftovima bolesnika sa/bez DMT2
- ispitati ekspresiju vaskularnih K-kanala na graftovima bolesnika sa/bez dijabetesa

3. MATERIJAL I METODE

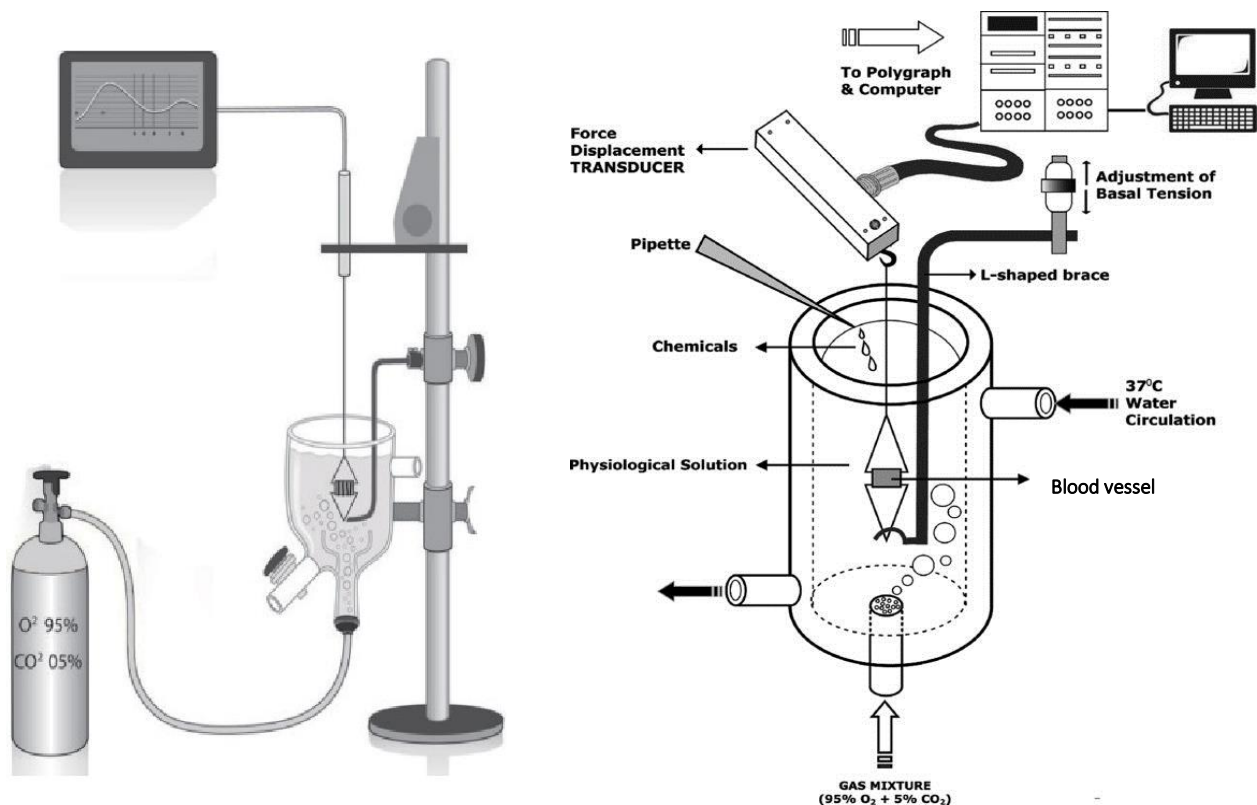
Doktorska disertacija urađena je na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Deo eksperimentalnog rada urađen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke "Vinča", kao i na Institutu za histologiju i embriologiju "Aleksandar Đ. Kostić", Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Doktorska disertacija realizovana je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, TR 31020.

U istraživanju su korišćeni preostali, neimplantirani segmenti bajpas graftova – ITA i HVS, uzeti u toku operacija aortokoronarnog bajpasa rađenih na Institutu za kardiovaskularne bolesti "Dedinje" u Beogradu. Neimplementirani ostaci bajpas graftova su nakon operacije stavljeni u bočice sa Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom, koji je pre toga držan na temperaturi od +4 °C. Nakon završene operativne procedure bočice sa graftovima su transportovane u laboratoriju Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu gde su istog dana sa njima rađeni farmakološki eksperimenti, dok je deo preparata odmah zamrznut u tečnom azotu i ostavljen u zamrzivaču na -80 °C za potrebe molekularno-bioloških eksperimenata. Proradne podatke koji su nam neophodni tokom istraživanja prikupljalo je medicinsko osoblje kroz popunjavanje podataka u upitniku. Pitanja u upitniku odnosila su se na pol, starost, telesnu masu i telesnu visinu, pušački status, tip *diabetes mellitus*, standardnu medikamentoznu terapiju koju je pacijent uzimao pre operacije, dijagnostifikovanu hipertenziju i hiperlipoproteinemiju. Primerak jednog takvog upitnika priložen je u dodatku A. Na osnovu podataka o telesnoj težini (TT, izraženoj u kg) i telesnoj visini (TV, izraženoj u m) izračunavan je BMI (*Body Mass Index*) prema standardnoj formuli $BMI = TV / TT^2$. Eksperimenti su bili odobreni od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu, dozvola broj 29/VII-9 od 1. jula 2015.

3.1. Farmakološki eksperimenti

Izolovani segmenti krvnih sudova se seku na preparate dužine oko 3 mm i procesom preparacije oslobađaju od okolnog vezivnog tkiva. Kroz lumen krvnih sudova provlače se dva čelična trougla i preparat se smešta u sistem za izolovane organe (Slika 11), pri čemu je jedan trougao fiksiran za staklenu cevčicu (nosač) koja se uranja u kupatilce ispunjeno Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom (zapremina kupatila je bila 10 ml), dok je drugi trougao preko konca vezan za transdjuser (K30, Hugo Sachs, Freiburg, Nemačka) koji registruje kontrakcije krvnog suda. Transdjuser je povezan preko pojačivača (amplifajera, model 301, Hugo Sachs, Freiburg, Nemačka) sa pisačem (R60, Rikadenki, Tokio, Japan) koji beleži kontrakcije. Pored pisača, korišćen je i softverski program IsoLab (Elunit, Beograd, Srbija) za registraciju kontrakcija. Preparati se nakon postavljanja u sistem za izolovane organe inkubiraju 45 min u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru na temperaturi od 37 °C, kroz koji se propušta gasna mešavina od 95% kiseonika i 5% ugljendioksida. Tokom perioda inkubacije preparat se ispira svežim Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom na svakih 10 - 15 min. Pre početka eksperimenta preparati se postepeno zatežu do optimalne tačke zatezanja tj. do postizanja bazalnog tonusa, koji je iznosio 2 g za HVS i 3 g za ITA. Optimalne tačke zatezanja za

preparate su dobijene korišćenjem rastvora 4 M KCl, procesom postepenog dodavanja po 100 μM ovog rastvora na svakih 10 min uz postepeno zatezanje preparata dok pri određenom opterećenju nije došlo do odsustva porasta kontrakcije na dalje dodavanje pomenutog rastvora.



Slika 11. Shematski prikaz sistema za izolovane organe. Slika levo preuzeta od (106), slika desno preuzeta od (107)

Eksperimenti su rađeni u serijama od 6 do 8 pojedinačnih eksperimenata. Svaka serija eksperimenata se razlikovala u zavisnosti od tipa preparata, načina kontrakcije tog preparata, upotrebljenog OKK, kao i upotrebljenog blokatora. U zavisnosti od toga da li je rađeno ispitivanje efekata OKK na tonične ili fazne kontrakcije, kontrakcije su postignute na preparatima HVS primenom fenilefrina (FE, 100 μM), depolarizujućim rastvorom KCl (80 mM), noradrenalinom (NOR, 10 μM) ili električnom stimulacijom (ES, paketi impulsa od 30 Hz na svaka 2 min supramaksimalnog napona od 80 mV). Kontrakcije na preparatima ITA bile bi izazvane istim stimulatorima u istim koncentracijama i uslovima, s tim što se umesto FE za postizanje tonične kontrakcije koristio 5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin, 100 μM). Takođe, za izvođenje farmakoloških eksperimenata na ITA prikupljani su samo uzorci uzeti od pacijenata sa DMT2, a kao opšta kontrola poslužili su eksperimentalni podaci dostupni u doktorskoj disertaciji prof. dr Ljiljane Gojković-Bukarice.

Dejstvo OKK ispitivano je samo na preparatima bez endotela, a prisustvo endotela testirano je primenom acetilholina (Ach, 100 μM) (108). Izostanak relaksacije preparata ili blaga kontrakcija nakon primene Ach ukazuje na odsustvo endotela, čime je i bilo omogućeno ispitivanje efekata OKK samo na vaskularnom mišićnom sloju.

OKK, pinacidil (0.01-100 μM), P1075 (0.001-100 μM) ili NS1619 (0.001-100 μM), su dodavani kumulativno, tako što se naredna koncentracija dodavala tek nakon što prođe efekat prethodne, tj. ona dostigne plato, ili nakon 10-20 minuta ako nije dobijen nikakav odgovor na datu koncentraciju. Koncentracije OKK su eksponencijalno dodavane u kupatilca sistema za izolovane organe. Na ovaj način su bile konstruisane koncentracijski-zavisne krive za svaki pojedinačni eksperiment.

Uključenost različitih (pod)tipova K-kanala u vazodilatatorne i antivazokonstriktorne efekte OKK se ispitivalo dodavanjem različitih neselektivnih i selektivnih blokatora K-kanala. Takođe, primenom istog blokatora u različitim koncentracijama ispitivana je razlika u afinitetima određenih (pod)tipova K-kanala na graftovima pacijenata sa ili bez DMT2.

U okviru ove disertacije ispitali smo i kalijum-nezavisna dejstva OKK u procesu vazodilatacije HVS pacijenata sa i bez DMT2. Upotrebom depolarišućeg rastvora KCl (80 mM), kao i blokatora prometa intracelularnog $[Ca^{2+}]$ ispitivana su dejstva OKK (pinacidila) nezavisna od aktivacije K-kanala.

3.1.1. Vazodilatatorni efekat

Ispitivanje vazodilatatornog efekta OKK je rađeno na uspostavljenoj stabilnoj toničnoj kontrakciji postignutoj na izolovanoj HVS nakon primene 100 μ M FE, a na izolovanoj ITA nakon primene 100 μ M 5-HT. Stabilna tonična kontrakcija je podrazumevala kontrakciju veću od 300 mg, čiji je plato u trajanju od najmanje 10 min bio nepromenjen. Nakon uspostavljanja stabilnog tonusa, OKK su dodavani kumulativno. Prilikom ispitivanja vazodilatatornog efekta OKK posle završetka efekta poslednje, najveće koncentracije OKK, dodavan je papaverin (PAP, 100 μ M) kao opšti vazodilatator. Efekat OKK je izražen kao procenat od maksimalne moguće relaksacije (E_{max}) postignute dodavanjem PAP. Protokol po kome su se ispitivali efekti prisustva blokatora na mehanizam dejstva OKK podrazumevao je konstruisanje kontrolne koncentracijski-zavisne krive za dati OKK. Upotrebom drugog segmenta preparata istog pacijenta konstruisana je druga koncentracijski-zavisna kriva dobijena u prisustvu blokatora, koji je dodavan u kupatilce i inkubiran 10 min pre otpočinjanja iste procedure kao u slučaju kontrolne krive (109).

Za ispitivanje vazodilatatornog efekta na izolovanim bajpas graftovima od OKK korišćeni su pinacidil, P1075, NS1619. Eksperimenti u kojima su testirani potencijalni efekti rastvarača supstanci koje smo koristili, tj. etanola (u slučaju P1075 i NS1619), su prethodno rađeni i pokazano je da oni nemaju nikakav uticaj, i da su njihovi retki efekti (blaga kontrakcija krvnog suda) prolazni. Vazodilatatorni efekat je, takođe, bio ispitivan primenom depolarišućeg rastvora KCl (80 mM), dok je u kontrolnoj krivi za ovaj tip eksperimenata tonična kontrakcija bila prouzrokovana upotrebom FE, odnosno 5-HT (110).

3.1.2. Antivazokonstriktorni efekat - noradrenalin

U posebnoj seriji eksperimenata fazne kontrakcije su bile izazvane noradrenalinom (100 μ M), pri čemu je kontrola bila 3 uzastopne ujednačene kontrakcije kod kojih je bio dostignut približno isti plato tonične komponente kontrakcije za približno isto vreme. Između svake pojedinačne fazne kontrakcije, nakon dostizanja maksimalne amplitude fazne kontrakcije, preparat je ispiran Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom i inkubiran oko 40 min. Nakon uspostavljanja ujednačenih kontrolnih kontrakcija, 10 min pre svake naredne koncentracije noradrenalina u kupatilce dodavana je po jedna linearno rastuća koncentracija OKK (0.01-100 μ M). Na osnovu ove serije eksperimenata bio je izračunat EC_{70} (efektivna koncentracija OKK koja dovodi do 70% relaksacije preparata) (111). U narednim serijama eksperimenata u cilju ispitivanja uloge određenih (pod)tipova K-kanala u antivazokonstriktornom efektu OKK, nakon kontrolnih faznih kontrakcija u kupatilce se, 10 min pre noradrenalina, dodavala samo jedna koncentracija OKK, i to izračunata EC_{70} , a potom posle pauze od 40 min i ispiranja, pre ponovnog dodavanja iste koncentracije OKK i NOR u kupatilce je bio dodavan jedan od blokatora K-kanala. Računata je redukcija kontrakcije preparata u prisustvu OKK i OKK + blokator u odnosu na kontrolne kontrakcije pod uticajem NOR, dobijene pre primene OKK.

3.1.3. Antivazokonstriktorni efekat - električna stimulacija

U seriji eksperimenata gde su preparati kontrahovani primenom električne stimulacije, segmenti izolovanih bajpas graftova su bili smešteni između dve elektrode, napravljene od paladora, uronjene u kupatilce za izolovane organe. U toku eksperimentalnog rada korišćen je električni stimulator (Grass S44, Quincy, SAD). Primenjivani su paketi impulsa sledećih karakteristika: frekvencije 30 Hz, vreme trajanja jednog impulsa 0.3 ms, submaksimalnog napona od 80 mV i vremenski razmaci između paketa impulsa su iznosili 120 s. Na opisani način se stimulišu adrenergički nervni završeci. Ujednačena amplituda 3-4 pojedinačne uzastopne kontrakcije izazvane električnom stimulacijom neposredno pre dodavanja OKK predstavljala je kontrolnu amplitudu (100%). OKK je dodavan kumulativno, naredna koncentracija je dodavana nakon što prođe efekat prethodne ili nakon 10 minuta ako je odgovor na datu koncentraciju izostao. Na ovaj način su konstruisane koncentracijski-zavisne krive, prvo bez, a zatim i u prisustvu blokatora na istom preparatu. U svrhu ispitivanja da li su kontrakcije izazvane električnom stimulacijom posredovane oslobođenim neurotransmiterom iz simpatičkih nervnih vlakana, 20 min pre započinjanja električne stimulacije u kupatilce za izolovane organe dodavan je fentolamin. Fentolamin je neselektivni α -adrenergički antagonist čija je uloga da onemogući vezivanje noradrenalina oslobođenog iz simpatičkih nervnih završetaka za vaskularne glatke mišićne ćelije (112).

3.2. Molekularno biološke metode: Western blot i imunohistohemijska analiza

Korišćenjem molekularno-bioloških tehnika, uključujući imunohistohemiju i *Western blot* analizu, ispitivano je prisustvo različitih (pod)tipova K-kanala upotrebom specifičnih antitela. Za analizu ekspresije kanalskih proteina koristila su se specifična poliklonalna kozja antitela za Kv 1.2 (kataloški broj sc-11186), Kv 1.3 (kataloški broj sc-17241), Kv 4.2 (kataloški broj sc-11680), Kv 4.3 (kataloški broj sc-11686), Kir 6.2 (kataloški broj sc-11228), SUR 2A (kataloški broj sc-32461), SUR 2B (kataloški broj sc-5793) i SUR1 (kataloški broj sc-5789), dok je MaxiK α (kataloški broj sc-374142) bilo monoklonalno mišje antitelo, a Kir 6.1 (kataloški broj sc-20808) poliklonalno zečje antitelo. Sva antitela su bila nabavljena od kompanije Santa Cruz Biotechnology Inc., SAD. Za potrebe Western blota antitela su bila rastvarana u TBS, dok su u slučaju imunohistohemije ona bila rastvarana u PBS. Uzorci tkiva koji su se koristili za ove analize bili su netretirani segmenti krvnih sudova, isprani u Krebs-Ringerovom bikarbonatnom rastvoru i zamrznuti u tečnom azotu, a potom čuvani u zamrzivaču na -80 °C.

3.2.1. Western blot analiza

Uzorci sveže smrznutih tkiva krvnih sudova homogenizovani su u RIPA puferu (50 mmol/l Tris/HCl, pH 7.4, 150 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, 0.2% Na-deoxycholate, 0.2% SDS, 1 mmol/l EDTA,) sa proteaznim i fosfataznim inhibitorima, a dobijeni ćelijski lizati su potom centrifugirani na 11200 obrtaja, na temperaturi od +4 °C tokom 30 min. Dobijeni supernatant, u kome se nalaze proteini, je prebacivan u nove ependorfe. Koncentracija proteina u supernatantu je određivana na 562 nm spektrofotometra koristeći BCA proteinski esej (SERVA Electrophoresis, Hejdelberg, Nemačka) za kvantifikaciju totalnih proteina u uzorku. Pre procesa SDS-PAGE elektroforeze na 10% poliakrilamidnom (PAA) gelu, dodavan je 2xLaemli pufer, a potom su proteini inkubirani (denaturisani) 5 min na 95 °C. Nakon procesa elektroforeze rađen je transfer razdvojenih proteina na polivinil flouridne membrane, koje su prethodno bile blokirane sa 5% bovin serum albuminom 1.5 sat na sobnoj temperaturi. Zatim, preko noći membrane bi bile inkubirane na +4 °C sa pojedinačnim primarnim antitelima anti-Kir6.1 (rastvorenim u odnosu 1:500 / 1:1000), anti-Kir6.2 (rastvorenim u odnosu 1:500), anti-SUR2B (rastvorenim u odnosu 1:500), anti-MaxiK α (rastvorenim u odnosu 1:1000), anti-SUR2A (rastvorenim u odnosu 1:250), anti-SUR1 (rastvorenim u odnosu 1:250), anti-

Kv1.2 (rastvorenim u odnosu 1:500), Kv1.3 (rastvorenim u odnosu 1:500), anti-Kv4.2 (rastvorenim u odnosu 1:500) i anti-Kv4.3 (rastvorenim u odnosu 1:500). Nakon intenzivnog ispiranja pomoću TBST, membrane su inkubirane sa sekundarnim HRP-konjugovanim antitelom (rastvorenim u odnosu 1:10 000) 1.5 sat na sobnoj temperaturi. Vizuelizacija proteina je rađena na rentgen filmu, nakon čega su antitela uklanjana sa membrana pomoću pufera za "skidanje" (stripovanje) (100 mmol/l β -merkaptotanol, 2% SDS i 62.5 mmol/l Tris pH 6.7) 30min na +50 °C. Membrane su potom ispirane TBST puferom i nanošeno je specifično antitelo za β -aktin kao *loading* kontrola, a potom ponovljen postupak vizuelizacija na filmu. Kvantifikacija proteina (pod)tipova K-kanala je rađena u odnosu na β -aktin (rastvorenim u odnosu 1:4000), pri čemu je korišćen softver *ImageJ* (NIH, SAD) za kvantitativnu analizu (113).

3.2.2. Imunohistohemijska analiza

Zamrznuti segmenti krvnih sudova su prvo fiksirani metanol + aceton u odnosu 1:1 na -20 °C, a zatim kalupljeni korišćenjem Tissue-Tek[®] OCT Compound-a (Sakura, SAD). Uzorci su sečeni na mikrotomu (Cryostat Leica CM1850) na preseke debljine 5 μ m, a potom kratkotrajno fiksirani u mešavini metanola i acetona u odnosu 1:1 u periodu od 10 min na -20 °C i ispirani potom u TBS (*Tris-buffered saline*) puferu. Nakon fiksacije svi dalji koraci su rađeni na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori, sa ispiranjima u TBS puferu između svakog pojedinačnog koraka. Posle fiksacije slajdovi (mikroskopske pločice sa fiksiranim preparatima) su bili inkubirani u 1.5% normalnom blokings serumu u PBS (*Phosphate-buffered saline*) puferu 1 sat kako bi se blokirala nespecifična mesta vezivanja. Potom su uzorci inkubirani preko noći sa istim antitelima korišćenim i za Western blot (rastvorena u odnosu 1:50), kao i sa primarnim antitelom za CD31 (poliklonalno zečje antitelo, Santa Cruz Biotechnology, sc-1506-R, rastvoreno u odnosu 1:100). Uzorci tkiva tretirani sa zečjim i mišjim primarnim antitelima su tretirani potom komercijalnim UltraVision/DAB kitom za bojenje (Thermo Scientific Lab Vision TL-060-HD, SAD), dok su uzorci tretirani kozjim primarnim antitelima tretirani komercijalnim kitom Immuno Cruz[™] goat ABC Staining System (sc-2023, Santa Cruz Biotechnology Inc, SAD). Negativne kontrole su dobijene korišćenjem iste metodologije bez prisustva primarnog antitela. Bojenje nukleusa uzoraka je rađeno Majerovim hemotoksilinom 2 min. Pločice su bile posmatrane pod svetlosnim mikroskopom (Leica DM4000 B LED) sa digitalnom kamerom (Leica DFC295) i koristeći softverski program Leica Application Suite (LAS, v4.4.0) (114).

3.3. Supstance i rastvori

Sledeće supstance korišćene su u farmakološkim eksperimentima: otvarači kalijumovih kanala – pinacidil i njegov sintetski analog P1075, NS1619; zatim fenilefrin, serotonin, noradrenalin, acetilholin, papaverin, glibenklamid, tetraetilamonijum, 4-aminopiridin, iberiotoksin, margatoksin, niki, nifedipin i fentolamin. Pinacidil je rastvaran u destilovanoj vodi uz dodatak kapi 0.1 M HCl, dalja razblaženja su pravljena neposredno pre upotrebe u destilovanoj vodi. P1075 je rastvaran u 96% v/v etanolu, dok su razblaženja pravljena neposredno pre upotrebe u destilovanoj vodi. Glibenklamid je rastvaran u 96% v/v etanolu. NS1619 i nifedipin su rastvarani u 70% v/v etanolu. U slučaju NS1619 dalja razblaženja su pravljena u destilovanoj vodi. Radne koncentracije etanola u ovom slučaju nisu bile veće od 0.01% (v/v) u kupatilcu. Ostale supstance su rastvarane u destilovanoj vodi. Sve supstance su dodavane direktno u kupatilce u zapremini od 100 μ l, a date koncentracije su izračunate kao finalne koncentracije u odnosu na zapreminu kupatilca od 10 ml. Proizvođač pinacidila je bio Leo Pharmaceutical, Danska, dok su sve ostale korišćene supstance pribavljene od Sigma-Aldrich Inc., SAD. Eksperimenti sa NS1619 i nifedipinom su rađeni u zamračenoj prostoriji.

Korišćen je Krebs-Ringerov bikarbonatni rastvor sledećeg sastava (mmol/l): 120 NaCl, 5 KCl, 1.2 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃ i 11 glukoze (pH 7.4). Depolarišući rastvor KCl (80

mM) pravljen je ekvimolarnom zamenom Na^+ sa K^+ u željenoj koncentraciji (mmol/l): 45 NaCl, 80 KCl, 1.2 MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 1.2 KH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 i 11 glukoze. Pufer TBS i TBST (TBS + 0.05% Tween-20) korišćeni su za molekularno-biološke metode. Pufer TBS je bio pravljen u sledećem sastavu: 1.211 g Tris, 8.766 g NaCl, 1 l dH_2O i dodavana je koncentrovana HCl za potrebe titracije pH od 7.5 - 8. Napravljeni pufer je čuvan na +4 °C. TBST je pravljen dodavanjem 5% Tween-20 u TBS, a potom čuvan na sobnoj temperaturi. Pufer PBS je bio komercijalno dostupan.

3.4. Statistička analiza

Amplitude faznih kontrakcija su merene od bazalnog tonusa do vrha šiljka (100%), dok su amplitude toničnih kontrakcija merene od stabilnog platoa dostignutog primenom vazokonstriktora do maksimalne relaksacije prouzrokovane papaverinom (100%).

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) odnosno koncentracija koja je prouzrokovala efekte najbliže efektima 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju računata je za svaki pojedinačan eksperiment primenom linearne regresione analize. EC_{50} izražene su kao pD_2 vrednosti ($\text{pD}_2 = -\log\text{EC}_{50}$). Prilikom ispitivanja antivazokonstriktornog efekta računata je EC_{70} , tj. koncentracija supstance koja proizvodi 70% relaksacije od maksimuma.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm greška srednje vrednosti (SEM). U slučaju Western blot analize stubići na graficima su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Za testiranje značajnosti razlika korišćen je Studentov t -test i χ^2 test, a P vrednost manja od 0.05, 0.01 i 0.001 je smatrana statistički značajnom. Sva izračunavanja su rađena u programu GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, SAD), a grafici su konstruisani u programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Sociodemografske i kliničke karakteristike bolesnika

U cilju izrade ovog istraživanja za potrebe eksperimentalnog rada dobijeni su uzorci od ukupno 452 pacijenta. Međutim, nisu svi uzorci i iskorišćeni u eksperimentalnom radu usled različitih nedostataka (nemogućnosti kontrahovanja krvnog suda, uspostavljanja nedovoljne amplitude kontrakcije, kao i drugih nepredvidivih okolnosti u eksperimentalnom radu). Konačno, studija je obuhvatila ukupno 247 pacijenata, 84 pacijenata bez i 163 pacijenata sa DMT2 (Tabela 1), pri čemu je 61 pacijent bio insulin-zavisni, 98 insulin-nezavisni (za 4 pacijenta imali smo unetu dijagnozu DMT2 bez spiska lekova na osnovu kojih bismo ustanovili njihov insulinski status). Dobijeni graftovi predstavljali su preostali materijal koji nije iskorišćen tokom operacije. Od određenog broja pacijenata dobijen je samo uzorak ITA ili uzorak HVS, dok je u nekim slučajevima od istog pacijenta dobijen i uzorak HVS i ITA (Tabela 2). Kliničke i demografske karakteristike ovih pacijenata prikazane su u Tabeli 3. Vrednost glikemije je merena jutro pre operacije. Opseg referentnih vrednosti za glikemiju na Institutu za kardiovaskularne bolesti "Dedinje" je 3.9 – 6.1 mmol/L. Podaci o HbA1C nam nisu bili dostupni. Terapija lekovima pacijenata prikazana je u Tabeli 4.

Tabela 1. Odnos polova među pacijentima koji su imali bajpas operaciju, a čiji su graftovi korišćeni u eksperimentalnom radu

POL	NDM (%)	DMT2 (%)	P
muškarci	68 (81)	125 (76,7)	>0.05
žene	16 (19)	38 (23,3)	>0.05
ukupno	84 (100)	163 (100)	

Tabela 2. Distribucija dobijenih uzoraka grafta

	nedijabetičari (NDM)		
	HVS (%)	ITA (%)	HVS + ITA (%)
Ukupno n = 84			
muškarci	51 (75)	12 (17,6)	5 (7,4)
žene	15 (93,7)	1 (6,3)	0 (0)
	dijabetičari (DMT2)		
	HVS (%)	ITA (%)	HVS + ITA (%)
Ukupno n = 163			
muškarci	71 (56,8)	22 (17,6)	32 (25,6)
žene	19 (50)	13 (34,2)	6 (15,8)

Tabela 3. Demografske karakteristike pacijenata, sa detaljnijim podacima o BMI (A), pušačkom statusu (B) i glikemiji (C)

	NDM n = 84 (%)	DMT2 n = 163 (%)	P
godine (\pm SD)	64,2 \pm 8,5	66,9 \pm 6	>0.05
pušački status	15 (17,8)	19 (11,6)	>0.05
hipertenzija	84 (100)	163 (100)	>0.05
hiperlipoproteinemija	80 (95,2)	158 (96,9)	>0.05
BMI (\pm SD)	27,5 \pm 3,9	28,0 \pm 3,9	>0.05
glikemija (\pm SD, mmol/L)	6,3 \pm 1,7	8,7 \pm 3,1	<0.001

- (A) BMI status

BMI (WHO Klasifikacija)

BMI	kategorija	BMI	NDM (n = 84)	DMT2 (n = 163)	P
< 18.5	pothranjen	< 18.5	0	1	>0.05
18.5 - 24.9	normalno	18.5 - 24.9	22	31	>0.05
25.0 - 29.9	prekomerna težina	25.0 - 29.9	39	79	>0.05
30.0 - 34.9	gojaznost I stepena	30.0 - 34.9	20	29	>0.05
35.0 - 39.9	gojaznost II stepena	35.0 - 39.9	3	7	>0.05
> 40.0	gojaznost III stepena	> 40.0	0	1	>0.05
Nedostajući podaci			0	15	

- (B) Pušački status

	NDM (%)	DMT2 (%)	P
pušač	15 (17,8)	19 (11,6)	>0.05
bivši pušač	30 (35,7)	59 (36,2)	>0.05
nepušač	38 (45,2)	78 (47,8)	>0.05
nedostajući podaci	1 (1,1)	7 (4,3)	

- (C) Nivo šećera u krvi

	NDM (%)	DMT2 (%)	P
3.9 - 6.1	52 (17,8)	29 (11,6)	>0.05
6.1 < n < 10	26 (35,7)	64 (36,2)	>0.05
n ≥ 10	4 (45,2)	42 (47,8)	>0.05
nedostajući podaci	2 (1,1)	28 (4,3)	

- Opseg referentnih vrednosti za glikemiju na Institutu za kardiovaskularne bolesti "Dedinje" je 3.9 – 6.1 mmol/L

Tabela 4. Terapija lekovima pacijenata

	NDM n = 84	DMT2 n = 163
ACE inhibitori (n, %)	53 (63,1)	115 (70,5)
β blokatori (n, %)	61 (72,6)	142 (87,1)
Ca - antagonisti (n, %)	13 (15,4)	31 (19,2)
Diuretici (n, %)	26 (31)	56 (34,3)
Statini (n, %)	43 (51,2)	53 (32,5)
Inhibitori agregacije trombocita (n, %)*	21 (25)	40 (24,5)
Inhibitori agregacije trombocita (n, %)	74 (88,1)	87 (53,3)
Vazodilatatori (n, %)	33 (39,3)	84 (51,5)
Antikoagulansi (n, %)	14 (16,7)	40 (24,5)
Antidijabetici		
a) oralni	1 (1,2)	143 (87,7)
b) insulin	0 (0)	72 (44,2)

*bez aspirina

4.2. Poređenje vazodilatatornog efekta pinacidila na graftovima bolesnika sa različitim kliničkim profilom

Na reprezentativnom uzorku pacijenata (n = 37) je testirano da li ima razlike u efektima pinacidila u odnosu na pol kod venskog bajpas grafta dijabetičnih pacijenata. Ispitivane su samo razlike u pogledu vazodilatatornog efekta pinacidila na graftovima prethodno prekontrahovanim fenilefrinom. U slučaju HVS pacijenata sa DMT2 nije uočena razlika u efektima pinacidila u odnosu na pol (pD₂ 5.64 ± 0.07, n = 23 muškaraca vs. pD₂ 5.79 ± 0.08, n = 14 žena, P > 0.05). Dodatno je testirano da li ima razlike u efektima pinacidila na HVS u odnosu na to da li je pacijent ili ne, insulin-zavisan, a u proračun su uzeti samo muškarci iz prethodne grupe (jedan pacijent nije uzet u proračun zbog nedostatka informacije o tretmanu dijabetesa). Na datom uzorku nisu uočene razlike u efektima pinacidila na HVS kod osoba muškog pola u zavisnosti od tretmana insulinom, odnosno oralnim antidijabeticima (pD₂ 5.73 ± 0.12, n = 9 vs. pD₂ 5.51 ± 0.08, n = 13, P > 0.05). Takođe, na istoj grupi muškaraca testirano je da li BMI iznad 30 (gojaznost I i II stepena, BMI od 30 do 39.9) ima uticaja na moguće razlike u efektima pinacidila. Poredili smo muškarce koji imaju BMI iznad 30, sa onima koji imaju BMI između 25 i 30 (prekomerna težina) i nisu uočene razlike u efektima pinacidila na HVS između ovih grupa (pD₂ 5.65 ± 0.15, n = 8 u grupi BMI preko 30 vs. pD₂ 5.67 ± 0.09, n = 12 u grupi BMI između 25 i 30, P > 0.05).

Takođe, iste gore pomenute parametre smo obradili i na grupi DMT2 pacijenata kod kojih smo ispitivali vazodilatatorne efekte pinacidila na ITA prekontraovanj serotoninom. Na reprezentativnom uzorku od $n = 32$ pacijenta, nije uočena razlika u efektima pinacidila u odnosu na pol na ITA ($pD_2 5.77 \pm 0.1$, $n = 21$ muškaraca vs. $pD_2 5.67 \pm 0.1$, $n = 11$ žena, $P > 0.05$). Zatim je testirano da li ima razlike u efektima pinacidila na ITA u odnosu na to da li je pacijent koristio insulin ili ne, a u proračun su uzeti samo muškarci iz prethodne grupe. Na datom uzorku nisu uočene razlike u efektima pinacidila na ITA kod osoba muškog pola u zavisnosti od tretmana insulinom, odnosno oralnim antidijabeticima ($pD_2 5.84 \pm 0.19$, $n = 8$ vs. $pD_2 5.73 \pm 0.13$, $n = 13$, $P > 0.05$). Takođe, kao i u slučaju HSV i ovde smo testirali na istoj grupi muškaraca da li BMI iznad 30 (gojaznost I i II stepena, BMI od 30 do 39.9) ima uticaja na moguće razlike u efektima pinacidila. Poredili smo muškarce koji imaju BMI iznad 30, sa onima koji imaju BMI između 25 i 30 (prekomerna težina) i nisu uočene razlike u efektima pinacidila na ITA između ovih grupa ($pD_2 5.69 \pm 0.05$, $n = 5$ u grupi BMI preko 30 vs. $pD_2 5.58 \pm 0.16$, $n = 10$ u grupi BMI između 25 i 30, $P > 0.05$).

Na reprezentativnom uzorku od $n = 33$ pacijenata koji su NDM testirane su razlike u vazodilatatornim efektima pinacidila na HVS prekontraovanj fenilefrinom u odnosu na pol. Statistička analiza je pokazala da u slučaju efekata pinacidila na HVS ne postoji razlika u odnosu na pol ($pD_2 5.84 \pm 0.06$, $n = 22$ muškaraca vs. $pD_2 5.78 \pm 0.1$, $n = 11$ žena, $P > 0.05$). Dodatno na grupi pacijenata muškog pola testirano je i da li ima razlike u efektima pinacidila u odnosu na BMI, s tim što je ovde testirano da li ima razlike između pacijenata sa normalnom težinom (BMI do 25) u odnosu na one sa prekomernom telesnom težinom (BMI između 25 i 30). Analiza je pokazala da ni ovde nisu prisutne razlike u odnosu na BMI ($pD_2 5.61 \pm 0.08$, $n = 7$ u grupi BMI do 25 vs. $pD_2 5.84 \pm 0.07$, $n = 10$ u grupi BMI između 25 i 30, $P > 0.05$). Međutim, interesantno je da je dobijena statistička vrednost iznosila $P = 0.055$, tako da bi proširivanje ove grupe moglo da ukáže na to da gojaznost utiče na razlike u efektima pinacidila na ITA kod osoba muškog pola.

Zatim smo koristeći isti uzorak uporedili efekte pinacidila na HVS između pacijenata muškog pola sa i bez DMT2. Statistička analiza je pokazala da su ovde prisutne razlike u efektima pinacidila ($pD_2 5.84 \pm 0.06$, $n = 22$ NDM vs. $pD_2 5.64 \pm 0.07$, $n = 23$ DMT2, $P < 0.05$). Dodatna analiza je pokazala da je ova statistička razlika prisutna pri vrlo visokim koncentracijama pinacidila (10 - 100 μM), za koje smo i mi i druge istraživačke grupe ukazale da imaju i K-nezavisne mehanizme dejstva (dodatno obrađeno u drugom delu rezultata). Analiza efekata pinacidila na HVS kod osoba ženskog pola sa i bez DMT2 nije pokazala statističku značajnost ($pD_2 5.78 \pm 0.1$, $n = 11$ NDM vs. $pD_2 5.79 \pm 0.08$, $n = 14$ DMT2, $P > 0.05$).

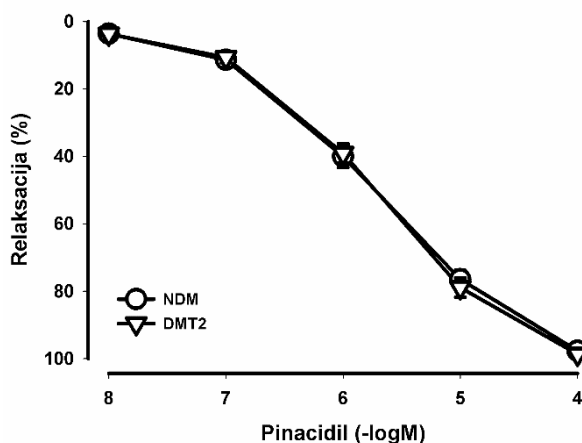
Dodatno nije uočena razlika u senzitivnosti pinacidila između HVS i ITA kod osoba muškog pola sa DMT2 ($pD_2 5.64 \pm 0.07$, $n = 23$ HVS vs. $pD_2 5.77 \pm 0.1$, $n = 21$ ITA, $P > 0.05$). Takođe, postojanje ovakve razlike nije prisutno ni kod osoba ženskog pola ($pD_2 5.79 \pm 0.08$, $n = 14$ HVS vs. $pD_2 5.67 \pm 0.1$, $n = 11$ ITA, $P > 0.05$).

Kod osoba ženskog pola sa i bez DMT2 nismo bili u mogućnosti da napravimo reprezentativan uzorak kako bi dodatni parametri (BMI i terapija insulinom vs. oralnim antidijabeticima kod DMT2) mogli da budu razmatrani. Takođe, mali uzorak ITA nam nije dozvolio razmatranja efekta pinacidila kod osoba muškog pola sa i bez DMT2.

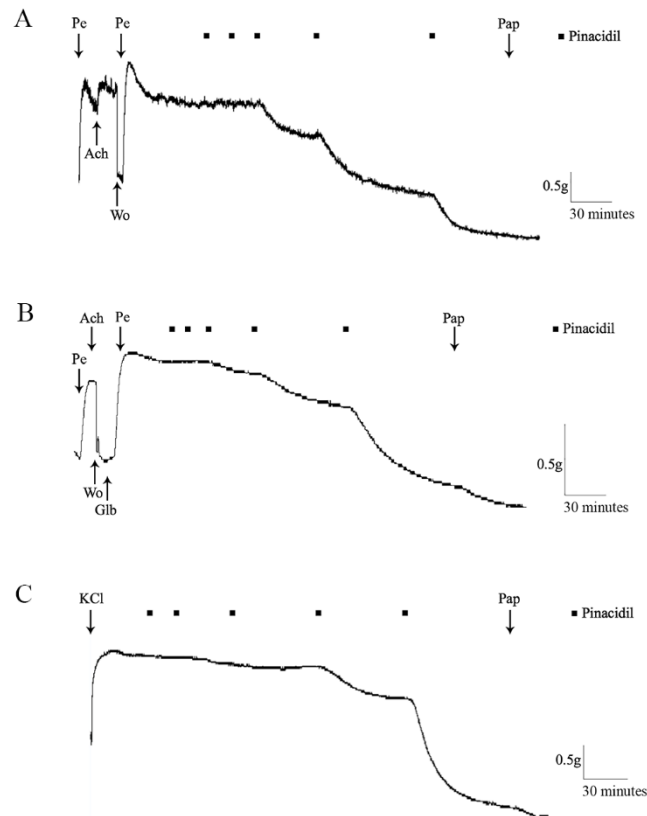
4.3. ULOGA K-KANALA U VAZODILATORNOM EFEKTU PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI

4.3.1. Efekat pinacidila na izolovanoj humanoju veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Pinacidil (0.01 - 100 μ M) je koncentracijski-zavisno relaksirao HVS bez endotela NDM pacijenata (pD_2 5.82 ± 0.05 , $n = 32$) i sa DMT2 (pD_2 5.85 ± 0.05 , $n = 29$), nije bilo statistički značajne razlike između pD_2 vrednosti ($P > 0.05$), a maksimalne relaksacije (E_{max}) nakon primene najveće koncentracije pinacidila bile su identične (100% obe, $P > 0.05$) (Slika 12). Originalni zapis je prikazan na Slici 13a.



Slika 12. Relaksantni efekat pinacidila na humanoju veni safeni. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2), prekontrahovane sa fenilefrinom (100 μ M). Tačke na grafiku (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM); ($n = 32$ NDM, $n = 29$ DMT2; n - broj segmenata).



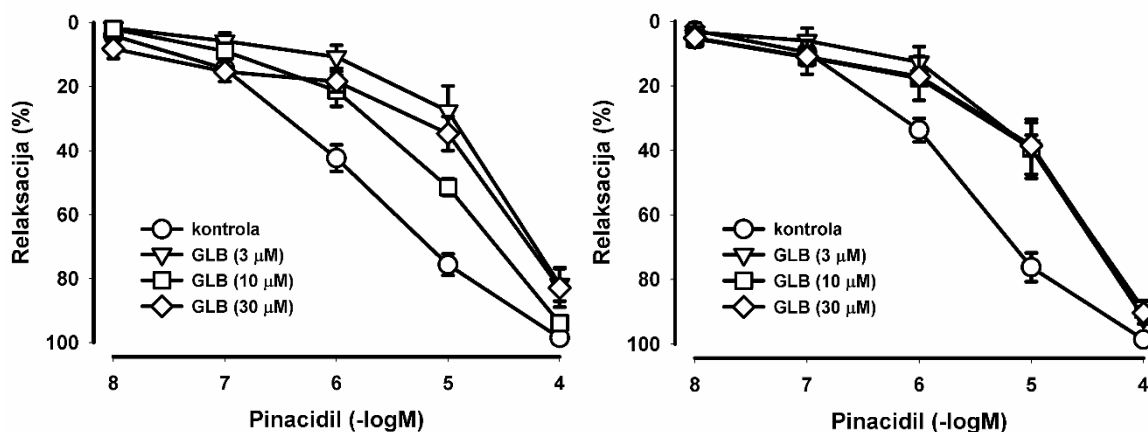
Slika 13. Originalni zapisi efekata pinacidila na humanoj veni safeni pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2. Efekat pinacidila (crni kvadrat, 0,01 - 100 μ M) na segmente HVS prekontrahovane sa fenilefrinom (Pe, 100 μ M) u odsustvu (A) i u prisustvu (B) glibenklamida (Glb, 3 μ M) ili sa ratsvorom sa visokom koncentracijom jona kalijuma (KCl 80 mM, C). Prisustvo endotela testirano je dodavanjem acetilholina (Ach, 100 μ M); papaverin (Pap, 100 μ M) je aplikovan kao opšti vazodilatator. Svi originalni zapisi dobijeni su na dijabetičnim segmenata HVS.

4.3.2. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Kako je naglašeno u Uvodu identifikovano je pet glavnih tipova K-kanala u vaskularnim ćelijama glatkih mišića, a mi smo u sledećim eksperimentima ispitali ulogu tri od tih pet glavnih tipova K-kanala: K_{ATP} , BK_{Ca} , K_V , na efekte pinacidila koristeći različite selektivne i neselektivne blokatore K-kanala.

Uticaj GLB, selektivnog blokatora K_{ATP} kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Glibenklamid (GLB), selektivni blokator K_{ATP} kanala, u tri različite ispitivane koncentracije (3, 10 i 30 μ M), statistički značajno inhibira koncentracijski-zavisne krive pinacidila i suprimira maksimalnu vazodilataciju na pinacidil (Tabela 5) na HVS NDM pacijenata (Slika 14 levo), kao i na HVS DMT2 pacijenata (Slika 14 desno). Originalni zapis efekta pinacidila na HSV od DMT2 bolesnika u prisustvu GLB je prikazan na Slici 13B.



Slika 14. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu antagoniste glibenklamida. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μM) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno) u prisustvu različitih koncentracija (3, 10 i 30 μM) selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (GLB). Tačke na graficima (krugovi, trouglovi, kvadrati i rombovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 15 - 16$ za kontrole i $n = 5 - 7$ u prisustvu GLB; n - broj segmenata).

Dok je na HVS uzetim od NDM pacijenata GLB pri nižim koncentracijama (3 μM) visoko statistički značajno ($P < 0.01$) inhibirao efekte pinacidila kao i maksimalnu relaksaciju, isti ovi efekti na DMT2 HVS su uočeni pri višim koncentracijama GLB (30 μM) (Tabela 5).

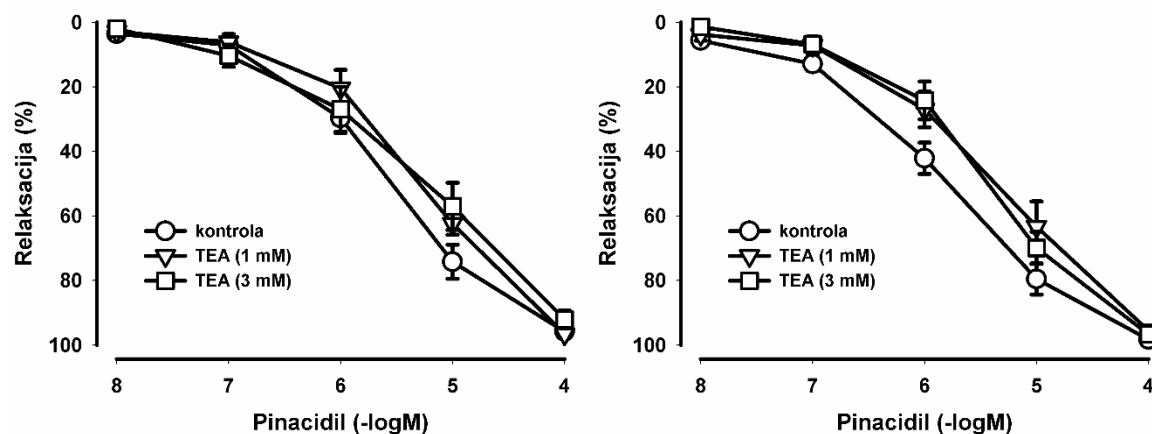
Tabela 5. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane vene safene u prisustvu antagoniste glibenklamida. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata bez i sa dijabetes melitusa tipa 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu selektivnog blokatora za K_{ATP} kanale, glibenklamida.

HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm \text{SEM}$	$E_{\text{max}} \pm \text{SEM}$	$pD_2 \pm \text{SEM}$	$E_{\text{max}} \pm \text{SEM}$
kontrola	5.91 ± 0.16	98.40 ± 0.78	5.71 ± 0.07	97.60 ± 0.71
GLB (3 μM)	$4.53 \pm 0.34^{**}$	$81.83 \pm 5.23^{**}$	$5.06 \pm 0.22^*$	$91.82 \pm 1.89^*$
kontrola	5.91 ± 0.04	98.68 ± 0.69	5.89 ± 0.20	99.63 ± 0.37
GLB (10 μM)	$5.36 \pm 0.08^{**}$	$93.92 \pm 1.52^*$	$5.09 \pm 0.27^*$	$89.27 \pm 2.63^{**}$
kontrola	5.79 ± 0.19	98.47 ± 0.60	5.72 ± 0.15	98.66 ± 0.64
GLB (30 μM)	$4.81 \pm 0.38^*$	$82.90 \pm 6.03^*$	$5.11 \pm 0.11^{**}$	$90.33 \pm 1.89^{**}$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; GLB – glibenklamid; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 4 - 6$ za kontrole i $n = 5 - 7$ u prisustvu GLB; n - broj segmenata.

Uticaj TEA, neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Tetraetilamonijum (TEA, 1 mM), neselektivni blokator K_{Ca} kanala nije antagonizovao efekte pinacidila na HVS od NMD ($n = 6$) i DMT2 ($n = 7$) pacijenata (Slika 15 levo, Tabela 6). Upotrebom veće koncentracije TEA (3 mM) efekat pinacidila je bio antagonizovan na HVS od DMT2 pacijenata (Slika 15 desno), dok ovakav efekat nije uočen na HVS kod NDM pacijenata (Tabela 6).



Slika 15. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu antagonistice tetraetilamonijuma. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom ($100 \mu\text{M}$) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno) u prisustvu različitih koncentracija (1 i 3 mM) neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma (TEA). Tačke na graficima (krugovi, trouglovi i kvadrati) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 10 - 11$ za kontrole i $n = 6 - 7$ u prisustvu TEA; n - broj segmenata).

Nijedna od upotrebljenih koncentracija TEA nije suprimirala efekte pinacidila na maksimalnu relaksaciju kod obe grupe HVS uzoraka (Tabela 6).

Tabela 6. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane vene safene u prisustvu antagonistice tetraetilamonijuma. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata bez i sa dijabetes melitusa tipa 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu predominantnog blokatora za K_{Ca} kanale, tetraetilamonijuma.

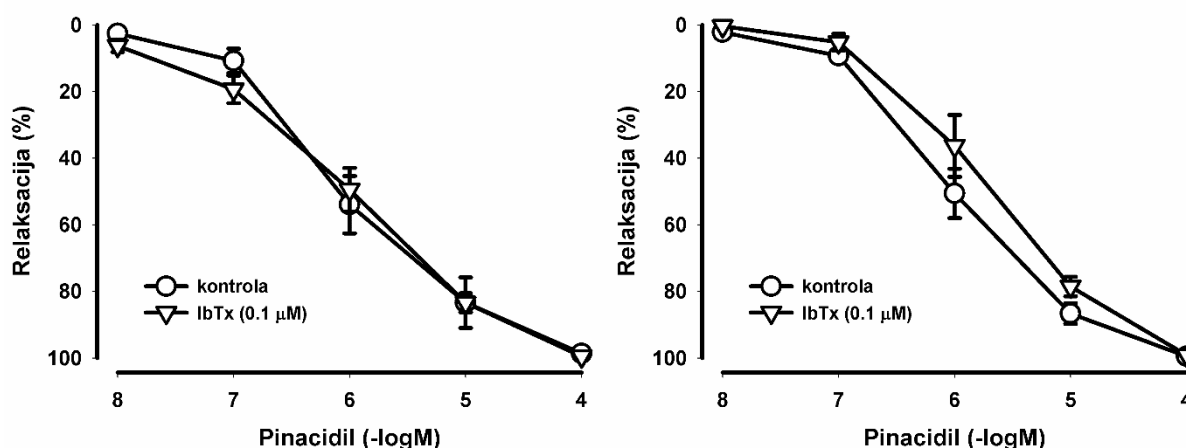
HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.61 ± 0.08	96.70 ± 1.60	5.80 ± 0.17	98.18 ± 1.82
TEA (1 mM)	5.53 ± 0.09	96.60 ± 1.09	5.55 ± 0.14	95.59 ± 1.07
kontrola	5.73 ± 0.18	95.00 ± 3.06	5.98 ± 0.11	98.38 ± 1.18
TEA (3 mM)	5.44 ± 0.18	92.08 ± 2.76	$5.59 \pm 0.11^*$	96.73 ± 1.71

* $p < 0.05$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; TEA

– tetraetilamonijum; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5 - 6$ za kontrole i $n = 6 - 7$ u prisustvu TEA; n - broj segmenata.

Uticaj IbTx, selektivnog blokatora BK_{Ca} kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Iberiotoksin (IbTx) je visoko selektivni blokator BK_{Ca} (inhibitor $K_{Ca} 1.x$, $K_{Ca} 4.x$, $K_{Ca} 5.x$) kanala, koji nije značajno modifikovao vazorelaksantno dejstvo pinacidila na izolovani venski krvni sud NDM i DMT2 pacijenata (Slika 15). Takođe, nije bilo statistički značajne promene u E_{max} ni u jednoj od grupa (Tabela 7).



Slika 15. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu antagoniste iberiotoksina. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom ($100 \mu M$) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno) u prisustvu selektivnog blokatora BK_{Ca} kanala, iberiotoksina (IbTx, $0.1 \mu M$). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 5 - 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu IbTx; n - broj segmenata).

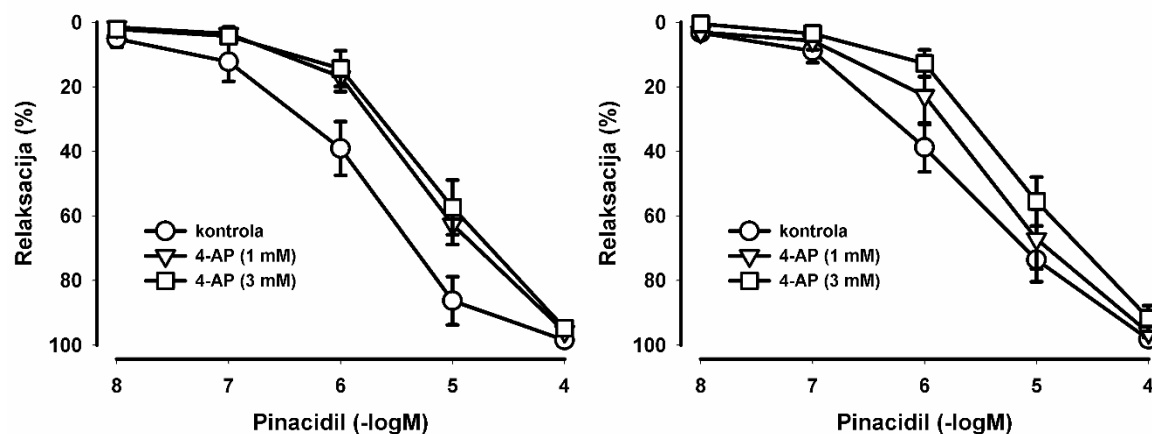
Tabela 7. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane vene safene u prisustvu antagonista iberiotoksina. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata bez i sa dijabetes melitusa tipa 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu visoko selektivnog blokatora za BK_{Ca} kanale, iberiotoksina.

HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.98 ± 0.14	98.66 ± 0.67	5.98 ± 0.07	99.52 ± 0.35
IbTx ($0.1 \mu M$)	6.08 ± 0.12	99.53 ± 0.30	5.77 ± 0.11	99.17 ± 0.42

HVS – humana vena safena; IbTx – iberiotoksin; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5 - 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu IbTx; n - broj segmenata.

Uticaj 4-AP, nespecifičnog blokatora Kv kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

4-aminopiridin (4-AP), koji predominantno blokira Kv kanale, inhibira vazorelaksantno dejstvo pinacidila na humanu izolovanu venu safenu NDM pacijenata (Slika 16 levo). Uočena statistički značajna inhibicija je potvrđena primenom 4-AP u dve različite koncentracije (1 i 3 mM) kod NDM pacijenata, bez uticaja na E_{max} vrednosti (Tabela 8). U slučaju HVS uzete od DMT2 pacijenata vazorelaksantno dejstvo pinacidila nije bilo inhibirano primenom 4-AP ni u jednoj koncentraciji (Slika 16 desno) i bez značajne promene u E_{max} (Tabela 8).



Slika 16. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu antagonist 4-aminopiridina. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μ M) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno) u prisustvu različitih koncentracija (1 i 3 mM) neselektivnog blokatora Kv kanala, 4-aminopiridina (4-AP). Tačke na graficima (krugovi, trouglovi i kvadrati) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 10 - 12$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu 4-AP; n - broj segmenata).

Tabela 8. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane vene safene u prisustvu antagonist 4-aminopiridina. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata bez i sa dijabetes melitusa tipa 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu specifičnog antagonist za Kv kanale, 4-aminopiridina.

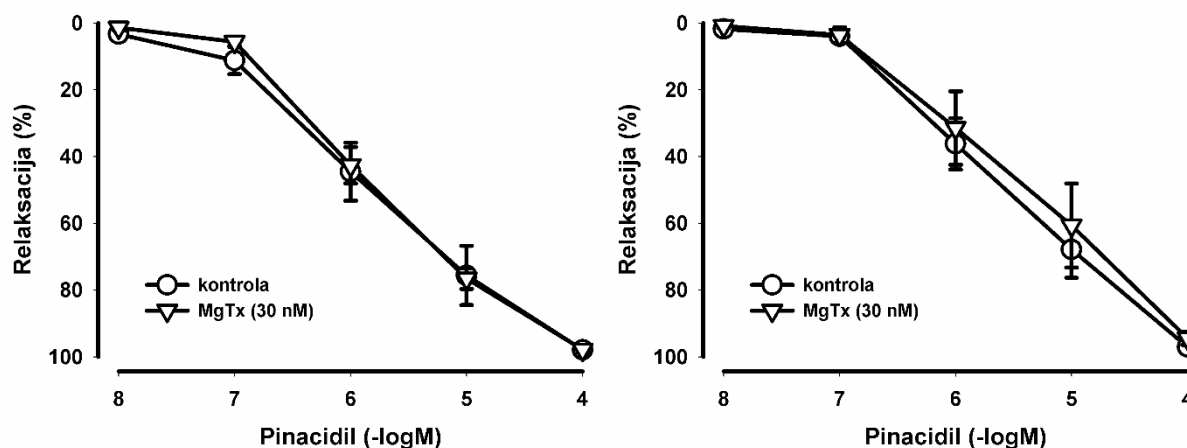
HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.96 ± 0.18	98.62 ± 1.37	5.94 ± 0.15	98.90 ± 0.52
4-AP (1 mM)	$5.43 \pm 0.11^*$	95.83 ± 0.93	5.53 ± 0.19	96.17 ± 1.48
kontrola	5.92 ± 0.16	98.37 ± 0.78	5.62 ± 0.12	97.55 ± 1.05
4-AP (3 mM)	$5.33 \pm 0.17^*$	94.82 ± 1.23	5.22 ± 0.16	91.75 ± 3.92

* $p < 0.05$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; 4-AP – 4-aminopiridin; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do

relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 4 - 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu 4-AP; n - broj segmenata.

Uticaj MgTx, selektivnog blokatora $K_v1.3$ kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Margatoksin (MgTx), selektivni blokator $K_v1.3$ kanala primenjen u koncentraciji od 30 nM ne utiče na relaksaciju venskog krvnog suda koju izaziva pinacidil niti na maksimalnu efikasnost pinacidila ni u jednoj od eksperimentalnih grupa (Slika 17, Tabela 9).



Slika 17. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu antagoniste margatoksina. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μ M) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno) u prisustvu selektivnog blokatora $K_v1.3$ kanala, margatoksina (MgTx, 30 nM). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 5 - 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu MgTx; n - broj segmenata).

Tabela 9. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane vene safene u prisustvu antagoniste margatoksina. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata bez i sa dijabetes melitusa tipa 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu specifičnog antagoniste za K_v kanale, margatoksina.

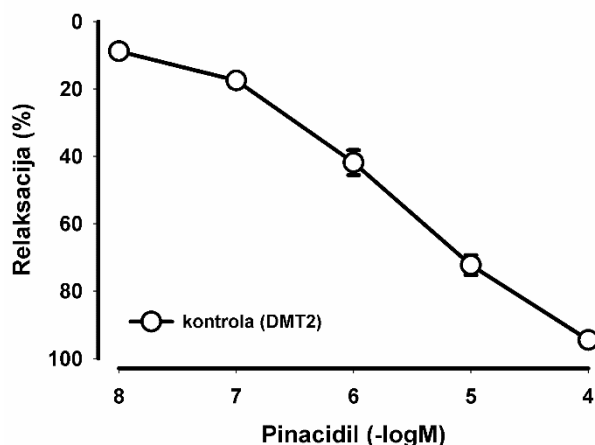
HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.85 ± 0.18	97.96 ± 0.68	5.64 ± 0.16	97.08 ± 1.89
MgTx (30 nM)	5.80 ± 0.07	97.88 ± 0.90	5.44 ± 0.27	94.52 ± 1.95

HVS – humana vena safena; MgTx – margatoksin; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5 - 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu MgTx; n - broj segmenata.

4.4. ULOGA K-KANALA U VAZODILATATORNOM DEJSTVU PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI

4.4.1. Efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2

Pinacidil (0.01 - 100 μM) je koncentracijski-zavisno relaksirao ITA bez endotela DMT2 pacijenata ($\text{pD}_2 5.86 \pm 0.1$, $n = 28$, Slika 18).



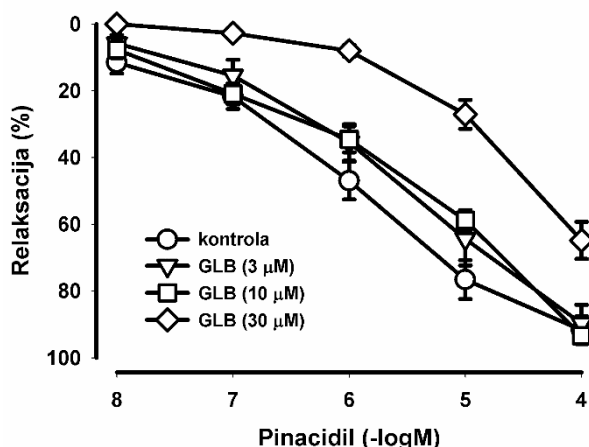
Slika 18. Relaksantni efekat pinacidila na unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Kumulativna koncentracijski-zavisna kriva za pinacidil dobijena na preparatima unutrašnje torakalne arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2), prekontrahovanim sa serotoninom (100 μM). Tačke na grafiku (krugovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM); ($n = 28$ DMT2; n - broj segmenata).

4.4.2. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2

Kao i u slučaju HVS, na izolovanim ITA bez endotela, ispitana su tri glavna tipa K-kanala: K_{ATP} , BK_{Ca} , K_{V} na efekte pinacidila koristeći različite selektivne i neselektivne blokatore K-kanala. Dati efekti su ispitani samo na uzorcima ITA dobijenim od pacijenata sa DMT2.

Uticaj GLB, selektivnog blokatora K_{ATP} kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2

Efekat pinacidila na izolovanoj ITA DMT2 pacijenata u prisustvu selektivnog blokator K_{ATP} kanala, glibenklaimda, ispitivan je u prisustvu 3 različite koncentracije GLB (3, 10 i 30 μM). I dok u nižim koncentracijama (3 i 10 μM) ne postoji statistički značajna inhibicija vazorelaksacije blokiranjem ovih kanala, pri višoj koncentraciji (30 μM) statistički značajno je inhibiran efekat pinacidila i koncentracijski-zavisna kriva u prisustvu GLB je značajno pomeren u desno (Slika 19, Tabela 10).



Slika 19. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu antagonistice glibenklamida. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu serotoninom (100 μM) na segmentima humane unutrašnje torakalne arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u prisustvu različitih koncentracija (3, 10 i 30 μM) selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (GLB). Tačke na graficima (krugovi, trouglovi, kvadrati i rombovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 12$ za kontrolu i $n = 6 - 7$ u prisustvu GLB; n - broj segmenata).

Prisustvo GLB u koncentracijama od 3 i 10 μM ne utiče na maksimalnu efikasnost pinacidila, dok je u prisustvu 30 μM GLB E_{max} pinacidila bila visoko statistički značajno inhibirana (Tabela 10).

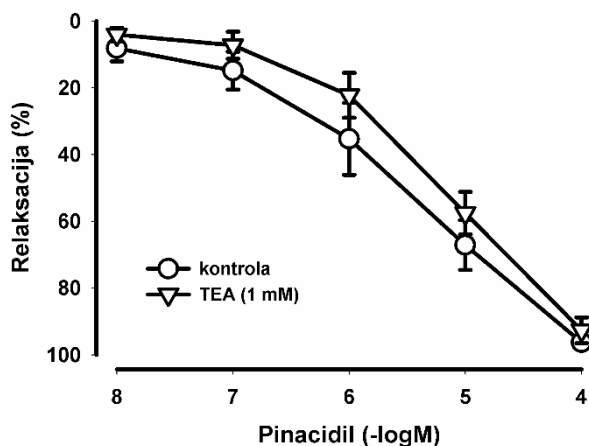
Tabela 10. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu antagonistice glibenklamida. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane unutrašnje torakalne arterije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu specifičnog antagonistice za K_{ATP} kanale, glibenklamida.

ITA	DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.75 ± 0.50	90.47 ± 9.53
GLB (3 μM)	5.53 ± 0.30	89.76 ± 5.64
kontrola	6.08 ± 0.37	89.18 ± 7.24
GLB (10 μM)	5.67 ± 0.10	93.45 ± 2.05
kontrola	5.81 ± 0.10	98.03 ± 1.97
GLB (30 μM)	$3.88 \pm 0.36^*$	$64.84 \pm 5.55^{**}$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); ITA – humana unutrašnja torakalna arterija; GLB – glibenklamid; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 3 - 6$ za kontrole i $n = 6 - 7$ u prisustvu GLB; n - broj segmenata.

Uticaj TEA, neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2

Tetraetilamonijum (TEA, 1 mM), predominantni blokator K_{Ca} kanala iako je doveo do pomeranja koncentracijski-zavisne krive u desno (Slika 20), nije proizveo promene u efektima pinacidila niti promene u E_{max} koje su statistički značajne (Tabela 11).



Slika 20. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu antagoniste tetraetilamonijuma. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu serotoninom ($100 \mu\text{M}$) na segmentima humane unutrašnje torakalne arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u prisustvu neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma (TEA, 1 mM). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 5$ za kontrolu i $n = 6$ u prisustvu TEA; n - broj segmenata).

Tabela 11. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu blokatora tetraetilamonijuma. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane unutrašnje torakalne arterije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu neselektivnog blokatora za K_{Ca} kanale, tetraetilamonijuma.

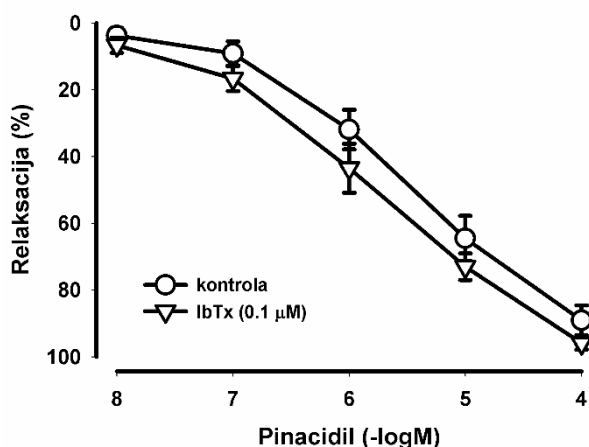
ITA	DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.77 ± 0.25	96.28 ± 1.63
TEA (1 mM)	5.40 ± 0.20	92.68 ± 3.87

ITA – humana unutrašnja torakalna arterija; TEA – tetraetilamonijum; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu TEA; n - broj segmenata.

Uticaj IbTx, specifičnog blokatora BK_{Ca} kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2

Iberiotoksin (IbTx, $0.1 \mu\text{M}$) je visoko selektivni blokator BK_{Ca} kanala, koji je doveo do blagogo pomeranja koncentracijski-zavisne krive u des, ali ipak nije inhibirao vazodilatatorni efekat

pinacidila na izolovanom arterijskom krvnom sudu od DMT2 pacijenata (Slika 21), ne utičući ni na značajnu promenu u E_{max} (Tabela 12).



Slika 21. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu antagoniste iberiotoksina. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu serotoninom ($100 \mu\text{M}$) na segmentima humane unutrašnje torakalne arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u prisustvu selektivnog blokatora BK_{Ca} kanala, iberiotoksina (IbTx, $0.1 \mu\text{M}$). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 5$ za kontrolu i $n = 6$ u prisustvu IbTx; n - broj segmenata).

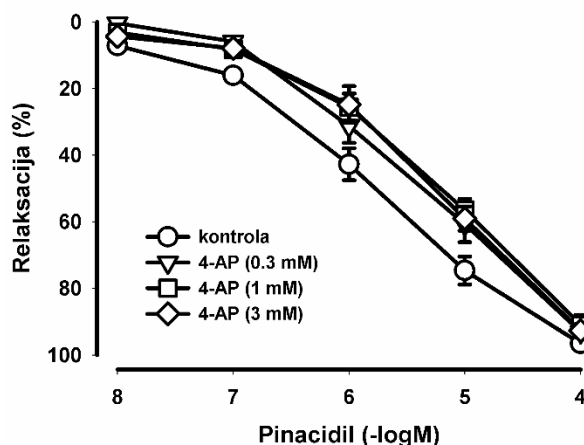
Tabela 12. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu blokatora iberiotoksina. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane unutrašnje torakalne arterije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu selektivnog blokatora za BK_{Ca} kanale, iberiotoksina.

ITA	DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.51 ± 0.19	89.08 ± 4.46
IbTx ($0.1 \mu\text{M}$)	5.88 ± 0.15	95.93 ± 1.95

ITA – humana unutrašnja torakalna arterija; IbTx – iberiotoksin; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu IbTx; n - broj segmenata.

Uticaj 4-AP, neselektivnog blokatora K_V kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2

4-aminopiridin (4-AP) primenjen u koncentraciji od 0.3 mM ($n = 6$) ne utiče na relaksaciju ITA koju izaziva pinacidil (Slika 22). Kada se 4-AP primeni u većim koncentracijama (1 i 3 mM , $n = 6$ po grupi), postoji statistički značajna razlika ($P < 0.05$) između EC_{50} vrednosti pinacidila u kontrolnoj grupi eksperimenata i grupi u kojoj je prisutan 4-AP (Tabela 13). Prisustvo 4-AP je jedino u koncentraciji od 3 mM uticao na maksimalnu efikasnost pinacidila (Tabela 13).



Slika 22. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu antagonist 4-aminopiridina. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu serotoninom (100 μ M) na segmentima humane unutrašnje torakalne arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u prisustvu različitih koncentracija (0.3, 1 i 3 mM) neselektivnog blokatora K_v kanala, 4-aminopiridina (4-AP). Tačke na graficima (krugovi, trouglovi, kvadrati i rombovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 14$ za kontrolu i $n = 6$ u prisustvu 4-AP; n - broj segmenata).

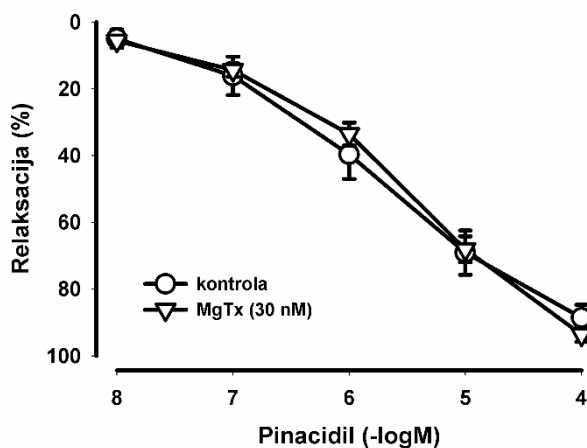
Tabela 13. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu antagonist 4-aminopiridina. Efekat pinacidila na prekontraheovane segmente humane unutrašnje torakalne arterije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu specifičnog antagonist za K_v kanale, 4-aminopiridina.

ITA	DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.74 ± 0.07	92.70 ± 3.54
4-AP (0.3 mM)	5.50 ± 0.08	93.10 ± 1.58
kontrola	5.87 ± 0.18	96.86 ± 1.94
4-AP (1 mM)	$5.39 \pm 0.09^*$	90.93 ± 3.01
kontrola	6.00 ± 0.16	99.36 ± 0.64
4-AP (3 mM)	$5.46 \pm 0.10^*$	$92.73 \pm 1.99^*$

* $p < 0.05$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); ITA – humana unutrašnja torakalna arterija; 4-AP – 4-aminopiridina; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 4 - 5$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu 4-AP; n - broj segmenata.

Uticaj MgTx, selektivnog blokatora Kv1.3 kanala na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa DMT2

Margatoksin (MgTx, 30 nM), selektivni inhibitor Kv1.3 kanala nije antagonizovao efekte pinacidila, niti imao statistički značajan uticaj na E_{max} vrednosti pinacidila (Slika 23, Tabela 14).



Slika 23. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu antagonistice margatoksina. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu serotoninom ($100 \mu\text{M}$) na segmentima humane unutrašnje torakalne arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u prisustvu selektivnog blokatora Kv1.3 kanala, margatoksina (MgTx, 30 nM). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 7$ za kontrolu i $n = 7$ u prisustvu MgTx; n - broj segmenata).

Tabela 14. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu antagonistice margatoksina. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane unutrašnje torakalne arterije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu selektivnog antagonistice za Kv1.3 kanale, margatoksina.

ITA	DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.69 ± 0.23	88.60 ± 3.88
MgTx (30 nM)	5.68 ± 0.10	93.69 ± 2.14

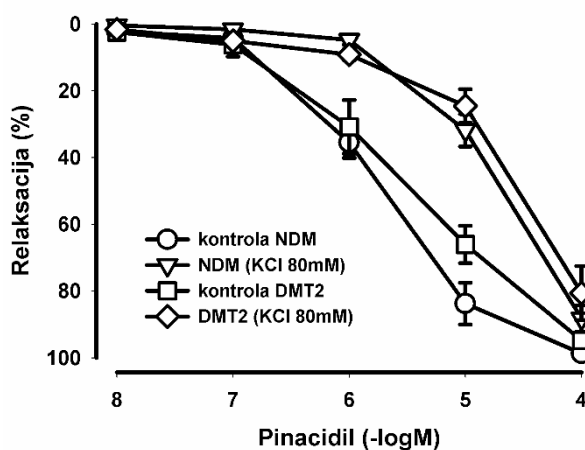
ITA – humana unutrašnja torakalna arterija; MgTx – margatoksin; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 7$ za kontrole i $n = 7$ u prisustvu MgTx; n - broj segmenata.

4.5. KALIJUM-NEZAVISNI EFEKAT PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI PACIJENATA SA I BEZ DMT2

U sledećim serijama eksperimenata hteli smo da detaljnije ispitamo potencijalni kalijum-nezavisni efekat pinacidila, jer je prethodnom aplikacijom različitih blokatora K-kanala uočeno da E_{max} u prisustvu istih nikada nije potpuno blokirana što bi potencijalno ukazalo na moguće druge mehanizme dejstva pinacidila koji ne uključuju K-kanale.

4.5.1. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Pinacidil (0.01 - 100 μ M) dovodi do koncentracijski-zavisne relaksacije izolovane humane vene safene bez endotela koja je prethodno bila kontrahovana pomoću rastvora koji sadrži 80 mM KCl u obe eksperimentalne grupe pacijenata, sa i bez DMT2 (Slika 24). Kada se efekti pinacidila dobijeni na HVS prekontrahovanoj sa rastvorom koji sadrži 80 mM KCl uporede sa onima koji se dobijaju kada se tonična kontrakcija proizvede sa FE (kontrola, 100 μ M) (Slika 24) dobijene EC_{50} vrednosti se visoko statistički značajno razlikuju i kod NDM i kod DMT2 grupe ($P < 0.01$ obe) (Tabela 15). Maksimalna efikasnost pinacidila je bila statistički značajno različita u obe grupe ($P < 0.05$) (Tabela 15).



Slika 24. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma (KCl, 80 mM) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2). Kontrolna kriva predstavlja relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (kontrola, 100 μ M). Tačke na graficima (krugovi, trouglovi, kvadrati i rombovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 5$ za kontrolu i $n = 6$ u prisustvu KCl; n - broj segmenata).

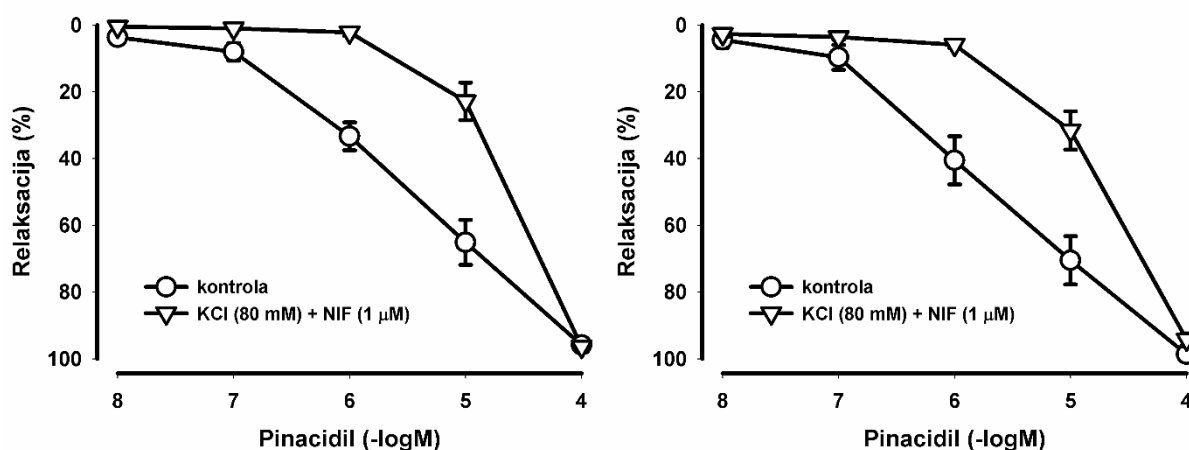
Tabela 15. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma na efekat pinacidila na izolovanim preparatima humane vene safene. Efekat pinacidila na relaksaciju segmenata humane vene safene pacijenata bez i sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom K^+ .

HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.81 ± 0.07	98.72 ± 1.09	5.60 ± 0.15	94.84 ± 1.80
KCl (80 mM)	$4.76 \pm 0.17^{**}$	$88.25 \pm 3.94^*$	$4.37 \pm 0.93^{**}$	$80.63 \pm 8.10^*$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu visoke koncentracije KCl; n - broj segmenata.

4.5.2. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa nifedipinom na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Kombinacija nifedipina (NIF, 1 μM), blokatora voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, sa rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma (KCl, 80 mM) je visoko statistički značajno inhibirao efekte pinacidila ($p < 0.01$) kod obe grupe pacijenata bez uticaja na E_{max} (Slika 25, Tabela 16).



Slika 25. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa blokatorom nifedipinom. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma (KCl, 80 mM) u kombinaciji sa blokatorom voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, nifedipinom (NIF), na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno). Kontrolna kriva predstavlja relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μM). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 5$ za kontrolu i $n = 6$ u prisustvu KCl + NIF; n - broj segmenata).

Tabela 16. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa blokatorom nifedipinom na efekat pinacidila na izolovanim preparatima humane vene safene. Efekat pinacidila na relaksaciju segmenata humane vene safene pacijenata bez i sa dijabetes

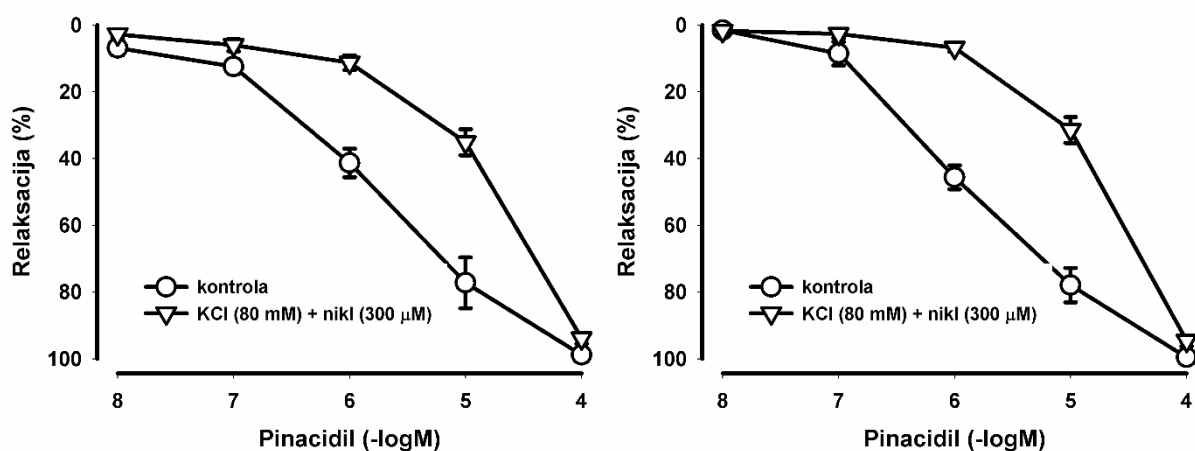
melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa antagonistom voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, nifedipinom.

HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.62 ± 0.11	95.88 ± 2.14	5.79 ± 0.16	98.66 ± 0.99
KCl (80 mM) + NIF (1 μ M)	$4.80 \pm 0.09^{**}$	96.37 ± 0.71	$4.92 \pm 0.10^{**}$	94.27 ± 1.91

**** $p < 0.01$** ; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; NIF – nifedipin; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu visoke koncentracije KCl + NIF; n - broj segmenata.

4.5.3. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa niklom na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Kombinacija nikla (300 μ M), inhibitora natrijum/kalcijum (Na^+/Ca^{2+}) pumpe, sa rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma (KCl, 80 mM) je visoko statistički značajno inhibirao efekte pinacidila ($P < 0.01$) kod obe grupe pacijenata bez uticaja na E_{max} (Slika 26, Tabela 17).



Slika 26. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa antagonistom niklom. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma (KCl, 80 mM) u kombinaciji sa inhibitorom natrijum/kalcijum (Na^+/Ca^{2+}) pumpe, niklom, na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno). Kontrolna kriva predstavlja relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μ M). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 5 - 6$ za kontrolu i $n = 6$ u prisustvu KCl + nikl; n - broj segmenata).

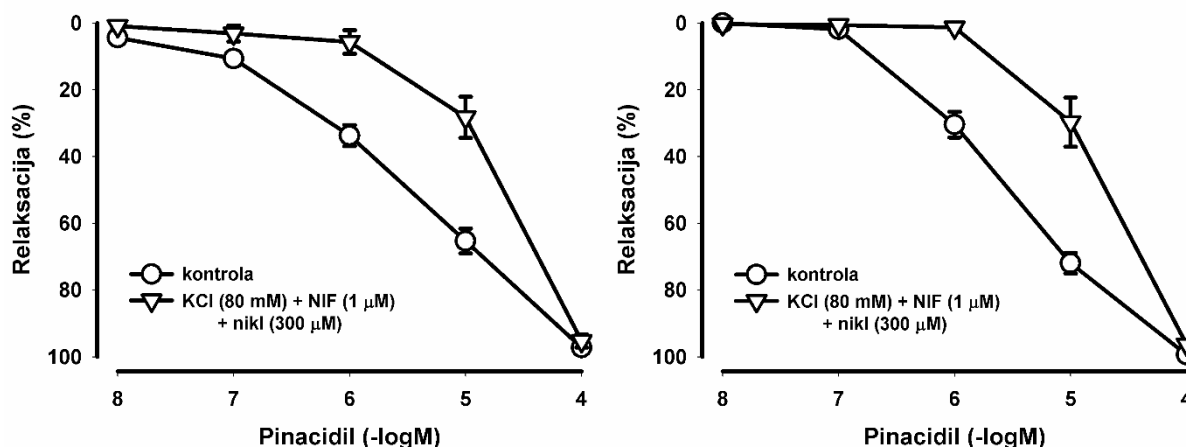
Tabela 17. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa blokatorom niklom na efekat pinacidila na izolovanim preparatima humane vene safene. Efekat pinacidila na relaksaciju segmenata humane vene safene pacijenata bez i sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa inhibitorom natrijum/kalcijum ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) pumpe, niklom.

HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.88 ± 0.11	98.87 ± 0.78	5.87 ± 0.09	98.66 ± 0.99
KCl (80 mM) + nikl (300 μM)	$5.04 \pm 0.07^{**}$	$93.87 \pm 1.60^*$	$4.93 \pm 0.07^{**}$	$94.27 \pm 1.91^*$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5 - 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu visoke koncentracije KCl + nikl; n - broj segmenata.

4.5.4. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa nifedipinom i niklom na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Kombinacija nifedipina (NIF, 1 μM), blokatora voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa i nikla (300 μM), inhibitora natrijum/kalcijum ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) pumpe, sa rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma (KCl, 80 mM) je statistički značajno inhibirao efekte pinacidila ($P < 0.05$) (Slika 27, Tabela 18).



Slika 27. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa blokatorima nifedipinom i niklom. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma (KCl, 80 mM) u kombinaciji sa blokatorom voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, nifedipinom (NIF), i inhibitorom natrijum/kalcijum ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) pumpe, niklom, na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno). Kontrolna kriva predstavlja relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μM). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 4$ za kontrolu i $n = 5 - 6$ u prisustvu KCl + NIF + nikl; n - broj segmenata).

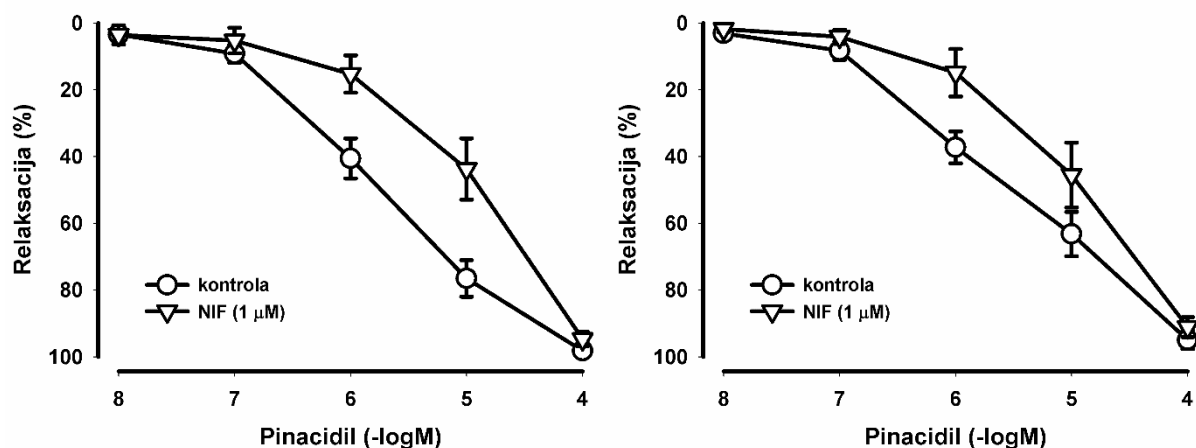
Tabela 18. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma u kombinaciji sa blokatorima nifedipinom i niklom na efekat pinacidila na izolovanim preparatima humane vene safene. Efekat pinacidila na relaksaciju segmenata humane vene safene pacijenata bez i sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom KCl u kombinaciji sa antagonistom voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, nifedipinom i inhibitorom natrijum/kalcijum ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) pumpe, niklom.

HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.68 ± 0.08	97.27 ± 1.28	5.65 ± 0.04	99.40 ± 0.60
KCl (80 mM) + NIF (1 μM) + nikl (300 μM)	$4.89 \pm 0.15^*$	95.26 ± 1.96	$4.88 \pm 0.11^*$	$96.38 \pm 0.76^*$

* $p < 0.05$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; NIF – nifedipin; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 4$ za kontrole i $n = 5 - 6$ u prisustvu visoke koncentracije KCl + NIF + nikl; n - broj segmenata.

4.5.5. Uticaj nifedipina, blokatora voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Blokator voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, nifedipin (NIF, 1 μM), doveo je do pomeranja koncentracijski-zavisnih kriva pinacidila u desno kod obe grupe pacijenata (Slika 28). Ovo pomeranje je bilo statistički značajno na HVS NDM pacijenata ($P < 0.05$). Ni u jednoj od grupa promene u E_{max} vrednostima nisu bile značajne (Tabela 19).



Slika 28. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu blokatora nifedipina. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μM) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno) u prisustvu blokatora voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, nifedipina (NIF, 1 μM). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu NIF; n - broj segmenata).

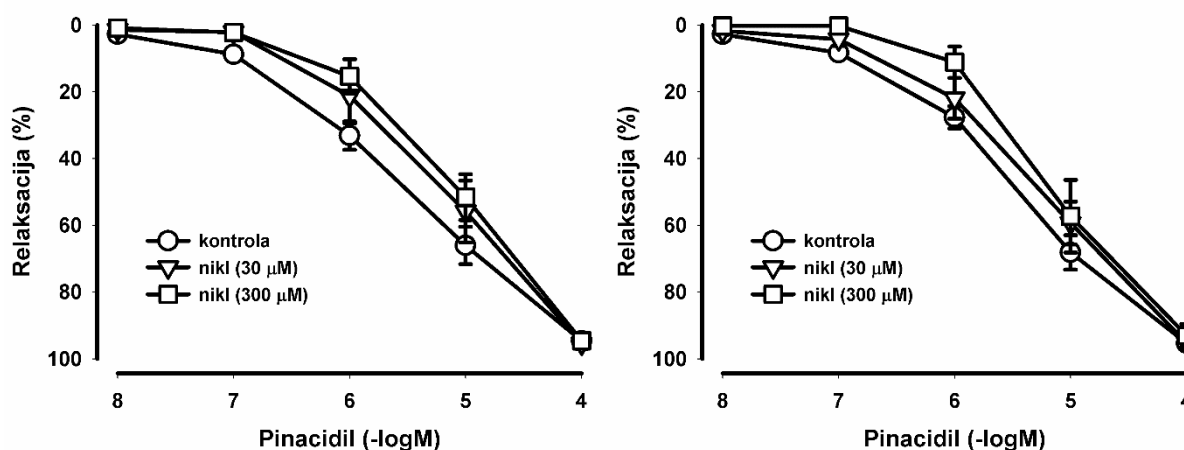
Tabela 19. Uticaj pinacidila na relaksaciju humane vene safene u prisustvu blokatora nifedipina. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata bez i sa dijabetes melitusa tipa 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu antagoniste voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, nifedipina.

HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.82 ± 0.09	98.22 ± 0.74	5.61 ± 0.14	94.95 ± 2.67
NIF (1 μM)	$5.17 \pm 0.24^*$	94.70 ± 2.12	5.10 ± 0.23	91.12 ± 2.96

* $p < 0.05$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; NIF – nifedipin; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu NIF; n - broj segmenata.

4.5.6. Uticaj nikla, inhibitora Na^+/Ca^{2+} pumpe na efekat pinacidila na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa i bez DMT2

Prisustvo nikla, inhibitora Na^+/Ca^{2+} pumpe, ispitano sa dve različite koncentracije od 30 i 300 μM nije antagonizovalo efekte pinacidila na toničnu kontrakciju izolovane HVS pacijenata sa i bez DMT2 (Slika 29), niti je suprimiralo maksimalni relaksantni odgovor na pinacidil ni u jednoj od grupa (Tabela 20).



Slika 29. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu blokatora nikla. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μM) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM, slika levo) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2, slika desno) u prisustvu različitih koncentracija inhibitora natrijum/kalcijum (Na^+/Ca^{2+}) pumpe, niklom (30 i 300 μM). Tačke na graficima (krugovi, trouglovi i kvadrati) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 10 - 12$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu nikla; n - broj segmenata).

Tabela 20. Uticaj pinacidila na humane vene safene u prisustvu antagoniste nikla. Efekat pinacidila na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata bez i sa dijabetes

melitusa tipa 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu inhibitora natrijum/kalcijum ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) pumpe, nikla.

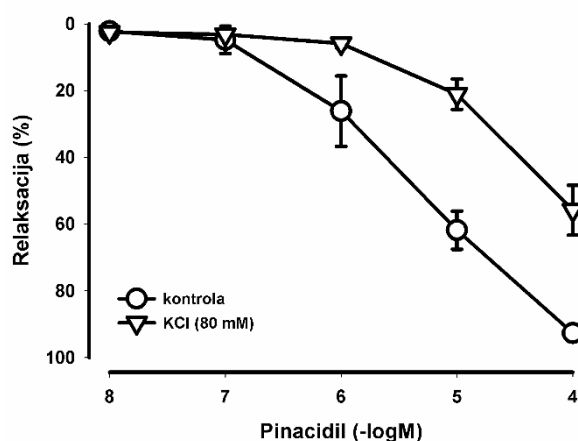
HVS	NDM		DMT2	
	$\text{pD}_2 \pm \text{SEM}$	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SEM}$	$\text{pD}_2 \pm \text{SEM}$	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SEM}$
kontrola	5.59 ± 0.13	95.88 ± 2.63	5.63 ± 0.14	96.62 ± 1.63
nikl (30 μM)	5.34 ± 0.20	95.40 ± 1.69	5.42 ± 0.15	95.32 ± 1.52
kontrola	5.62 ± 0.16	93.42 ± 2.81	5.55 ± 0.15	94.10 ± 2.62
nikl (300 μM)	5.27 ± 0.11	94.60 ± 2.09	5.19 ± 0.24	93.03 ± 3.42

HVS – humana vena safena; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $\text{pD}_2 = -\log(\text{EC}_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5 - 6$ za kontrole i $n = 6$ u prisustvu nikla; n - broj segmenata.

4.6. KALIJUM-NEZAVISNI EFEKAT PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI PACIJENATA SA DMT2

Kalijum-nezavisni efekat pinacidila na toničnu kontrakciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa DMT2

Pinacidil (0.01 – 100 μM) dovodi do koncentracijski-zavisne relaksacije humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa DMT2 bez endotela koja je prethodno bila prekontrahovana pomoću rastvora sa visokom koncentracijom K^+ (Slika 30). Efekti pinacidila i maksimalna relaksacija su statistički značajno inhibirani u prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma ($P < 0.05$), u poređenju sa kontrolnom krivom gde je tonična kontrakcija izazvana serotoninom (5-HT, 100 μM) (Tabela 21).



Slika 30. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma. Relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma (KCl, 80 mM) na segmentima humane unutrašnje torakalne arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2). Kontrolna kriva predstavlja relaksantni efekat pinacidila na kontrakciju izazvanu serotoninom (100 μM). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 3$ za kontrolu i $n = 7$ u prisustvu KCl; n - broj segmenata).

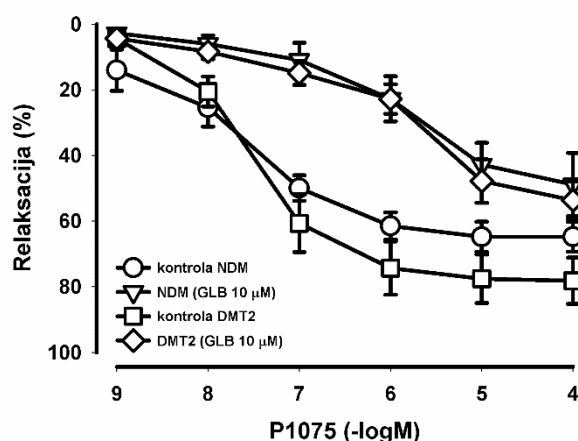
Tabela 21. Uticaj rastvora sa visokom koncentracijom jona kalijuma na efekat pinacidila na izolovanim preparatima humane unutrašnje torakalne arterije. Efekat pinacidila na relaksaciju segmenata humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u prisustvu rastvora sa visokom koncentracijom KCl.

ITA	DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	5.46 ± 0.16	92.67 ± 2.14
KCl (80 mM)	$2.98 \pm 0.56^*$	$55.81 \pm 7.48^*$

* $p < 0.05$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); ITA – humana unutrašnja torakalna arterija; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 3$ za kontrole i $n = 7$ u prisustvu visoke koncentracije KCl; n - broj segmenata.

4.7. EFEKAT P1075 NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI PACIJENATA SA I BEZ DMT2

P1075 (0.001 - 100 μM) je koncentracijski-zavisno relaksirao HVS NDM pacijenata ($n = 11$) i pacijenata sa DMT2 ($n = 15$). Nije bilo statistički značajne razlike između pD_2 vrednosti (6.47 ± 0.40 za NDM vs. 6.34 ± 0.27 za DMT2, $P > 0.05$), a maksimalne relaksacije (E_{max}) nakon primene najveće koncentracije P1075 bile su približne ($66.40 \pm 3.30\%$ za NDM vs. $74.96 \pm 4.06\%$ za DMT2, $P > 0.05$). Primena glibenklamida (GLB), selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, u koncentraciji od 10 μM , statistički značajno inhibira koncentracijski-zavisne krive P1075 ($P < 0.05$ kod HVS NDM vs. $P < 0.01$ kod HVS DMT2). Maksimalna vazodilatacija P1075 na HVS NDM pacijenata nije bila suprimirana, dok je E_{max} na HVS DMT2 pacijenata bio statistički značajno inhibiran (Slika 31, Tabela 22).



Slika 31. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za P1075 dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu antagoniste glibenklamida. Relaksantni efekat P1075 na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μM) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u prisustvu selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (GLB, 10 μM). Tačke na graficima (krugovi, trouglovi, kvadrati i rombovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 11 - 15$ za kontrole i $n = 5 - 7$ u prisustvu GLB; n - broj segmenata).

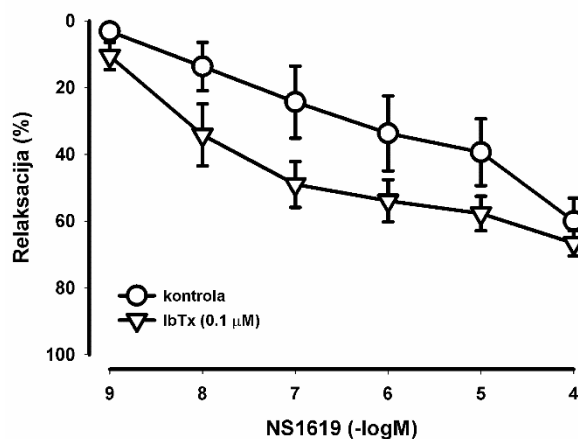
Tabela 22. Uticaj P1075 na relaksaciju humane vene safene u prisustvu antagoniste glibenklamida. Efekat P1075 na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata bez i sa dijabetes melitusa tip 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu selektivnog blokatora za K_{ATP} kanale, glibenklamida.

HVS	NDM		DMT2	
	$pD_2 \pm \text{SEM}$	$E_{\text{max}} \pm \text{SEM}$	$pD_2 \pm \text{SEM}$	$E_{\text{max}} \pm \text{SEM}$
kontrola	6.09 ± 0.38	64.80 ± 4.58	6.45 ± 0.40	78.20 ± 7.06
GLB (10 μM)	$3.02 \pm 0.99^*$	48.88 ± 9.65	$3.76 \pm 0.63^{**}$	$53.66 \pm 5.72^*$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; GLB – glibenklamid; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 5 - 6$ za kontrole i $n = 5 - 7$ u prisustvu GLB; n - broj segmenata.

4.8. EFEKAT NS1619 NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI PACIJENATA SA DMT2

NS1619 (0.001 - 100 μM), selektivni otvarač BK_{Ca} kanala je koncentracijski-zavisno relaksirao HVS pacijenata sa DMT2. Primena iberiotoksina (IbTx), selektivnog blokatora BK_{Ca} kanala, u koncentraciji od 0.1 μM , nije statistički značajno ($P > 0.05$) inhibirala koncentracijski-zavisnu krivu NS1619 niti je uticala na maksimalnu vazodilataciju primenom NS1619 u koncentraciji od 100 μM (Tabela 23) na HVS DMT2 pacijenata (Slika 32).



Slika 32. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za NS1619 dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu antagonist iberiotoksina. Relaksantni efekat NS1619 na kontrakciju izazvanu fenilefrinom (100 μM) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u prisustvu selektivnog blokatora BK_{Ca} kanala, iberiotoksina (IbTx, 0.1 μM). Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 6$ za kontrole i $n = 7$ u prisustvu IbTx; n - broj segmenata).

Tabela 23. Uticaj NS1619 na humane vene safene u prisustvu antagonist iberiotoksina. Efekat NS1619 na prekontrahovane segmente humane vene safene kod pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu visoko selektivnog blokatora za BK_{Ca} kanale, iberiotoksina.

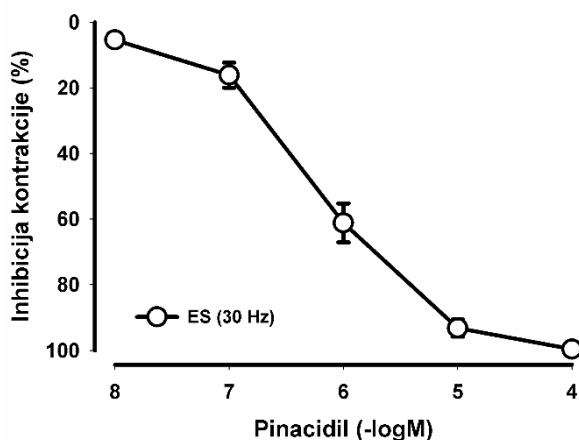
HVS	DMT2	
	$pD_2 \pm \text{SEM}$	$E_{\text{max}} \pm \text{SEM}$
kontrola	3.98 ± 0.95	60.03 ± 6.95
IbTx (0.1 μM)	6.13 ± 0.51	66.64 ± 3.80

HVS – humana vena safena; IbTx – iberiotoksin; NDM – bez dijabetes melitusa; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(\text{EC}_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna relaksacija izražena u %; $n = 6$ za kontrole i $n = 7$ u prisustvu IbTx; n - broj segmenata.

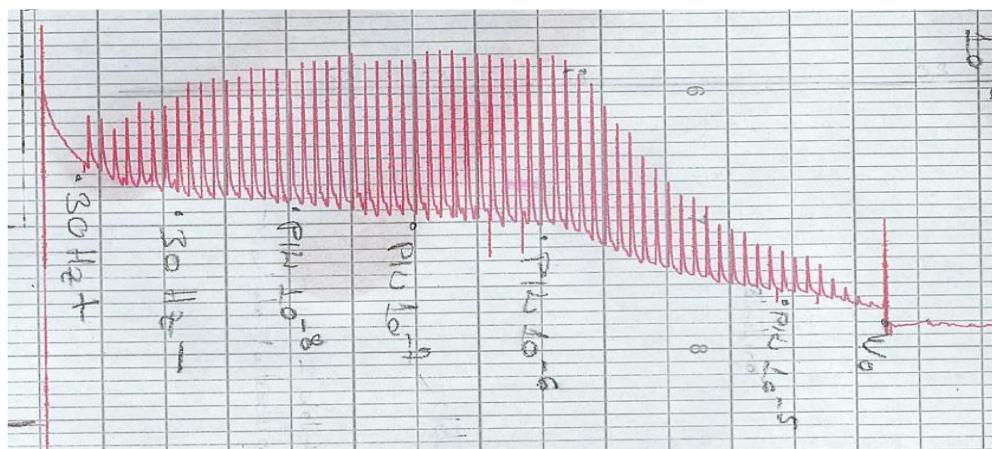
4.9. ULOGA K-KANALA U ANTIVAZOKONTRIKTORNOM DEJSTVU PINACIDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI

4.9.1. Efekat pinacidila na kontrakciju humane vene safene pacijenata sa DMT2 prouzrokovanu električnom stimulacijom

Pinacidil (0.01 - 100 μ M) je koncentracijski-zavisno relaksirao HVS bez endotela pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) kod kojih je kontrakcija bila neurogene prirode indukovana električnom stimulacijom (Slika 33). Dobijena pD_2 vrednosti je iznosila 6.27 ± 0.11 , a maksimalna inhibicija kontrakcija (E_{max}) nakon primene najveće koncentracije pinacidila je iznosila $99.61 \pm 0.39\%$. Originalni zapis eksperimenta dat je na Slici 34.



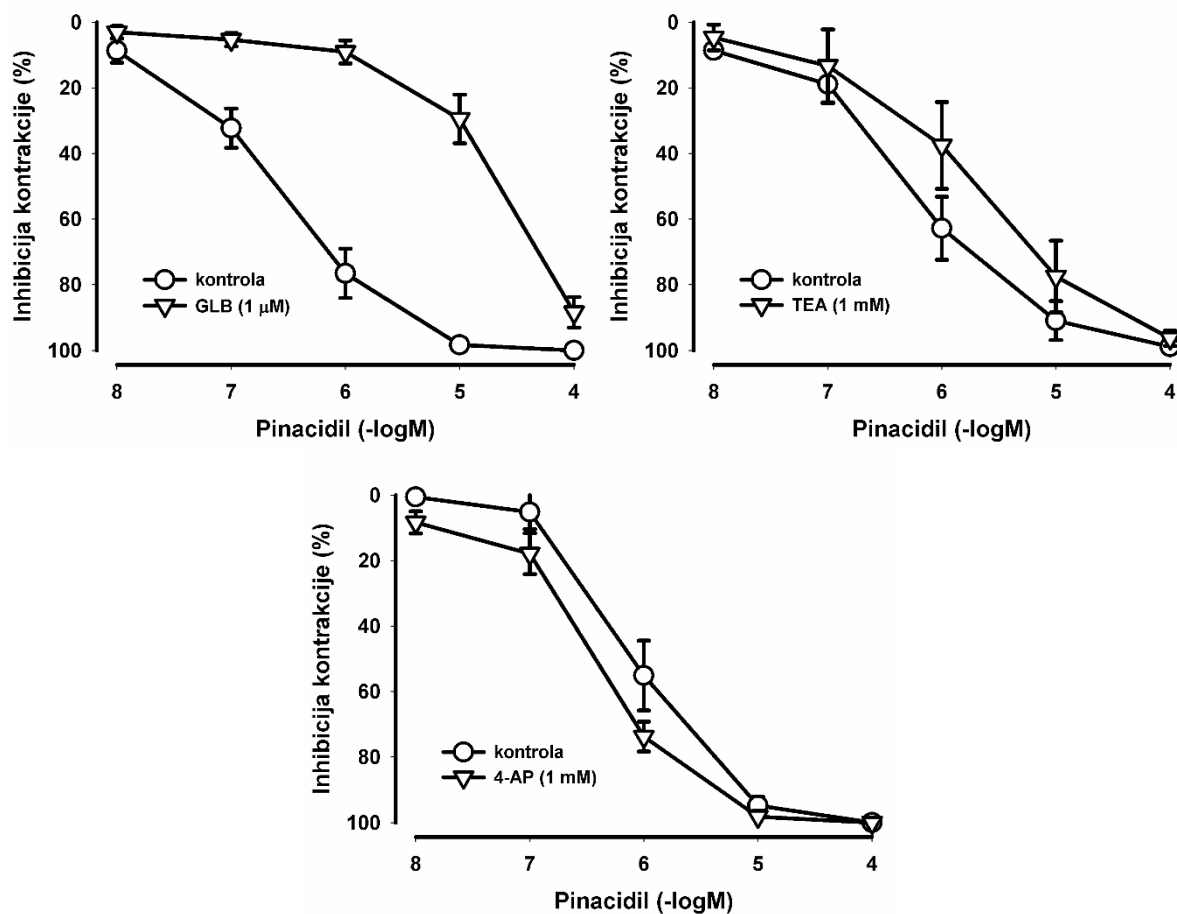
Slika 33. Antivazokonstriktorni efekat pinacidila na kontrakcije izazvane električnom stimulacijom humane vene safene. Kumulativna koncentracijski-zavisna kriva za pinacidil dobijena na preparatima humane vene safene (HVS) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2), gde su kontrakcije bile izazvane električnom stimulacijom (ES, 30 Hz). Tačke na grafiku (krugovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). (n = 17 DMT2; n - broj segmenata).



Slika 34. Originalni eksperimentalni zapis. Antivazokonstriktorni efekat pinacidila (0.01 – 10 μ M) na kontrakcije prouzrokovane električnom stimulacijom (30 Hz) na preparatima humane vene safene pacijenata sa DMT2. Na slici je dat prikaz kontrolne krive.

4.9.2. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na električnu stimulaciju humane vene safene pacijenata sa DMT2

Efekat pinacidila na izolovanoj HVS DMT2 pacijenata kod kojih su kontrakcije izazvane električnom stimulacijom (ES) ispitivan je u prisustvu selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (10 μ M), zatim u prisustvu neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma (1 mM), kao i u prisustvu neselektivnog blokatora K_v kanala, 4-aminopiridina (1 mM). U pogledu E_{max} vrednosti prisustvo blokatora nije uticalo na inhibiciju antivazokonstriktornog efekta pinacidila na ES-kontrakcije. Međutim, prisustvo GLB je statistički značajno inhibiralo antivazokonstriktorni efekat pinacidila kada su razmatrane pD_2 vrednosti, dok je u slučaju 4-AP antivazokonstriktorni efekat pinacidila bio potenciran (Slika 35, Tabela 24).



Slika 35. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za pinacidil dobijene na preparatima humane vene safene u prisustvu antagoniste glibenklamida (gore levo), tetraetilamonijuma (gore desno) i 4-aminopiridina (dole sredina). Efekat pinacidila na inhibiciju kontrakcija izazvanih električnom stimulacijom (30 Hz) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u prisustvu različitih blokatora: selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (GLB, 10 μ M, slika gore levo), neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma (TEA, 1 mM, slika gore desno), i neselektivnog blokatora K_v kanala, 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM, slika dole sredina). Efekti su izraženi kao procenat inhibicije kontrolne kontrakcije koje su uzete kao 100%. Tačke na graficima (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 4 - 6$ za kontrole i $n = 4 - 6$ u prisustvu blokatora; n - broj segmenata).

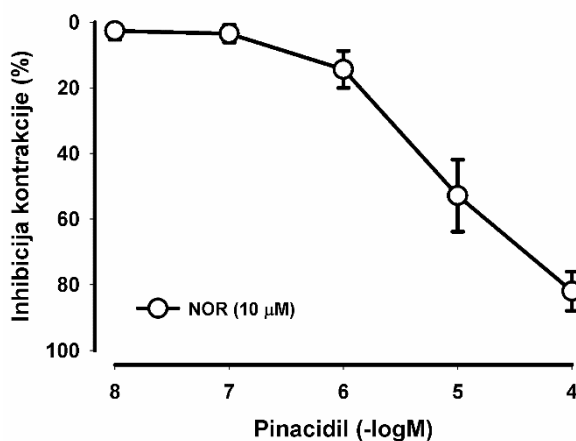
Tabela 24. Uticaj pinacidila na humanu venu safenu u prisustvu različitih antagonista: glibenklamida, tetraetilamonijuma i 4-aminopiridina. Efekat pinacidila na električnom stimulacijom kontrahovane segmente humane vene safene pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu (kontrola) i u prisustvu specifičnog antagoniste K_{ATP} kanala, glibenklamida; nespecifičnog antagoniste K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma; nespecifičnog antagoniste K_V kanala, 4-aminopiridina.

HVS	DMT2	
	$pD_2 \pm SEM$	$E_{max} \pm SEM$
kontrola	6.52 ± 0.06	100.0 ± 0.00
GLB (10 μM)	$4.77 \pm 0.26^{**}$	88.40 ± 4.66
kontrola	6.24 ± 0.16	98.88 ± 1.12
TEA (1 mM)	5.86 ± 0.35	96.32 ± 2.34
kontrola	6.05 ± 0.12	100.0 ± 0.00
4-AP (1 mM)	6.38 ± 0.09	100.0 ± 0.00

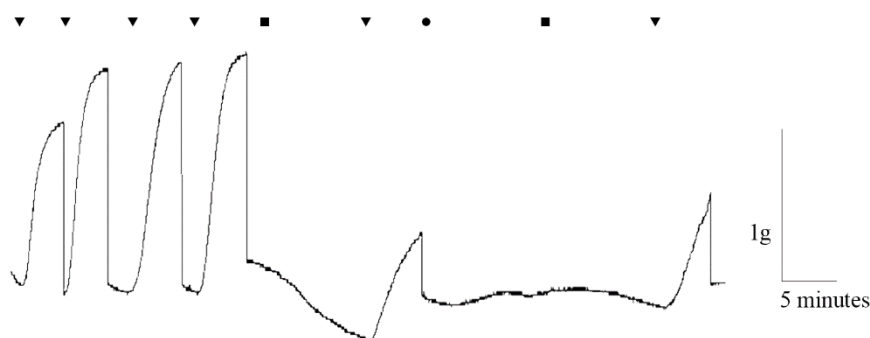
**** $p < 0.01$** ; p vrednost se odnosi na poređenje pD_2 ili E_{max} vrednosti agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućom pD_2 ili E_{max} vrednosti samog agoniste (kontrola); HVS – humana vena safena; GLB - glibenklamid; TEA – tetraetilamonijum; 4-AP – 4-aminopiridina; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $pD_2 = -\log(EC_{50})$ gde je EC_{50} – efektivna koncentracija agoniste koja dovodi do relaksacije preparata od 50% u odnosu na maksimalnu relaksaciju; E_{max} – maksimalna inhibicija kontrakcije izražena u %; $n = 4 - 6$ za kontrole i $n = 4 - 6$ u prisustvu blokatora; n - broj segmenata.

4.9.3. Efekat pinacidila na kontrakciju humane vene safene pacijenata sa DMT2 prouzrokovanu egzogenim noradrenalinom

Pinacidil (0.01 - 100 μM) je koncentracijski-zavisno relaksirao HVS bez endotela pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) kod kojih je kontrakcija bila indukovana egzogenim noradrenalinom (10 μM) (Slika 36). Dobijena pD_2 vrednosti je iznosila 4.92 ± 0.31 , a maksimalna inhibicija kontrakcije (E_{max}) nakon primene najveće koncentracije pinacidila je iznosila $81.97 \pm 5.98\%$. Na osnovu ove serije eksperimenata izračunata je EC_{70} vrednost (30 μM) koja je korišćena u sledećoj seriji eksperimenata gde je ispitivan uticaj različitih blokatora K-kanala na noradrenalinske kontrakcije. Originalni prikaz ovog tipa eksperimenta dat je na Slici 37.



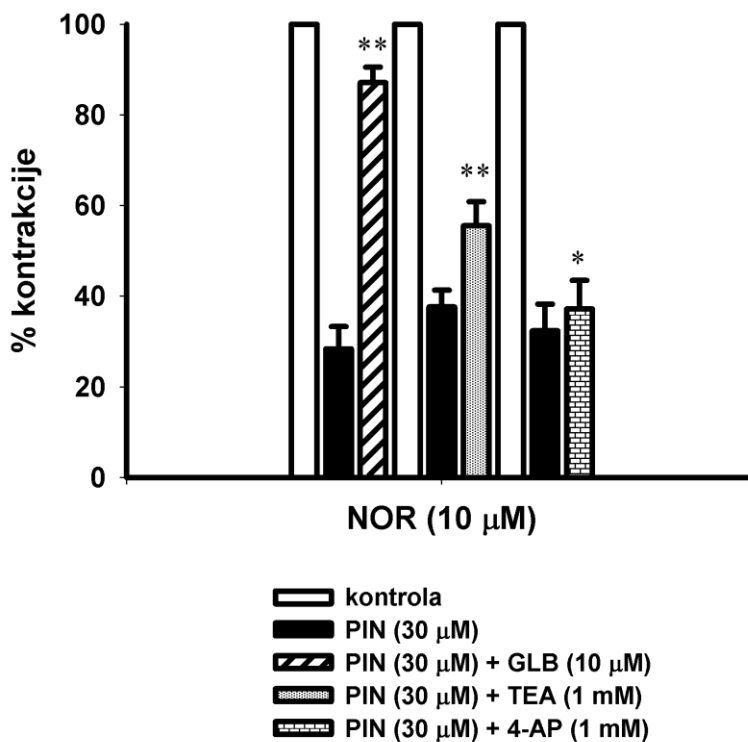
Slika 36. Antivazokonstriktorni efekat pinacidila na kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom na preparatima humane vene safene. Kumulativna koncentracijski-zavisna kriva za pinacidil dobijena na preparatima humane vene safene (HVS) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2), gde su kontrakcije bile izazvane egzogenim noradrenalinom (NOR, 10 μ M). Efekti su izraženi kao procenat inhibicije kontrolne kontrakcije koje su uzete kao 100%. Tačke na grafiku (krugovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 7$ DMT2; n - broj segmenata).



Slika 37. Originalni eksperimentalni zapis. Antivazokonstriktorni efekat pinacidila (30 μ M, kvadrat) na noradrenalinске (NA, 10 μ M, trougao) kontrakcije u prisustvu neselektivnog blokatora Kv kanala, 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM, krug) na preparatima humane vene safene pacijenata sa DMT2.

4.9.4. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na noradrenalinске kontrakcije humane vene safene pacijenata sa DMT2

Da bismo ispitali ulogu K-kanala u efektima pinacidila na inhibiciju kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom na izolovanoj HVS DMT2 pacijenata korišćena je samo jedna koncentracija pinacidila (30 μ M) koja je u kontrolnim eksperimentima dovela do inhibicije kontrakcija od 70% (EC_{70}). Uticaj različitih K-kanala ispitan je u prisustvu sledećih blokatora: selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (10 μ M), zatim u prisustvu neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma (1 mM), kao i u prisustvu neselektivnog blokatora Kv kanala, 4-aminopiridina (1 mM). U slučaju sva tri blokatora njihovo prisustvo je uticalo na efekte pinacidila dovodeći do statistički značajnog smanjenja inhibicije kontrakcija izazvanih noradrenalinom. U prisustvu GLB i TEA značajnost je iznosila $P < 0.001$, dok je u prisustvu 4-AP to bilo $P < 0.05$ (Slika 38, Tabela 25).



Slika 38. Uticaj različitih blokatora K-kanala na kontrakcije izazvane primenom egzogenog noradrenalina (10 µM) na preparatima humane vene safene u prisustvu pinacidila (30 µM). Efekat jedne koncentracije pinacidila (30 µM) na inhibiciju kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom (NOR, 10 µM) na segmentima humane vene safene (HVS) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u odsustvu, a zatim i u prisustvu različitih blokatora: selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (GLB, 10 µM), neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma (TEA, 1 mM), i neselektivnog blokatora K_v kanala, 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM). Efekti su izraženi kao % promene kontrolne kontrakcije izazvane noradrenalinom (NOR, 10 µM), koje su uzete kao 100%. Visina stubića označava srednju vrednost (osim kontrolnog stubića koji je uvek 100%), a vertikalne linije na stubićima pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 5 - 6$ DMT2; n - broj segmenata). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

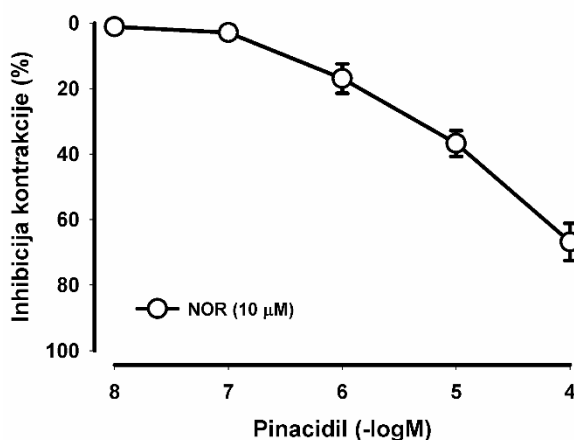
Tabela 25. Promene kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom na humanoj veni safeni u prisustvu različitih antagonista: glibenklamida, tetraetilamonijuma i 4-aminopiridina u prisustvu pinacidila. Efekat jedne koncentracije pinacidila (30 µM) na egzogenim noradrenalinom kontrahovane segmente humane vene safene pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu i u prisustvu specifičnog antagoniste K_{ATP} kanala, glibenklamida; nespecifičnog antagoniste K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma; nespecifičnog antagoniste K_v kanala, 4-aminopiridina.

HVS DMT2	Noradrenalinska kontrakcija (% promene kontrakcije) ± SEM
kontrola	100
PIN (30 μM)	71.64 ± 4.92
PIN (30 μM) + GLB (10 μM)	12.88 ± 3.41**
kontrola	100
PIN (30 μM)	62.36 ± 3.69
PIN (30 μM) + TEA (1 mM)	44.48 ± 5.32**
kontrola	100
PIN (30 μM)	67.63 ± 5.90
PIN (30 μM) + 4-AP (1 mM)	62.80 ± 6.27*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; p vrednost se odnosi na poređenje % promene kontrakcije agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućim % promene kontrakcije samog agoniste; HVS – humana vena safena; PIN – pinacidil; GLB - glibenklamid; TEA – tetraetilamonijum; 4-AP – 4-aminopiridina; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $n = 5 - 6$ za PIN i PIN + blokator; n - broj segmenata.

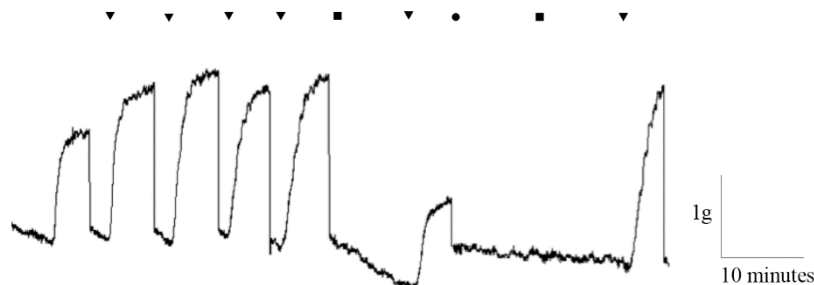
4.9.5. Efekat pinacidila na kontrakciju humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa DMT2 prouzrokovanu egzogenim noradrenalinom

Pinacidil (0.01 - 100 μM) je koncentracijski-zavisno relaksirao ITA bez endotela pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) kod kojih je kontrakcija bila indukovana egzogenim noradrenalinom (10 μM, Slika 39). Dobijena pD_2 vrednosti je iznosila 4.31 ± 0.34 , a maksimalna inhibicija kontrakcije (E_{max}) nakon primene najveće koncentracije pinacidila je iznosila $66.85 \pm 5.71\%$. Na osnovu ove serije eksperimenata izračunata je EC_{70} vrednost (100 μM) koja je korišćena u sledećoj seriji eksperimenata gde je ispitivan uticaj različitih blokatora K-kanala na noradrenalinske kontrakcije (original zapis ovog tipa eksperimenta dat je na Slici 40).



Slika 39. Antivazokonstriktorni efekat pinacidila na kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije. Kumulativna koncentracijski-zavisna kriva za pinacidil dobijena na preparatima humane unutrašnje torakalne

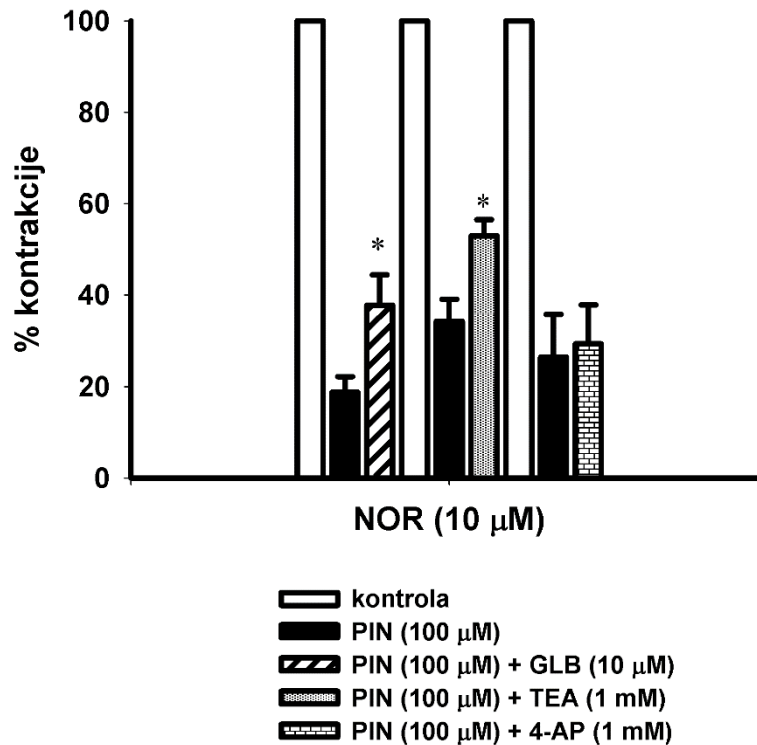
arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2), gde su kontrakcije bile izazvane egzogenim noradrenalinom (NOR, 10 μ M). Efekti su izraženi kao procenat inhibicije kontrolne kontrakcije koje su uzete kao 100%. Tačke na grafiku (krugovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 8$ DMT2; n - broj segmenata).



Slika 40. Originalni eksperimentalni zapis. Antivazokonstriktorni efekat pinacidila (30 μ M, kvadrat) na noradrenalinske (NA, 10 μ M, trougao) kontrakcije u prisustvu neselektivnog blokatora Kv kanala, 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM, krug) na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa DMT2.

4.9.6. Uticaj blokatora kalijumovih kanala na efekat pinacidila na noradrenalinske kontrakcije humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa DMT2

Da bi ispitali ulogu K-kanala u efektima pinacidila na inhibiciju kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom na izolovanoj ITA DMT2 pacijenata korišćena je samo jedna koncentracija pinacidila (100 μ M) koja je u kontrolnim eksperimentima dovela do inhibicije kontrakcija od 70% (EC_{70}). Uticaj različitih K-kanala ispitan je u prisustvu sledećih blokatora: selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (10 μ M), zatim u prisustvu neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma (1 mM), kao i u prisustvu neselektivnog blokatora Kv kanala, 4-aminopiridina (1 mM). U slučaju blokatora GLB i TEA njihovo prisustvo je uticalo na efekte pinacidila dovodeći do statistički značajnog smanjenja inhibicije kontrakcija izazvanih noradrenalinom ($P < 0.05$), dok je ovaj efekat izostao u prisustvu 4-AP (Slika 41, Tabela 26).



Slika 41. Uticaj različitih blokatora K-kanala na kontrakcije izazvane primenom egzogenog noradrenalina (10 μM) na preparatima humane unutrašnje torakalne arterije u prisustvu pinacidila (100 μM). Efekat jedne koncentracije pinacidila (100 μM) na inhibiciju kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom (NOR, 10 μM) na segmentima humane unutrašnje torakalne arterije (ITA) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2) u odsustvu, a zatim i u prisustvu različitih blokatora: selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, glibenklamida (GLB, 10 μM), neselektivnog blokatora K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma (TEA, 1 mM), i neselektivnog blokatora K_v kanala, 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM). Efekti su izraženi kao % promene kontrolne kontrakcije izazvane noradrenalinom (NOR, 10 μM), koje su uzete kao 100%. Visina stubića označava srednju vrednost (osim kontrolnog stubića koji je uvek 100%), a vertikalne linije na stubićima pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 6$ DMT2; n - broj segmenata). * $p < 0.05$;

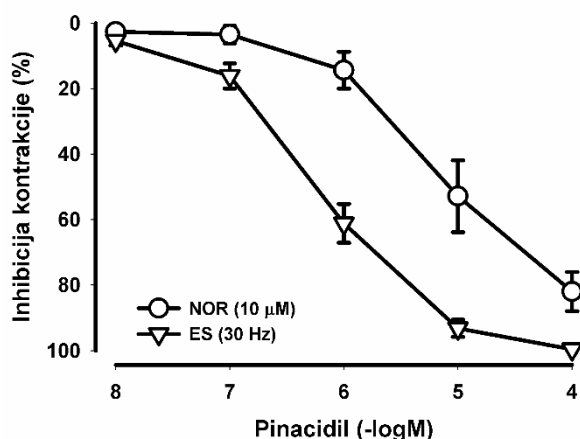
Tabela 26. Promene kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom na humanoju unutrašnjoj torakalnoj arteriji u prisustvu različitih antagonista: glibenklamida, tetraetilamonijuma i 4-aminopiridina u prisustvu pinacidila. Efekat jedne koncentracije pinacidila (100 μM) na egzogenim noradrenalinom kontrahovane segmente humane unutrašnje torakalne arterije pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 u odsustvu i u prisustvu specifičnog antagoniste K_{ATP} kanala, glibenklamida; nespecifičnog antagoniste K_{Ca} kanala, tetraetilamonijuma; nespecifičnog antagoniste K_v kanala, 4-aminopiridina.

ITA DMT2	Noradrenalinska kontrakcija (% promene kontrakcije) ± SEM
kontrola	100
PIN (100 µM)	81.27 ± 3.44
PIN (100 µM) + GLB (10 µM)	62.18 ± 6.62*
kontrola	100
PIN (100 µM)	65.70 ± 4.80
PIN (100 µM) + TEA (1 mM)	57.05 ± 3.56*
kontrola	100
PIN (100 µM)	73.57 ± 9.36
PIN (100 µM) + 4-AP (1 mM)	70.65 ± 8.51

* $p < 0.05$; p vrednost se odnosi na poređenje % promene kontrakcije agoniste u prisustvu blokatora sa odgovarajućim % promene kontrakcije samog agoniste; HVS – humana vena safena; PIN – pinacidil; GLB - glibenklamid; TEA – tetraetilamonijum; 4-AP – 4-aminopiridina; DMT2 – dijabetes melitus tip 2; SEM – greška srednje vrednosti; $n = 6$ za PIN i PIN + blokator; n - broj segmenata.

4.9.7. Uporedna analiza efekata pinacidila na neurogene i noradrenalinske kontrakcije na izolovanoj humanoj veni safeni pacijenata sa DMT2

Upoređivanjem antivazokonstriktornog efekta pinacidila na neurogene i noradrenalinske kontrakcije na preparatima humane vene safene pacijenata sa DMT2 uočava se da je pinacidil u oba slučaja dozno-zavisno inhibirao ove kontrakcije (Slika 42). Pinacidil je statistički značajno snažnije inhibirao kontrakcije izazvane električnom stimulacijom u poređenju sa egzogenim noradrenalinom (NOR: $pD_2 = 4.92 \pm 0.31$; ES: $pD_2 = 6.27 \pm 0.11$; $P < 0.001$).



Slika 42. Antivazokonstriktorni efekat pinacidila na kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom i električnom stimulacijom na preparatima humane vene safene. Kumulativna koncentracijski-zavisna kriva za pinacidil dobijena na preparatima humane vene safene (HVS) pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2), gde su kontrakcije bile izazvane egzogenim noradrenalinom (NOR, 10 µM) i električnom stimulacijom (ES, 30 Hz). Efekti su izraženi kao procenat inhibicije kontrolne kontrakcije koje su uzete kao 100%. Tačke na grafiku (krugovi i trouglovi) predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije pokazuju grešku srednje vrednosti (SEM). ($n = 7$ DMT2 za NOR i $n = 17$ DMT2 za ES; n - broj segmenata).

4.10. EKSPRESIJA RAZLIČITIH (POD)TIPOVA K-KANALA NA HUMANIM BAJPAS GRAFTOVIMA PACIJENATA SA/BEZ DIJABETES MELITUSA TIP 2

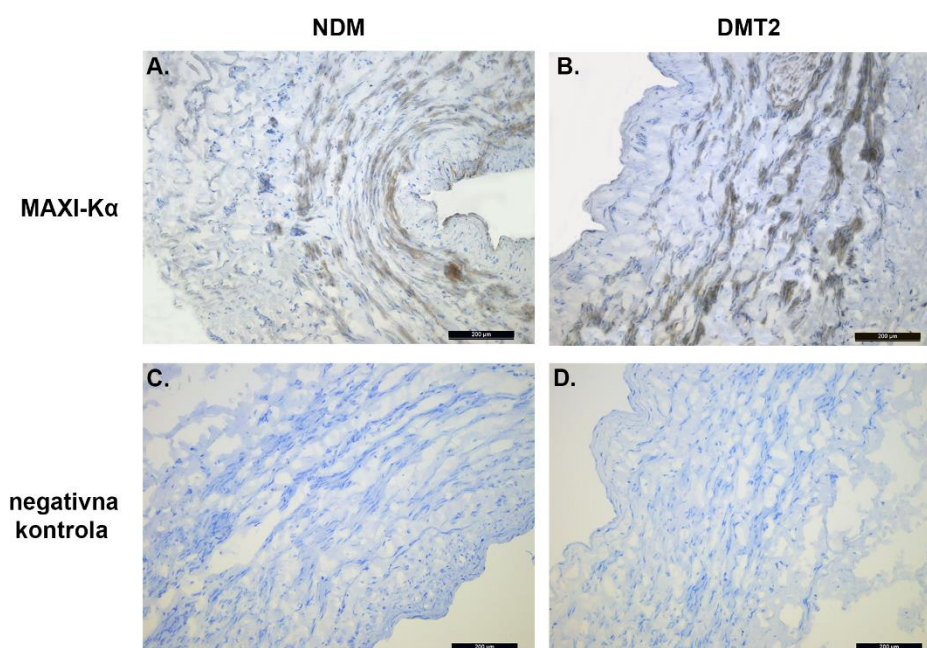
Da bismo ispitali lokalizaciju različitih subjedinica K-kanala na bajpas grafovima, izvršili smo imunohistohemijsku analizu na preparatima prethodno smrznutog tkiva. Imunohistohemijskim bojenjem i Western blot analizom detektovali smo prisutnost različitih subjedinica K_{ATP} kanala (Kir6.1, Kir6.2 i SUR2B), dok su očekivano izostale detekcije preostalih SUR subjedinica (SUR1 i SUR2A). Takođe, istim metodama detektovali smo i lokalizovali α subjedinicu BK_{Ca} kanala (MaxiK α) na humanim krvnim sudovima pacijenata sa i bez DMT2.

Dostupnim antitelima za Kv kanale (Kv1.2, Kv1.3, Kv4.2 i Kv4.3) nismo uspjeli imunohistohemijskim bojenjem, ali ni Western blotom da detektujemo nijedan od ovih kanala na bajpas preparatima pacijenata sa/bez DMT2.

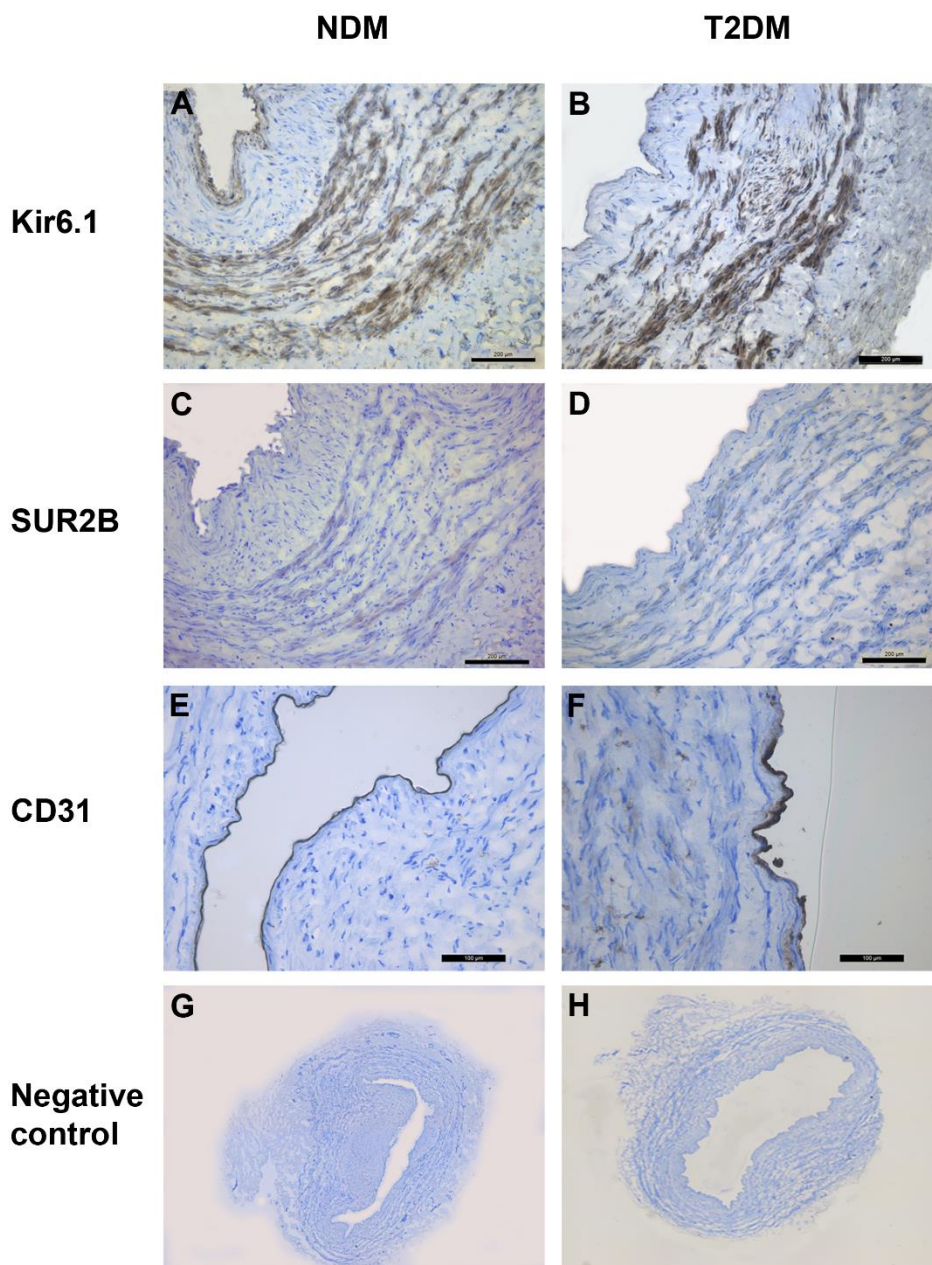
4.10.1. Identifikacija subjedinica K-kanala na humanoj veni safeni pacijenata sa/bez dijabetes melitusa tip 2 imunohistohemijskim bojenjem

Analiza subjedinica K_{ATP} kanala na HVS pokazala je da Kir6.1 subjedinica ima snažnu difuznu ekspresiju na ćelijama glatkih mišića vaskularnog zida HVS NDM i DMT2 pacijenata (Slika 43). Endotelne ćelije su, takođe, pokazale ekspresiju Kir6.1 subjedinice, koja je bila izraženija na HVS NDM pacijenata (43A i 43B). Subjedinica SUR2B pokazala je slabu ekspresiju u obe grupe pacijenata, a nedostajala je ekspresija na endotelnim ćelijama (43C i 43D). CD31 je korišćen za potvrđivanje prisustva sačuvanih endotelnih ćelija (43E i 43F). Ovaj univerzalni endotelni marker nije podjednako ekspresiran na HVS kod DMT2 pacijenata, dok je endotel HVS NDM pacijenata pokazao ujednačeniju ekspresiju. Kir6.2 subjedinica nije detektovana imunohistohemijskih bojenjem na uzorcima HVS ni kod T2DM ni kod NDM pacijenata.

Imunohistohemijska analiza subjedinice BK_{Ca} kanala, MaxiK α , na uzorcima HVS pacijenata sa/bez DMT2 ukazala je na izraženu i podjednaku ekspresiju ove subjedinice na ćelijama glatkih mišića vaskularnog zida HVS obe grupe pacijenata (Slika 44).



Slika 44. Ekspresija MaxiK α antigena na humanoj veni safeni. Ekspresija MaxiK α antigena na humanoj veni safeni (HVS) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tipa 2 (DMT2) imunohistohemijskim bojenjem. Ekspresija MaxiK α (smeđe obojenje) na ćelijama glatkih mišića (A, B); negativne kontrole (C, D). Na svim fotografijama jedra su obojena hematoksilinom (plava boja). Originalno uvećanje 100x (A-D).

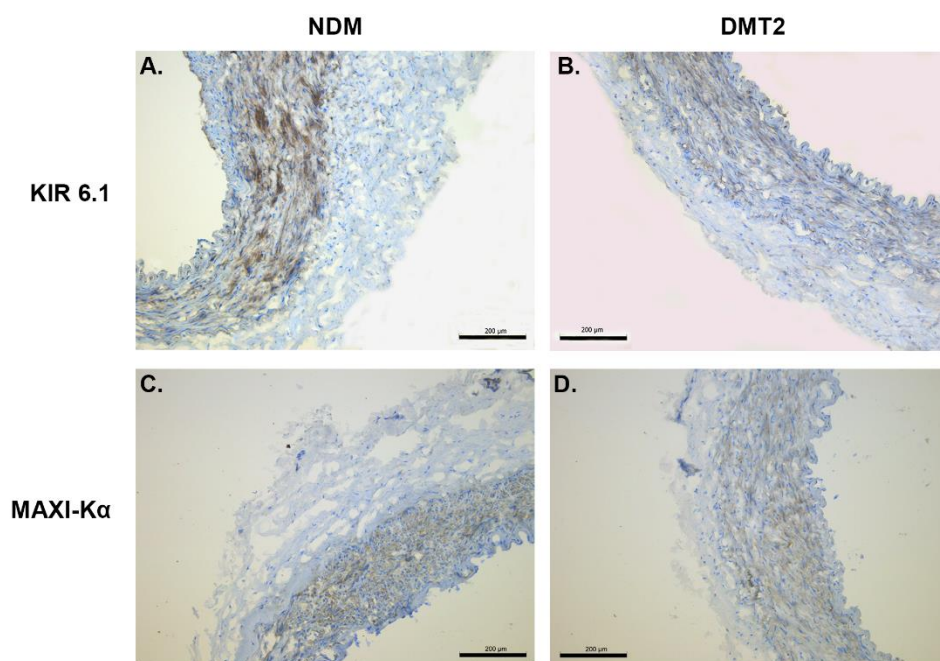


Slika 43. Ekspresija različitih antigena na humanoj veni safeni. Ekspresija različitih antigena na humanoj veni safeni (HVS) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tipa 2 (T2DM) imunohistohemijskim bojenjem. Ekspresija Kir6.1 (smeđe obojenje) na ćelijama glatkih mišića i endotela (A, B); ekspresija SUR2B (smeđe obojenje) na ćelijama glatkih mišića (C, D), ekspresija CD31 (smeđe obojenje), univerzalni marker membrane endotelne ćelije (E, F), negativne kontrole (G, H). Na svim fotografijama jedra su obojena hematoksilinom (plava boja). Originalno uvećanje 100x (A-D), 200x (E-F), 50x (G-H).

4.10.2. Identifikacija subjedinica K-kanala na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa/bez dijabetes melitusa tip 2 imunohistochemijskim bojenjem

Lokalizacija proteina SUR2B, Kir6.1 i Kir6.2 koji su subjedinice K_{ATP} kanala analizirana je i na preparatima ITA pacijenata sa/bez DMT2. Imunohistochemijskim bojenjem detektovana je snažna difuzna ekspresija Kir6.1 subjedinice na ćelijama glatkih mišića vaskularnog zida ITA NDM pacijenata, dok je ekspresija iste subjedinice na preparatima UTA DMT2 pacijenata bila slabije izražena. Detekcija Kir6.2 subjedinice nije bila moguća dostupnim antitelom, kao i u slučaju HVS, dok istom metodom nismo uspjeli da lokalizujemo SUR2B subjedinicu.

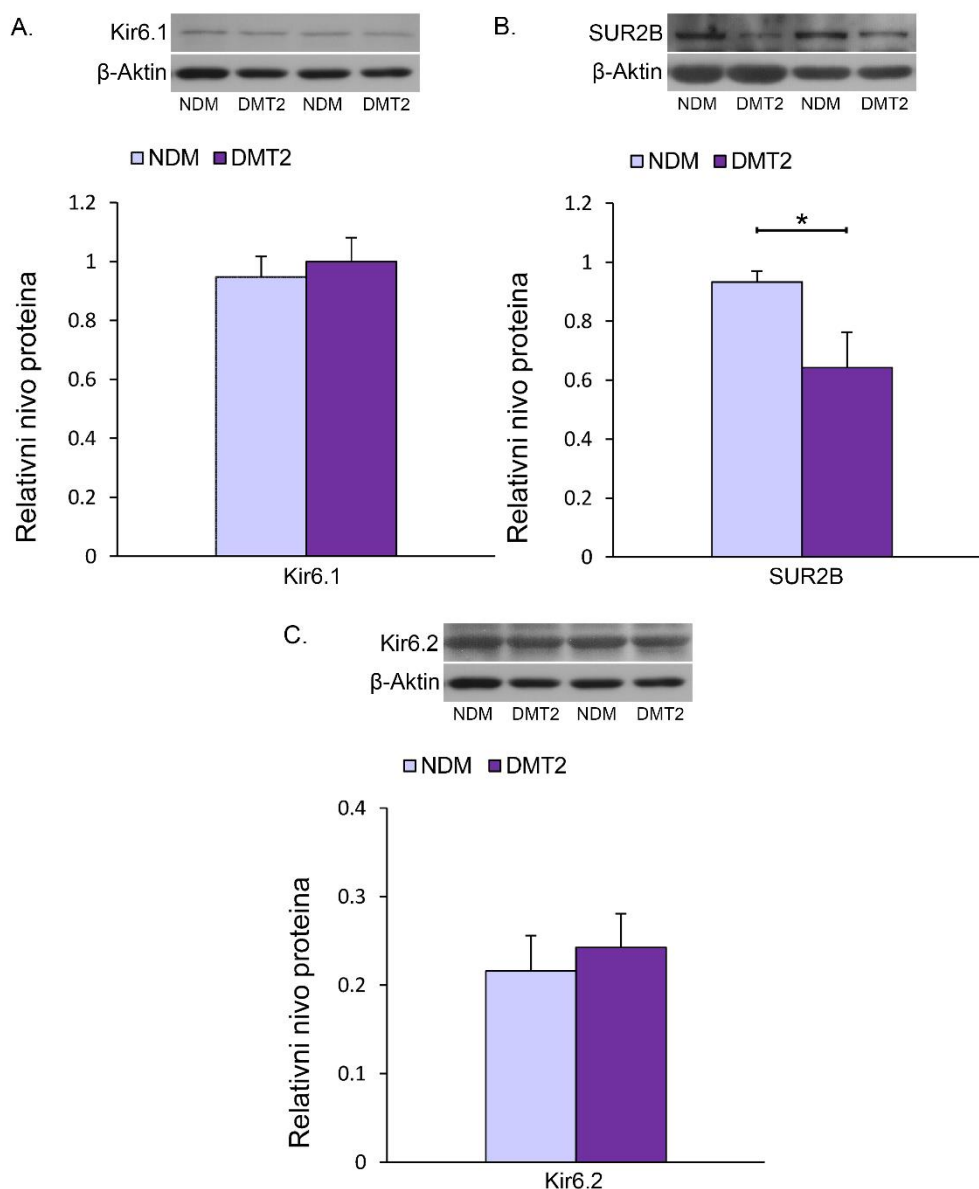
Imunohistochemijska analiza MaxiK α subjedinice BK_{Ca} kanala na uzorcima ITA pacijenata sa/bez DMT2 ukazala je na izraženu i podjednaku ekspresiju ove subjedinice na ćelijama glatkih mišića vaskularnog zida ITA obe grupe pacijenata (Slika 45).



Slika 45. Ekspresija različitih antigena na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Ekspresija različitih antigena na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji (ITA) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tipa 2 (T2DM) imunohistochemijskim bojenjem. Ekspresija Kir6.1 (smeđe obojenje) na ćelijama glatkih mišića i endotela (A, B); ekspresija MaxiK α (smeđe obojenje) na ćelijama glatkih mišića (C, D). Na svim fotografijama jedra su obojena hematoksilinom (plava boja). Originalno uvećanje 100x (A-D).

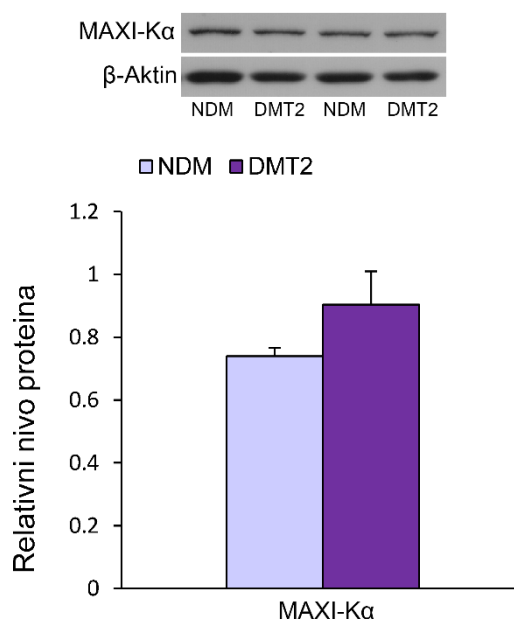
4.10.3. Ekspresija subjedinica K-kanala na humanoj veni safeni pacijenata sa/bez dijabetes melitusa tip 2 Western blot analizom

Western blot analizom detektovali smo sva tri tipa vaskularnih K_{ATP} subjedinica (Kir6.1, Kir6.2 i SUR2B) na HVS NDM i DMT2 pacijenata. Dok je razlika u ekspresiji Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice između NDM i DMT2 uzoraka izostala, ekspresija SUR2B subjedinice je u preparatima HVS DMT2 pacijenata statistički značajno smanjena ($P < 0.05$, $n = 6$) (Slika 46).



Slika 46. Ekspresija proteina subjedinica K_{ATP} kanala na humanoј veni safeni. Ekspresija proteina Kir6.1, SUR2B i Kir6.2 subjedinice K_{ATP} kanala na humanoј veni safeni (HVS) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2). Na slici su prikazane srednje vrednosti \pm SD za 6 pacijenata po grupi, reprezentativni imunoblotovi pokazuju uzorke različitih pacijenata. Vrednosti su normalizovane u odnosu na ekspresiju proteina β -aktina. t-test je korišćen za procenu statističke značajnosti razlika između grupa. * $P < 0.05$

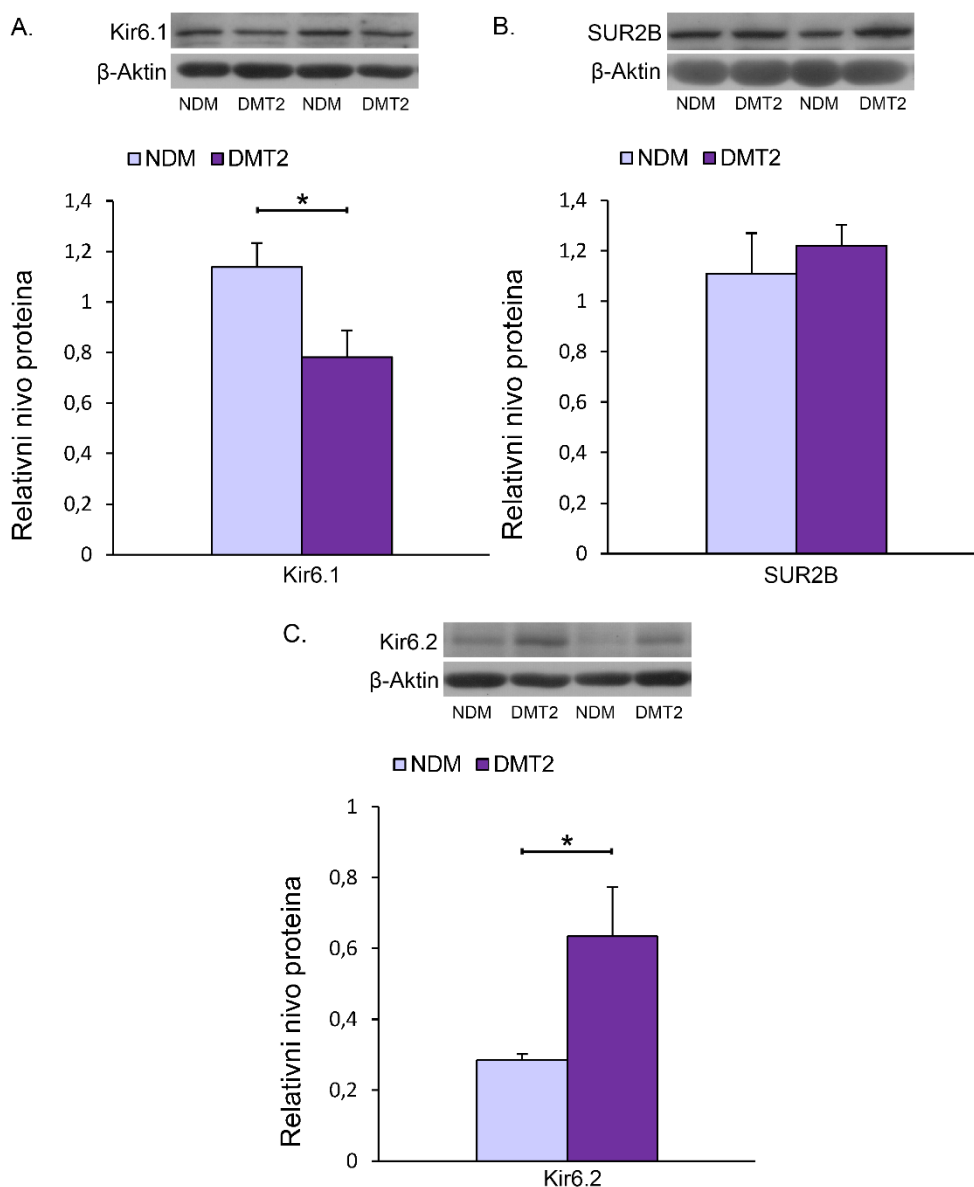
Nasuprot tome, Western blot-om detektovana MaxiK α , subjedinica BK $_{Ca}$ kanala, na HVS nije pokazivala razliku u ekspresiji između NDM i DMT2 pacijenata ($P > 0.05$, $n = 6$) (Slika 47).



Slika 47. Ekspresija proteina MaxiK α , subjedinice BK $_{Ca}$ kanala, na humanoј veni safeni. Ekspresija kanalske subjedinice MaxiK α BK $_{Ca}$ kanala na humanoј veni safeni (HVS) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tipa 2 (DMT2). Na slici su prikazane srednje vrednosti \pm SD za 6 pacijenata po grupi, reprezentativni imunoblotovi pokazuju uzorke različitih pacijenata. Vrednosti su normalizovane u odnosu na ekspresiju proteina β -aktina. t-test je korišćen za procenu statističke značajnosti razlika između grupa.

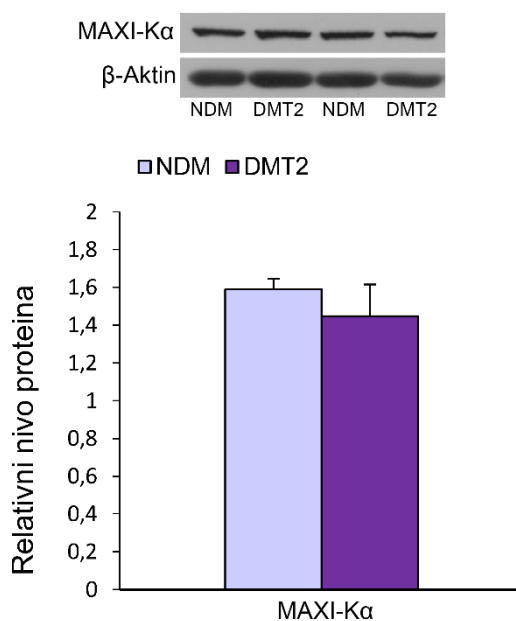
4.10.4. Ekspresija subjedinica K-kanala na humanoј unutrašnjoj torakalnoj arteriji pacijenata sa/bez dijabetes melitusa tip 2 Western blot analizom

Detekcija sve 3 subjedinice K $_{ATP}$ kanala (Kir6.1, Kir6.2 i SUR2) na preparatima ITA Western blot metodom potvrđena je kod obe grupe pacijenata. Ekspresija SUR2B subjedinice nije pokazivala da postoji razlika između ove dve grupe preparata ($P > 0.05$, $n = 6$) (Slika 48B). Međutim, uočena je razlika u ekspresiji Kir6.1 i Kir6.2 subjedinice između NDM i DMT2 uzoraka, gde je u slučaju Kir6.1 subjedinice ona bila statistički značajno više eksprimirana na ITA NDM preparata ($P < 0.05$) (Slika 48A), dok je Kir6.2 subjedinica bila statistički značajno više eksprimirana na ITA DMT2 preparata ($P < 0.05$) (Slika 48C).



Slika 48. Ekspresija proteina subjedinica K_{ATP} kanala na humanoju unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Ekspresija proteina Kir6.1, SUR2B i Kir6.2 subjedinica K_{ATP} kanala na humanoju unutrašnjoj torakalnoj arteriji (ITA) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tip 2 (DMT2). Na slici su prikazane srednje vrednosti \pm SD za 6 pacijenata po grupi, reprezentativni imunoblotovi pokazuju uzorke različitih pacijenata. Vrednosti su normalizovane u odnosu na ekspresiju proteina β -aktina. t-test je korišćen za procenu statističke značajnosti razlika između grupa. * $P < 0.05$

Detekcija MaxiK α , subjedinice BK $_{Ca}$ kanala, na ITA ukazala je na odsustvo razlike u ekspresiji između NDM i DMT2 pacijenata ($P > 0.05$, $n = 6$) (Slika 49).



Slika 49. Ekspresija proteina MaxiK α , subjedinice BK $_{Ca}$ kanala, na humanoju unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Ekspresija kanalske subjedinice MaxiK α BK $_{Ca}$ kanala na humanoju unutrašnjoj torakalnoj arteriji (ITA) pacijenata bez (NDM) i sa dijabetes melitusom tipa 2 (DMT2). Na slici su prikazane srednje vrednosti \pm SD za 6 pacijenata po grupi, reprezentativni imunoblotovi pokazuju uzorke različitih pacijenata. Vrednosti su normalizovane u odnosu na ekspresiju proteina β -aktina. t-test je korišćen za procenu statističke značajnosti razlika između grupa.

5. DISKUSIJA

Prema našem dosadašnjem saznanju, u ovom istraživanju su, po prvi put, opisani efekti otvarača K-kanala, pinacidila, na krvnim sudovima (bajpas graftovima) pacijenata sa DMT2. Dodatno, molekularnom analizom subjedinica K_{ATP} kanala je pokazano da je ekspresija subjedinice SUR2B ovog kanala, statistički značajno niža u venskim graftovima kod DMT2 pacijenata. Nasuprot tome, dijabetični arterijski graftovi su pokazali smanjenu ekspresiju Kir6.1 subjedinice K_{ATP} kanala u vaskularnom glatkom mišiću u poređenju sa nedijabetičnim graftovima.

Krvni sudovi dobijeni od pacijenata podvrgnutim bajpas operaciji podeljeni su u dve grupe: DMT2 i NDM, u zavisnosti od potvrđene dijagnoze dijabetesa. U obe grupe bilo je više pacijenata muškog pola, dok su osobe ženskog pola činile oko 20-25%. Ovakvi podaci su u skladu sa drugim retrospektivnim studijama (115, 116). U obe grupe, DMT2 i NDM, uočena je homogenost u glavnim karakteristikama tipičnim za pacijente sa većim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Na taj način definisan je profil rizika za bajpas operaciju. Brojne studije poslednjih godina bavile su se promenom profila rizika tokom vremena kod pacijenata koji su bili podvrgnuti bajpas operaciji. Uočen je trend porasta broja sve starijih pacijenata, a time i povećanog komorbiditeta i ukupnog KVS rizika (117). U našoj studiji prosečna starost u grupi NDM je bila $64,1 \pm 0,9$ godina za muškarce i $68,2 \pm 2,2$ za žene, dok je u DMT2 grupi prosek godina za muškarce bio $64,8 \pm 0,7$ a za žene $68,1 \pm 1,0$. U obe grupe žene su u proseku bile starije od muškaraca, dok je u grupi NDM ta vrednost bila statistički značajna ($P < 0.05$). U pogledu profila rizika na globalnom nivou postoji i trend u povećanju BMI i prevalencije dijabetesa, a neke zemlje, poput SAD, prijavljuju i smanjenje procenata pušača (što se povezuje sa progresivnom kampanjom protiv pušenja u SAD) (117). Pomalo neočekivan rezultat, dobijen u ovoj studiji, je nešto veći procenat pušača među NDM pacijentima u poređenju sa DMT2 grupom (17,8% vs. 11,6%). Srednja vrednost BMI bila je približno ista u obe grupe i pokazuje da su najčešće u pitanju pacijenti sa prekomernom telesnom težinom. Povećana prevalenca dijabetesa može se objasniti i povećanjem broja obolelih od DMT2, ali i preporukom da se takvi pacijenti pre podvrgavaju bajpas operaciji nego perkutanoj koronarnoj intervenciji (*PCI – percutaneous coronary intervention*).

U pogledu razlika u glikemiji, izmerene jutro pre operacije, postojala je značajna statistička razlika ($P \leq 0.001$) između dijabetičnih i nedijabetičnih pacijenata. Dok je najveći broj NDM pacijenata imao normalne vrednosti glikemije, najveći broj dijabetičara imao je vrednosti iznad gornje granice (> 6.1 mmol/l). U nekoliko kliničkih ispitivanja pokazano je da rana kontrola glikemije kod pacijenata sa DMT2 ima povoljan uticaj na kardiovaskularne funkcije, dok se to ne primećuje kod pacijenata sa dugom istorijom dijabetesa sa lošom kontrolom glikemije (118). U našoj studiji nismo prikupili informaciju o datumu početka dijagnoze DMT2, ali je na osnovu nivoa šećera u krvi izmerene ujutru pre CABG operacije primećeno da i među NDM pacijentima postoje povećane vrednosti glikemije, što možda ukazuje na neprepoznatu intoleranciju na glukozu ili DMT2.

Na osnovu svih prikupljenih podataka vezanih za farmakoterapiju, pacijenti sa DMT2 su uzimali u proseku nešto više od jednog leka u poređenju sa NDM pacijentima (6,06 lekova vs. 4,83 lekova). Ovakvi rezultati su u potpunosti očekivani. Međutim, ukoliko se uporedi terapija u obe grupe, izuzimajući lekove za DMT2, tada uočena razlika izostaje i broj propisanih lekova u obe grupe

postaje približno isti. Među procentima propisanih lekova nije bilo značajnih razlika. Nešto veći procenti zabeleženi su kod DMT2 pacijenata. Veća razlika u procentima je uočena u slučaju statina kod NDM pacijenata (51,2% kod NDM vs 32,5% kod DMT2), a kod DMT2 pacijenata kod vazodilatatora i β -blokatora (39,3% kod NDM vs 51,5% kod DMT2 za vazodilatatore; 72,6% kod NDM vs 87,1% kod DMT2 za β -blokatore). Među grupama nije bilo razlika u pogledu propisivanja inhibitora agregacije trombocita. Međutim, kada je u ovo poređenje dodat podatak i za aspirin, pokazano je da su inhibitori agregacije trombocita u daleko većem procentu propisivani pacijentima koji su NDM tj. da je sam aspirin kao predstavnik ove grupe daleko češće propisivan NDM pacijentima (88,1% kod NDM vs 53,3% kod DMT2). Ipak, postojanje razlika u propisivanju terapije između pacijenata bez i sa DMT2, koji su zatim bili podvrgnuti bajpas operaciji, uključuje zaključke koji su limitirani ograničenjem našeg istraživanja, a to je relativno mali uzorak pacijenata.

Razmatrajući vazodilatatorne efekte pinacidila u odnosu na određene karakteristike poput pola, BMI, dijagnoze dijabetesa i terapije dijabetesa (insulinom ili oralnim antidijabeticima), vrlo interesantno je postojanje razlike u efektima pinacidila na HVS između NDM i DMT2 kod pacijenata muškog pola. Ovo nas navodi na zaključak da prisustvo dijabetesa dovodi do promene u efektima pinacidila kod osoba muškog pola, odnosno da je HVS kod NDM pacijenata osetljivija na dejstvo pinacidila (EC_{50} $1,44 \times 10^{-6}$ NDM vs. $2,29 \times 10^{-6}$ DMT2). Ovi rezultati su u skladu sa nalazom da su K_{ATP} kanali kao ciljno mesto delovanja pinacidila manje eksprimirani kod DMT2 pacijenata usled smanjene ekspresije SUR2B subjedinice o čemu će u daljem tekstu diskusije biti više reči. Takođe, interesantno je i opažanje da gojaznost može biti jedan od faktora koji dovodi do razlika u vazodilatatornim efektima pinacidila na HVS kod NDM pacijenata muškog pola. U našem ispitivanju nisu uočene razlike u efektima pinacidila na HVS između polova ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. Neke studije su ranije pokazale da su efekti pinacidila izraženiji kod osoba ženskog pola i to pripisali dejstvu hormona (119, 120). Međutim, takva istraživanja su rađena na srcu životinja, a K_{ATP} kanali eksprimirani na srcu imaju drugačiju varijantu regulatorne SUR subjedinice (SUR2A) u odnosu na onu prisutnu na krvnim sudovima (SUR2B). SUR subjedinica je ujedno i mesto vezivanja pinacidila, a u pomenutim istraživanjima SUR subjedinica je bila više eksprimirana na srcu ženki morskog praseta u odnosu na srca mužjaka. Dodatna istraživanja koja bi uključila veću grupu pacijenata dala bi preciznije podatke u pogledu ovih parametara.

Dugi niz godina provlači se pitanje da li GLB i njemu slični antidijabetični lekovi pored efekata na β ćelije pankreasa deluju i na ostale K_{ATP} kanale prisutne na srčanim, skeletno-mišićnim i glatko-mišićnim ćelijama krvnih sudova u telu čoveka. Ovo pitanje dobija na važnosti ako se uzme u obzir da je lečenje DMT2 „kratko-delujućim“ inhibitorima K_{ATP} kanala postalo trend u terapeutskoj praksi. Teorijski, ovi lekovi (pogotovo druga generacija derivata sulfonilureje u koju spadaju glibenklamid i glimepirid), mogla bi imati veći afinitet za K_{ATP} kanale sa SUR2 subjedinicom. Naime, druga generacija ovih lekova se vezuje 1000 puta većim afinitetom za SUR1 subjedinicu u poređenju sa prvom generacijom lekova na bazi sulfonilureje (tolbutamid i gliklazid), ali ima i veći afinitet za vezivanje za SUR2 subjedinicu (121). Razlog za povećani afinitet leži u dugom aromatičnom lancu lekova druge generacije koji omogućava da se oni vežu na SUR1 subjedinici na mesto za vezivanje sa visokim afinitetom, ali istovremeno se vezuju i za mesto za vezivanje sa niskim afinitetom (121). Nasuprot tome, lekovi prve generacije se vezuju samo za mesto sa visokim afinitetom. Supstitucija serina sa tirozinom koja se upravo dešava u SUR2 subjedinici u poređenju sa SUR1 subjedinicom u okviru mesta za vezivanje sa visokim afinitetom, ukida ovo mesto vezivanja, tako da SUR2 sadrži samo mesto za vezivanje sa niskim afinitetom, a za to mesto se mogu vezati samo lekovi druge generacije (122, 123). Ipak, sveobuhvatna prospektivna studija dijabetesa u Velikoj Britaniji nije pokazala povećan rizik od mikro- ili makro vaskularnih događaja koji se mogu pripisati terapiji glibenklamidom (124).

Nedavno je pokazano da neki antidijabetični lekovi (npr. rozigitazon, fenformin), osim svoje uloge u smanjenju nivoa glukoze u krvi, deluju i kao inhibitori vaskularnih K_{ATP} kanala. Ovi antidijabetični lekovi nisu kategorisani u porodicu sulfonilureje i mogu potencijalno smanjiti

koronarni odgovor na cirkulišuće vazodilatatore i metabolički stres (35). Poznavanje razlika u ekspresiji i funkciji K_{ATP} kanala u bajpas graftovima moglo bi nas dovesti do različitog postoperativnog lečenja pacijenata sa i bez DMT2.

Farmakološkim eksperimentima smo pokazali da pinacidil proizvodi uporedive vazodilatatorne efekte na venskim graftovima poreklom od NDM i DMT2 pacijenata (pD_2 vrednosti su bile 5,82 prema 5,85, respektivno). Ranije, Muller-Schweinitze i sar. (125) su registrovali sličnu pD_2 vrednost za pinacidil na HVS kod pacijenata koji su NDM (5,75), kao i na humanoj ITA (5,77) (109). Zanimljivo, naši rezultati sugerišu da dijabetes nema značajan uticaj na senzitivnost i maksimalnu relaksaciju HVS izazvanu pinacidilom. Zimmermann i sar. (126) dali su jedno od mogućih objašnjenja za ovaj nalaz. Pokazali su da uklanjanje endotela ili inhibicija NO-sintaze u cerebralnim arterijama pacova ukida razlike u osetljivosti otvarača K_{ATP} kanala između kontrolne i dijabetične arterije. U našim farmakološkim eksperimentima potvrdili smo nedostatak funkcionalnosti endotela nakon primene acetilholina, pa su svi proizvedeni efekti pinacidila nezavisni od endotela. Trenutno dostupni podaci o efektima dijabetesa na reaktivnost glatkih mišića su vrlo ograničeni jer je većina studija do sada bila usmerena na mehanizme smanjene relaksacije zavisne od endotela. Bitno je naglasiti da su studije ukazale na već prisutnu manjkavost grafta HVS nevezano od prisustva dijabetesa jer je IHH analizom ovih graftova pre implementacije potvrđeno oštećenje endotela nastalo usled preparisanja, ispiranja lumena i rastezanja (89). Stoga, pored endotela, kod dijabetesa je takođe vrlo važno istražiti i promene funkcije vaskularnog glatkog mišića. U studiji sa kromakalimom, takođe OKK, koncentracijski-zavisne krive su kod dijabetičnih HVS bile pomerene u desno i postojala je statistički značajna razlika u osetljivosti na kromakalim između NDM i DMT2 segmenata HVS (pD_2 6.85 \pm 0.08 za NDM i pD_2 6.61 \pm 0.04, $P < 0.05$), dok je i E_{max} bio statistički značajno smanjen kod dijabetičnih HVS. Ovakvi rezultati ukazuju da je kromakalim manje potentan na dijabetičnoj veni (103). U istoj studiji naučnici su ispitali i da li interakcije sa lekovima na bazi sulfonilureje tokom terapije imaju uticaja na dobijene rezultate, jer su ranije prijavljene ovakve interakcije. Upoređivana je vazorelaksacija izazvana kromakalimom na HVS kod dijabetičara lečenih sulfonilurejom ($n = 6$) u odnosu na pacijente koji su bili lečeni ne-sulfonilurea lekovima ($n = 5$). Njihov zaključak je da je dilatacija izazvana kromakalimom u istom stepenu smanjena u svim dijabetičnim venama što sugeriše da je ekvibracioni period u kupatilcu dovoljan za ispiranje leka sa SUR mesta (ukoliko je to vezivanje i bilo prisutno). Shodno tome, svi dobijeni rezultati ukazuju da derivati sulfonilureje nemaju uticaja na relaksaciju izazvanu kromakalimom na venskim segmentima kod dijabetičara.

Brojna istraživanja pokazala su da pinacidil prouzrokuje relaksaciju različitih životinjskih i humanih krvnih sudova prekontrahovanim raznovrsnim vazokonstriktorima (110, 127-129). Iako je u brojnim animalnim modelima otkrivena povećana kontraktilnost krvnih sudova receptor zavisnim- i nezavisnim mehanizmima (130-132), mi smo u našoj studiji koristili FE kao vazokonstriktor (u slučaju HVS) za koji je i u drugim radovima potvrđeno da izaziva približno iste amplitude kontrakcije na segmentima HVS kod NDM i DMT2 pacijenata (103).

Efekti vazodilatacije na krvnim sudovima pod uticajem pinacidila su prevashodno posledica otvaranja K_{ATP} kanala na plazma membranama ćelija glatkih mišića (133). K_{ATP} kanali su heterooktamerni kompleksi sa četiri subjedinice koje formiraju poru, a koje pripadaju klasi ulazno- ispravljajčkih K-kanala (Kir6.1 ili Kir6.2) i četiri regulatorne SUR subjedinice (22). K_{ATP} kanal eksprimiran na glatkom mišiću krvnih sudova sadrži četiri Kir6.1 subjedinice i četiri SUR2B subjedinice i samo unutar ovog kompleksa može se funkcionalno eksprimirati na plazma membrani ćelije glatkog mišića (32). Subjedinice SUR su molekularne mete za anti-dijabetične lekove na bazi sulfonilureje, poput GLB, selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, kao i za OKK (33). Subjedinica SUR određuje specifičnost i selektivnost agonista i antagonista K_{ATP} kanala (34).

Prema rezultatima dobijenim sa GLB, čini se da K_{ATP} kanali imaju važnu ulogu u relaksaciji HVS izazvanoj pinacidilom. GLB (3, 10 i 30 μM) je suprimirao i osetljivost HVS na pinacidil i njegovu maksimalnu relaksaciju u obe eksperimentalne grupe. Međutim, supresija efekta pinacidila i njegove maksimalne relaksacije od strane GLB bila je izraženija kod segmenata HVS dobijenih od NDM pacijenata, tj. snažniji efekti su postignuti upotrebom nižih koncentracija GLB. Povećanjem koncentracije GLB (30 μM) efekti supresije pinacidila i maksimalne relaksacije su bili intenzivniji kod DMT2 uzoraka HVS. Postoje podaci da GLB primenjen u visokim koncentracijama ($> 10 \mu\text{M}$) pored blokade K_{ATP} kanala na plazma membrani ćelija, ima i dodatne intracelularne efekte uključujući blokadu K_{ATP} kanala na mitohondrijama i modulaciju prometa intracelularnog Ca^{2+} (134).

Da bi se dodatno ispitao različit, smanjen efekat GLB na blokadu K_{ATP} kanala glatkih mišića HVS kod DMT2 pacijenata primenjene su metode molekularne biologije. Ispitivane su i moguće razlike u ekspresiji K_{ATP} kanala između grupa. Potvrđeno je prisustvo regulatorne subjediniće SUR2B na HVS obe grupe pacijenata, ali, iznenađujuće, subjedinića SUR2B bila je statistički značajno manje prisutna u graftovima DMT2 pacijenata. Na modelu humane pupčane arterije, Li i sar. (135) uočili su smanjenu ekspresiju K_{ATP} kanala i smanjenu relaksaciju izazvanu pinacidilom kod pacijentkinja sa gestacijskim dijabetes melitusom. Zanimljivo, K_{ATP} -povezani signalni putevi su ostali nepromenjeni. Naši eksperimentalni podaci su u korelaciji sa ovim nalazima, jer je inhibicija pinacidilom izazvane relaksacije i smanjenje ekspresije SUR2B subjediniće na HVS kod DMT2 pacijenata, takođe, uočena. Moguće objašnjenje za smanjene ekspresije SUR2B subjediniće pruža studija sa metigliksalom (MGO) na vaskularnoj glatko-mišićnoj ćelijskoj liniji dijabetičara. Ovde autori sugerišu da MGO, visoko reaktivno jedinjenje, koje se preterano proizvodi tokom produžene hiperglikemije, dovodi do nestabilnosti iRNK koja kodira subjediniće K_{ATP} kanala što snažno doprinosi dijabetičnim vaskularnim komplikacijama (136). Pretpostavlja se da izloženost MGO-u povećava ekspresiju miR-9a-3p, koja potom smanjuje (eng. *downregulate*) količinu iRNK za SUR2B subjediniću, ugrožavajući funkciju K_{ATP} kanala (137). Kako su obe subjediniće potrebne za funkcionalne K_{ATP} kanale glatkih mišića, manje izražena supresija efekta pinacidila od strane GLB na HVS kod DMT2 pacijenata verovatno je posledica smanjene ekspresije funkcionalnih K_{ATP} kanala. Istovremeno, uporediva relaksacija koju indukuje pinacidil u obe eksperimentalne grupe može se objasniti dodatnim mehanizmima nezavisnim od delovanja preko K_{ATP} kanala.

Na osnovu naših rezultata IHH bojenja, Kir6.1 subjedinića pokazuje snažnu ekspresiju na glatkom mišiću i endotelnim ćelijama vaskularnog zida HVS. WB analiza je potvrdila ove nalaze. Nije uočena razlika u ekspresiji Kir6.1 subjediniće u venskim segmentima poreklom od NDM i DMT2 pacijenata. Brojna istraživanja pokazuju da su vaskularni K_{ATP} kanali sačinjeni od Kir6.1 i SUR2B subjediniće (138-140), dok Kir6.2 subjedinića koja je kvantifikovana WB-om može biti poreklom od endotela. Naime, objavljeno je da su detektovani heteromerni endotelni K_{ATP} kanali sastavljeni od Kir6.1 / Kir6.2 subjediniće koja formira poru u kombinaciji sa SUR2B subjedinićom (141). Međutim, IHH bojenjem venskih segmenata anti-Kir6.2 antitelom na HVS nismo uspeli da dobijemo potvrdu ovog nalaza. Izostanak pozitivnog bojenja primenom ovog tipa antitela u našem istraživanju nije neočekivan, jer su o istom rezultatu ranije izvestili Yoshida i sar. (141).

SUR2A i SUR2B se razlikuju u samo 42 aminokiseline u C-terminusu, uzrokovane alternativnim spajanjem egzona (142). Dok je SUR2B subjedinića karakteristična za glatke mišićne ćelije krvnih sudova, SUR2A se nalazi na kardiomiocitama. Pokazano je da SUR2B ima veći afinitet prema OKK u poređenju sa SUR2A, što je povezano sa razlikom u vezivanju sa Mg-nukleotidima između ove dve SUR2 izoforme (143). Ovakvi nalazi podstiču dalja istraživanja vezana za sistematsku primenu OKK kao modulatora aktivnosti bajpas graftova, a koji ne bi imali efekat na srčani mišić.

Činjenica da GLB nije poništio relaksirajući efekat pinacidila na HVS prekontrahovanoj FE ukazuje da pinacidil poseduje dodatne mehanizme delovanja nezavisne od K_{ATP} kanala. Slično tome, ovakav nalaz je ranije prijavljen u različitim eksperimentalnim modelima (72, 144, 145), a i u našoj

laboratoriji na uzorcima humane ITA (109) i radijalne arterije (110), kao i na uterusu pacova (82). Dodatni efekti pinacidila, nezavisni od K_{ATP} kanala, uključuju interakciju sa K-kanalima kao što su K_v i K_{Ca} kanali ili Na^+/Ca^{2+} pumpom i voltažno-zavisnim Ca-kanalima L-tipa (72, 110).

Jedan od tipova K-kanala koji su pokazali različitu ekspresiju na vaskularnom zidu dijabetičnih životinja jesu K_{Ca} kanali, tj. njihova podgrupa- BK_{Ca} kanali. Ekspresija BK_{Ca} kanala primećena je u različitim tkivima kod životinja i ljudi. Glavna uloga BK_{Ca} kanala, poznatih i kao MaxiK-kanali, je regulacija vaskularnog tonusa krvnih sudova (146). BK_{Ca} kanali su tetrameri sastavljeni od dva tipa subjedinica: α subjedinica koje formiraju poru udruženih sa pomoćnim β subjedinicama, gde je β_1 glavni oblik koji se nalazi u vaskularnom glatkom mišiću (146). Dok α -subjedinica formirajući poru ima ulogu u provođenju jona, β subjedinica doprinosi biofizičkim i farmakološkim svojstvima ovih kanala (147). U nekoliko studija ukazano je da oslabljena funkcija BK_{Ca} kanala kod dijabetesa nastaje od smanjene ekspresije i funkcije β_1 subjedinica (148-150). U slučaju spontano-, kao i angiotenzin II-, hipertenzivnih pacova uočena smanjena aktivnost BK_{Ca} kanala u VGMĆ bila je povezana sa smanjenom ekspresijom β subjedinice ovog kanala (151, 152). S druge strane, kod pacova sa pulmonalnom hipertenzijom uočena je smanjena ekspresija α subjedinice BK_{Ca} kanala (153). Ranije je objavljeno da bi pinacidil mogao da ostvaruje svoje efekte na VGMĆ ne samo putem K_{ATP} kanala, već i preko BK_{Ca} kanala (154).

U obe eksperimentalne grupe u našem istraživanju TEA, predominantni blokator K_{Ca} kanala, nije uticao na vazodilatatorne efekte pinacidila na HVS u koncentraciji od 1mM. Međutim, povećanjem koncentracije TEA na 3 mM uočena je statistički značajna razlika u senzitivnosti na pinacidil kod pacijenata sa DMT2, bez uticaja na maksimalnu relaksaciju u obe grupe. Ovakvi efekti TEA mogu se obrazložiti njegovim potencijalnim delovanjem i na K_v kanala. Naime, pokazano je da se u visokim koncentracijama, pored K_{Ca} kanala, TEA neselektivno vezuje i za K_v kanale. Tako je uočeno da su u pulmonalnim arterijskim VGMĆ pacova, prisutne dve populacije K_v kanala- 4-AP senzitivni (IC_{50} ; 232 μ M), koji su skoro potpuno neosetljivi na TEA, i TEA senzitivni (IC_{50} ; 2,6 mM), koji su relativno neosetljivi na 4-AP (155). Takođe, potrebno je napomenuti da BK_{Ca} kanali nisu osetljivi na GLB (156). Pokazano je da su BK_{Ca} kanali najosetljiviji na blokirajuće delovanje TEA u koncentracijama od 0,1 - 1 mM (157). Međutim, u našem istraživanju IbTx, koji je visoko selektivan za BK_{Ca} kanal, nije statistički značajno modifikovao vazorelaksaciju izazvanu pinacidilom ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. Dodatno, molekularno-biološka ispitivanja α subjedinice ovih kanala, pokazala su njenu jasnu lokalizaciju u obe grupe u glatko-mišićnom sloju krvnog suda, dok kvantitativne razlike u ekspresiji α subjedinice između grupa nisu primećene.

U svrhu ispitivanja uloge K_v kanala u procesima vazodilatacije koristili smo neselektivni blokator ovih kanala 4-AP, koji je u niskim milimolarnim koncentracijama, relativno selektivan za ovaj tip kanala (157), a ima veoma mali afinitet za K_{Ca} kanale (78). Primenom niskomolarnih koncentracija 4-AP (1 i 3 mM) na preparatima HVS pokazali smo da ovi kanali inhibiraju efekat pinacidila samo na preparatima HVS kod NDM pacijenata. Prethodna istraživanja na animalnim modelima dijabetesa tip 1 pokazala su smanjenu ekspresiju i funkciju vaskularnih K_v kanala (158-160). Mehanizmi koji su se nalazili u osnovi efekta smanjenja funkcije/ekspresije K_v kanala uključivali su nitriranje K_v kanala (161), reaktivne kiseonične vrste (*engl. ROS*) (162) i/ili protein kinaza C (PKC)- zavisne puteve (163). Da bismo ispitali koji podtip K-kanala je uključen u ove efekte primenili smo specifični blokator $K_v1.3$ kanala, margatoksin. I dok je u većini radova margatoksin označen kao visokoselektivni blokator samo $K_v1.3$ kanala, u široj literaturi se mogu naći podaci da pored $K_v1.3$ ovaj toksin, izolovan iz otrova škorpiona, selektivno blokira i $K_v1.1$ i $K_v1.2$ kanale. Prethodno, prisustvo $K_v1.3$ kanala detektovano je i na endotelnim i na VGMĆ. Kako naša tkiva krvnih sudova nisu imala funkcionalni endotel može se smatrati da je potencijalna blokada ovih kanala primenom margatoksina isključivo vezana za VGMĆ i samim tim za $K_v1.3$ kanale. Primena margatoksina isključila je ulogu $K_v1.3$ kanala u vazorelaksantnim efektima pinacidila, jer margatoksin nije antagonizovao relaksaciju ni u jednoj od grupa. Ovo ostavlja prostora da je neki od drugih K_v kanala uključen u ove procese, ali upućuje i na potencijalnu razliku u ekspresiji ovih kanala

na VGMĆ HVS između NDM i DMT2 pacijenata, kao i na ulogu dijabetesa u uočenoj razlici. Dostupnim antitelima kojima smo testirali Kv1.2, Kv1.3, Kv4.2 i Kv4.3 kanale nismo dobili ni IHH ni WB analizom rezultate, tako da nismo mogli ni da potvrdimo ni da opovrgnemo ovakve pretpostavke, ostavljajući prostora za dalja istraživanja eventualno primenom ovih ali i antitela drugih proizvođača.

Upotrebom P1075, koji je sintetski potentni analog pinacidila i visoko selektivni otvarač K_{ATP} kanala (164), na HVS pacijenata sa i bez DMT2 dobijena je koncentracijski-zavisna relaksacija krvnog suda. Izraženija osetljivost na P1075 u poređenju sa pinacidilom, koja je primećena u našem istraživanju, u skladu je sa ranije publikovanim rezultatima na humanim bajpas graftovima rađenim u našoj laboratoriji (112). U našem radu, P1075 je bio 3 do 4 puta potentniji u odnosu na pinacidil kod obe grupe pacijenata, iako je HVS DMT2 pacijenata bila nešto senzitivnija na efekte P1075. Zanimljivo je da je samo primena najniže koncentracije P1075 dovela do statistički značajne razlike između grupa pacijenata, pri čemu je NDM grupa bila senzitivnija na vrlo niske koncentracije P1075. Dodatno, pokazali smo da su maksimalne reakcije visoko selektivnog otvarača K_{ATP} kanala P1075 i pinacidila izrazito različite u obe grupe pacijenata (maksimalni odgovor $\sim 70\%$ za P1075 nasuprot 100% za pinacidil). Ovakav nalaz je u skladu sa pretpostavkom koju ćemo u nastavku diskusije više razmatrati, a to je da pinacidil ima i dodatne K-nezavisne mehanizme dejstva. Primenom visoko selektivnog blokatora K_{ATP} kanala, GLB, statistički značajno je inhibirana koncentracijski-zavisna P1075 kriva, ukazujući da se mehanizam dejstva P1075 dominantno odvija putem K_{ATP} kanala. Međutim, maksimalna relaksacija primenom P1075 u prisustvu GLB-a nije bila inhibirana kod NDM pacijenata. Moguće objašnjenje ovog nalaza može se naći u činjenici da su ranije istaknuti rezultati koji ukazuju da i P1075, iako visokoselektivni otvarač K_{ATP} kanala, jedan deo svojih efekata ostvaruje i kroz K_{ATP} -nezavisne mehanizme dejstva, koji uključuju druge K-kanale, poput Kv i Kv1.3 kanala na renalnoj arteriji pacova (165).

NS1619 je specifični aktivator BK_{Ca} kanala u glatkim mišićima (166, 167). U našim eksperimentima NS1619 (0.001 - 100 μM) je koncentracijski-zavisno relaksirao HVS DMT2 pacijenata, međutim senzitivnost dijabetične HVS na NS1619 je bila vrlo niska (EC_{50} 0.1 mM). Dodatno, maksimalna relaksacija je bila tek oko 60%. Interesantno, primena visoko selektivnog blokatora BK_{Ca} kanala, IbTx ne samo da nije imala efekta nego je i potencirala vazorelaksantne efekte NS1619, nasuprot većini radova koji pokazuju da IbTx efikasno blokira BK_{Ca} kanale (168). Takođe, pokazano je da NS1619 osim aktivacije BK_{Ca} kanala, inhibitorno deluje na Kv kanale, ali i na Ca^{2+} struje kroz voltažno-zavisne Ca-kanale L-tipa (169).

U cilju ispitivanja efekata pinacidila koji su nezavisni od K-kanala urađena je posebna serija eksperimenata gde je korišćen modifikovani Krebs-Ringerov bikarbonatni rastvor u kojem je finalna koncentracija K^+ bila 80 mM. Naime, intracelularna koncentracija K^+ u VGMĆ je oko 150 mM, a ekstracelularna oko 3-5 mM. Stoga, zamenom standardnog Krebs-Ringerovog rastvora sa modifikovanim, stvoreni su uslovi visoke ekstracelularne koncentracije K^+ koja potom dovodi do kompletne eliminacije elektrohemijskog gradijenta za jon K, depolarizacije ćelijske membrane i otvaranja voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa (170, 171). Promena hemijskog gradijenta za K^+ smanjuje efekat supstanci koje aktiviraju K-kanale (172), kao što su OKK. Dodatno, ovako modifikovani rastvor ujedno predstavlja i eksperimentalni model za vaskularni spazam.

Aplikacija pinacidila u koncentraciji većoj od $> 1 \mu\text{M}$, dovela je do relaksacije HVS kod pacijenata sa i bez DMT2, u prisustvu rastvora visoke koncentracije K^+ , čime je potvrđeno da pinacidil ima dodatne mehanizme delovanja nezavisne od K-kanala. Teoretski, kada je krvni sud kontrahovan depolarizacionim rastvorom K^+ , zbog većeg potencijala membrane, repolarizacija ili hiperpolarizacija izazvana OKK može biti teža u poređenju s drugim vazokonstriktorima koji manje utiču na potencijal membrane (173-175).

U našim eksperimentima, i u slučaju DMT2 i NDM, pinacidil je dovodio do relaksacije HVS prekontrahovane sa rastvorom sa visokom koncentracijom K^+ ($P < 0.01$), pri čemu je koncentracijski-zavisna kriva bila značajno pomerena udesno u poređenju sa koncentracijski-zavisnom krivom dobijenom kada je HVS bila prekontrahovana FE. Razlika između E_{max} je, takođe, bila statistički značajna ($P < 0.05$). Ovakvi rezultati prijavljeni su i ranije na različitim modelima (82, 109, 110). Slični rezultati su pokazani kako na različitim animalnim, tako i na humanim krvnim sudovima, uključujući humanu kruralnu venu (144, 176, 177). Pri tome, u našoj studiji dodatni mehanizmi pinacidila su bili zastupljeni u obe grupe bez značajnih razlika između njih kako u senzitivnosti, tako i u maksimalnim relaksacijama. Mehanizmi kojima pinacidil ostvaruje svoje K-nezavisne efekte nisu još uvek dovoljno razjašnjeni. Ranije je pokazano da pinacidil ne stimuliše influks Ca^{2+} u endoplazmatični retikulum niti inhibira ulazak Ca^{2+} u ćeliju kao jedan od mogućih mehanizama dejstva nezavisnih od K-kanala (72). Stoga, da bi se dodatno smanjio i uticaj voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa, zajedno sa rastvorom sa visokom koncentracijom K^+ dodavan je nifedipin, visokoselektivni blokator voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa. Interesantno, u tom slučaju pinacidil je proizvodio jednako značajnu relaksaciju kod obe grupe preparata ($P < 0.01$), ali je izostala razlika u E_{max} vrednostima u poređenju sa kontrolnom krivom kontrahovanom FE ($P > 0.05$). Ovo možda ukazuje da blokada voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa potencira efekte visokih doza pinacidila u uslovima visoke ekstracelularne koncentracije K^+ . Dodatni eksperimenti u kojima je uz rastvor sa visokom koncentracijom K^+ dodat nikl ($300 \mu M$), dali su slične statističke vrednosti za pD_2 i E_{max} kao u slučaju prisustva samo rastvora sa visokom koncentracijom K^+ . Naposljetku, kombinacija rastvora visokomolarnog K^+ sa nifedipinom i niklom, smanjila je efekat K-nezavisnih mehanizama dejstva pinacidila. U poređenju sa kontrolnom krivom i dalje je bila prisutna statistička značajnost u obe grupe, samo manja ($P < 0.05$), dok je u slučaju E_{max} statistički značajna inhibicija bila prisutna samo kod DMT2. Dobijeni rezultati otežali su precizniju identifikaciju K-nezavisnih dejstava pinacidila, a temeljnom pretragom literature nisu pronađene studije koje bi olakšale njihovo tumačenje.

Primenom različitih inhibitora jonskih kanala uz rastvor sa visokom koncentracijom K^+ ispitivane su potencijalne razlike u funkciji nekih drugih jonskih kanala između DMT2 i NDM pacijenata. Farmakološki eksperimenti sa dve različite koncentracije nikla (30 i $300 \mu M$) potvrdile su nam pretpostavke da Na^+/Ca^{2+} pumpa (NCX) na HVS nema bitnu ulogu u K-nezavisnim efektima pinacidila. Na dijabetičnim i nedijabetičnim segmentima HVS, koncentracijski-zavisne krive su bile blago pomerene u desno. Razmena Na^+/Ca^{2+} jedinstveno i direktno povezuje metabolizam Na^+ i Ca^{2+} i bitan je regulator citoplazmatskog Ca^{2+} . Postoje dve klase NCX kanala, oni koji kotransportuju K^+ sa Ca^{2+} i oni koji to ne čine (178). Dominantna pumpa u arterijskim miocitima je K-nezavisni NCX, mada je otkriven i NCX koji kotransportuje K^+ sa Ca^{2+} (179). Do danas su potvrđene 3 NCX izoforme (NCKS1 do NCKS3) kod sisara, od kojih je svaka proizvod različitog gena (180). NCKS1, eksprimiran je u miocitima i ima više različitih varijanti od kojih je NCKS1.3 glavna u GMC (181). Naši rezultati stoje nasuprot istraživanjima efekata pinacidila na humanoj radijalnoj arteriji gde je pokazano da Na^+/Ca^{2+} pumpa ima bitnu ulogu u njegovom K-nezavisnom mehanizmu dejstva (110). U istom radu je pokazano da voltažno-zavisni Ca-kanali L-tipa ne doprinose ovim efektima. Interesantno, naša istraživanja pokazala su statističku značajnost ($P < 0.05$) u inhibiciji efekata vazorelaksacije pinacidilom kod nedijabetične vene kada je u kupatilce dodat nifedipin. Dobijene razlike pre svega mogu ukazati na različitu distribuciju Na^+/Ca^{2+} pumpe i voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa između arterijskih i venskih krvnih sudova. Dodatno, ranija istraživanja sugerisu da postoji važna razlika između arterija i vena u smislu regulacije influksa Ca^{2+} tokom kontrakcije. Ta razlika predstavlja potencijalne terapijske ciljeve za lečenje vaskularnih bolesti, kao što je npr. hipertenzija (182).

OKK su vazodilatatori koji aktiviraju K_{ATP} kanale na plazma membrani (pmK_{ATP}), ali i K_{ATP} kanale na mitohondrijama (mtK_{ATP}). U kardiomiocitima diazoksid je efikasniji u aktivaciji mtK_{ATP}

kanala, dok pinacidil podjednako aktivira oba tipa K_{ATP} kanala (183). Pored toga, pokazano je da OKK regulišu dijametar arterija putem SUR-zavisnih i SUR-nezavisnih puteva (184). Tako diazoksidom-izazvana vazodilatacija nastupa nezavisno od tipa SUR subjedinice, dok pinacidil za svoje efekte zahteva prisustvo SUR2B subjedinice. Takođe, K_{ATP} detektovani u vaskularnom endotelu mezenteričnih arterija nisu doprinosili vazodilataciji posle primene pinacidila i diazoksida, imajući u vidu da su ovi OKK podjednako doveli do dilatacije i u slučaju intaktnog i u slučaju uklonjenog endotela (184). U našim eksperimentima GLB nije doveo do inhibicija vazodilatacije dijabetične ITA (u nižim koncentracijama; 0.3 i 10 μ M). Tek je primena GLB u visokoj koncentraciji (30 μ M) antagonizovala efekte pinacidila ($P < 0.05$), značajno utičući i na E_{max} ($E_{max} = 64,84 \pm 5,55\%$, $P < 0.01$). Kada je HVS ispitivana, GLB antagonizam najveće korišćene koncentracije pinacidila (100 μ M), je bio izražen u manjoj meri u poređenju sa ovim dobijenim na ITA. Interesantno da je kod ITA GLB, po prvi put prouzrokovao značajnu inhibiciju maksimalne relaksacije proizvedenu pinacidilom, a da se dobijena vrednost E_{max} može uporediti samo sa vrednostima dobijenim primenom rastvora sa visokom koncentracijom K^+ ($E_{max} = 55,81 \pm 7,48\%$). Moguće je da ovaj rezultat ukazuje da pinacidil manjim delom svoje vazodilatatorne efekte na ITA ostvaruje kroz K_{ATP} -nezavisne mehanizme dejstva. Patološke izmene K_{ATP} kanala su ranije uočene i okarakterisane u slučajevima dijabetesa, ishemije i hipertenzije, pokazujući izmenjenu funkciju K_{ATP} kanala i smanjenu gensku ekspresiju u različitim arterijama (185-187). Ipak, interesantno je istraživanje na endotel nezavisnim segmentima aorte izolovanim iz Wistar i spontano hipertenzivnih sojeva pacova (188). Dok je smanjena ekspresija Kir6.1 i SUR2B subjedinice detektovana kod spontano hipertenzivnih pacova, vazodilatatorni odgovor aorte na pinacidil i kromakalim je bio sličan kod oba soja. U našem istraživanju potvrđena je statistički značajno smanjena ekspresija Kir6.1 subjedinice na preparatima ITA kod DMT2 pacijenata.

Pokazano je da OKK dovode do relaksacije različitih tipova glatke muskulature krvnih sudova i preko aktivacije BK_{Ca} kanala (189). Jedna od studija je ukazala da perivaskularno masno tkivo ITA oslobađa relaksantni faktor koji svoj efekat ostvaruje uz učešće BK_{Ca} kanala glatkih mišića (190). U našoj studiji korišćena je samo koncentracija TEA od 1 mM, za koju je pokazano da osim što blago pomera koncentracijski-zavisnu krivu pinacidila u desno, nema značajniji uticaj u blokadi vazorelaksantnog efekta pinacidila. Relativna neosetljivost na TEA u saglasnosti je sa ranijim pretpostavkama da OKK aktiviraju K_{ATP} (191, 192) ili K_v kanale (157). WB analiza je potvrdila odsustvo kvantitativne razlike u ekspresiji α subjedinice BK_{Ca} kanala između uzoraka ITA uzetih od pacijenata sa i bez DMT2. IHH analiza je pokazala snažnu ekspresiju α subjedinice BK_{Ca} kanala u VGM sloju, ali i u endotelu ITA. Velika gustina BK_{Ca} kanala na ITA može delimično da objasni ređu pojavu spazma ovog grafta u poređenju sa graftom radijalne arterije (193). U istom istraživanju elektrofiziološkim eksperimentima je registrovano da TEA i IbTx (primenjeni u istim koncentracijama kao i u našim farmakološkim eksperimentima) značajno smanjuju voltažom-aktivirane K^+ struje u ITA, pri čemu IbTx ima veći blokirajući efekat. Ipak, na mezenteričnim arterijama je potvrđeno da IbTx ne menja pinacidilom-indukovanu vazodilataciju (184), što je u korelaciji sa našim podacima dobijenim na dijabetičnoj ITA. Pokazano je da IbTx, kao i TEA u koncentracijama od 7 mM nemaju uticaj na K_{ATP} kanale (77).

Više studija je ranije ukazalo na povećanje funkcionalne ekspresije BK_{Ca} kanala u VGMĆ tokom hipertenzije (194-196). Biohemijske i molekularno-biološke studije istraživale su da li je porast funkcije BK_{Ca} kanala u arterijama tokom hipertenzije posledica povišene ekspresije subjedinice kanala koja formira poru. Imunoblot analizom detektovana α subjedinica u aorti spontano-hipertenzivnih pacova je bila 2-3 puta više ekspimirana u poređenju sa normotenzivnim pacovima (196). Međutim, između ova dva soja pacova nije uočena razlika u genskoj ekspresiji ove subjedinice, već je pretpostavljeno da razlike u funkcionalnoj ekspresiji BK_{Ca} kanala potiču od post-transkripcione razlike i stabilnosti proteina α subjedinice i/ili pomoćne regulatorne β subjedinice. U našem istraživanju ekspresija α subjedinice BK_{Ca} kanala detektovana je u VGM sloju i endotelu ITA kod obe grupe pacijenata, dok WB analiza nije pokazala kvantitativne razlike u ekspresiji između

grupa. Ipak, važno je naglasiti da su u našoj studiji, nezavisno od prisustva dijabetesa skoro svi pacijenti imali hipertenziju, što potencijalno može da utiče na odsustvo razlike između grupa.

Primenom 4-AP ispitali smo ulogu Kv kanala u procesima vazorelaksacije na ITA poreklom od pacijenata sa dijabetesom. U našim eksperimentima primena 4-AP u koncentraciji od 0.3 mM nije antagonizovala efekte pinacidila, dok je pri koncentraciji od 1 i 3 mM postignuta statistički značajna inhibicija vazorelaksacije, a koncentracija od 3 mM je izazvala i signifikatnu inhibiciju maksimalne postignute relaksacije. Ovi rezultati su u skladu sa ranije dobijenim rezultatima na ITA bez endotela nakon primene rezveratrola, potencijalnog OKK (197). Ipak nasuprot rezultatima koji su tada potvrdili ulogu Kv1.3 kanala u relaksantnim efektima rezveratrola, u slučaju pinacidila pokazano je primenom margatoksina da Kv1.3 kanal nije imao ulogu u vazodilatatornom efektu. Ipak, studija rađena na mezenteričnim arterijalnim GMC izolovanim iz dijabetičnog i nedijabetičnog soja pacova ukazala je na razliku u ekspresiji većine Kv kanala (198). Ekspresija Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv3.2, Kv4.1, Kv4.3, Kv5.1, Kv6.2, Kv8.1, Kv9.3, i Kv10.1 kanala bila je veća na izolovanim dijabetičnim GMC. Međutim, studija je pokazala da bez obzira na ovu razliku u ekspresiji kanala, u ranoj fazi dijabetesa detektuje se i razlika u amplitudi Kv kanala, koja potom iščezava u hroničnoj fazi. Primenom IHH i WB analiza koristeći nama dostupna antitela nismo bili u mogućnosti da potvrdimo ove rezultate niti da ukažemo na eventualnu ulogu i/ili razliku u nekim drugim Kv kanalima.

Električna stimulacija (ES) dovodi do aktivacije perivaskularnih nervnih završetaka koji oslobađajući različite neurotransmitere i ko-transmitere (noradrenalin (NOR), ATP i neuropeptid Y), dovode do kontrakcije krvnog suda (199). Aplikacija tetrodotoksina, koji sprečava provođenje nervnog impulsa blokadom Na-kanala u nervnim ćelijama, dovodi do potpune inhibicije kontrakcija HVS izazvanih ES, potvrđujući neurogenu prirodu ovih kontrakcija. Pored toga, mnogo ranije je pokazano da ES ne prouzrokuje nikakav odgovor segmenata umbilikalne arterije i vene koje nemaju inervaciju, dok NOR i 5-HT prouzrokuju kontrakcije ovih krvnih sudova (200, 201). Iz vezikula simpatičkog nervnog završetka zajedno se oslobađaju NOR i ATP, ispoljavajući aditivno dejstvo na vaskularni tonus. Međutim, udeo ATP-a u ovoj kontrakciji je manji od 15%. Suramin (antagonist P2x receptora) i fentolamin (antagonist α -adrenoceptora) značajno smanjuju kontrakcije do kojih dovodi ES (202).

Pinacidil dovodi do endotel-nezavisne inhibicije kontrakcija HVS dijabetičara prouzrokovane ES. Ova inhibicija kontrakcija je koncentracijski zavisna i aplikovanje najveće koncentracije pinacidila (100 μ M) dovelo je do potpune inhibicije kontrakcija ($E_{max} = 100\%$). Interesantno, aplikacija i 10 puta manje koncentracije pinacidila (10 μ M) izaziva preko 90% vazorelaksacije, ukazujući na povećanu reaktivnost i senzitivnost neurogene kontrakcije dijabetičnih HVS na pinacidil pri ES. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim na veni porti kunića primenom levkromakalima (128), kao i na HVS primenom kromakalima (203).

U cilju ispitivanja uloge pojedinih grupa kalijumovih kanala u antivazokonstriktornom efektu pinacidila kod HVS dijabetičara, koristili smo različite blokatore ovih kanala.

GLB, TEA, i 4-AP su korišćeni u cilju ispitivanja uloge K-kanala u inhibitornom efektu pinacidila na kontrakcije koje su izazvane ES. Sasvim očekivano GLB je blokirao K_{ATP} kanale na VGMC segmenata HVS onemogućavajući da pinacidil ostvari hiperpolarizaciju VGMC i na taj način podstakao neurogenu kontrakciju. Ovaj nalaz je u skladu sa primenom GLB (1 μ M) na veni porti kunića gde je antagonizovana inhibicija neurogenih i NOR kontrakcija bila prouzrokovana levkromakalimom (128). S druge strane, interesantni su rezultati dobijeni posle primene 4-AP koji je umanjio inhibitorno delovanje pinacidila na istom tipu kontrakcija, povećavajući senzitivnost preparata na pinacidil (pD_2 pinacidila 6.05 ± 0.12 vs. pD_2 pinacidila u prisustvu 4-AP 6.38 ± 0.09 , $P = 0.059$). Dobijena P vrednost pak ukazuje na neophodnost proširenja grupe ispitivanih segmenata (u

našem slučaju je bilo $n = 6$) kako bi dobijena statistička vrednost potvrdila ili opovrgla značajnost. Osim toga, treba uzeti u obzir da se Kv kanali otvaraju usled depolarizacije plazma membrane u VGMC, tj. ovi kanali se aktiviraju promenom napona membrane. U navedenim eksperimentima Kv kanali su bili blokirani što je sprečilo njihovu aktivaciju, kako postsinaptički na VGMC, tako i presinaptički na nivou nervnog završetka. Blokiranje Kv kanala na nervnim završecima pak može uticati na smanjeno oslobađanje NOR pod uticajem ES. Takođe, detekcija K-kanala na nervnim završecima ostavlja mogućnost da OKK ostvare svoje efekte delujući presinaptički. Pokazano je i da sam pinacidil inhibira oslobađanje NOR iz električki stimulisanih neurona *vas deferens* pacova (204). U istom istraživanju primena TEA u visokoj koncentraciji (10 μM) je antagonizovala efekat pinacidila (204). Manja koncentracija TEA (1 μM , selektivnija za BK_{Ca} kanale) primenjena u našim eksperimentima, nije antagonizovala inhibiciju ES kontrakcija prouzrokovanu pinacidilom. Antagonizovanje efekata primenom TEA u visokomolarnoj koncentraciji se može tumačiti potencijalnim neselektivnim blokiranjem ne samo K_{Ca} kanala već i drugih K-kanala (npr. Kv kanala) (155). Pokazano je da inhibitorni efekat pinacidila na oslobađanje NOR iz neurogenih kontrakcija biva poništen posle primene visoke koncentracije KCl rastvora (75 mM) ukazujući da se dati efekat ostvaruje kroz K-kanale. Takođe, demonstrirano je da pinacidil i kromakalim izazivaju hiperpolarizaciju membrane neurona i smanjuju oslobađanje neurotransmitera (205). Kako je i ranije uočeno da OKK mogu svoje efekte ostvariti i presinaptički i postsinaptički, naši eksperimenti ne mogu direktno ukazati i razgraničiti mogućnost prisustva jednih i drugih efekata pinacidila. Stoga je urađena kontrola sa spolja dodatim NOR koji deluje predominantno preko postsinaptičkih α receptora na membrani VGMC (168).

Višestruki pokušaji ES dijabetične ITA nisu dali očekivane rezultate. Kontrakcija ITA je izostala kako primenom niskih frekvencija (30 Hz) i standardnog napona od 80 mV, tako i pri pokušaju primene većih frekvencija (50 i 100 Hz). Tek retki preparati ITA dali su slabe neurogene kontrakcije pri primeni izuzetno visoke frekvencije (200 Hz). Iz navedenih razloga ovi eksperimenti su odbačeni. Dobijeni rezultati možda ukazuju na slabije izraženu neurogenu kontrolu kod ITA, nasuprot HVS ili slabiju perivaskularnu inervaciju. ITA je inervisana simpatičkim nervnim završecima za koje je pokazano da ne dolaze u direktan kontakt sa VGMC i da su lokalizovani u adventiciji što može objasniti slabiju sklonost ka razvoju spazma u poređenju sa drugim tipovima arterija, poput radijalne (206). Ipak, kod ITA je pokazano da je ES, tj. sama kontrakcija indukovana stimulacijom simpatičkog nervnog sistema posredstvom aktivacije $\alpha 1$ -adrenoreceptora (207), što ostavlja i mogućnost da dolazi do promene (smanjenja) u ekspresiji/funkciji ovih receptora na dijabetičnoj ITA.

Kao kontrola ES kontrakciji, dejstva pinacidila su ispitivana i na kontrakciji prouzrokovanoj spolja dodatim NOR (168). Izmenjena vaskularna reaktivnost na razne vazoaktivne agense uočena je u brojnim studijama na eksperimentalnim životinjskim modelima dijabetes melitusa. Utvrđena je povećana kontraktilnost krvnih sudova kod dijabetesa kako mehanizmima zavisnim od receptora, tako i receptor-nezavisnim mehanizmima. Kod ITA bez endotela utvrđeno je da su kontraktilni odgovori i osetljivost na NOR povećani u slučaju pacijenata sa DMT2. Nasuprot tome, kod HSV nije bilo takvih promena, bez obzira na prisustvo ili odsustvo endotela, u poređenju sa nedijabetičnim venama (103). Na ITA je pokazano da su predominantno ekspimirani $\alpha 1$ adrenoreceptori, koji su ciljno mesto vezivanja noradrenalina (207, 208).

Pinacidil je koncentracijski-zavisno inhibirao NOR-indukovane kontrakcije na bajpas graftovima, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima na animalnim i humanim krvnim sudovima (177, 209). U našem istraživanju antivazokonstriktornih efekata pinacidila na kontrakcije izazvane NOR na HVS dijabetičara uočen je slabiji efekat pinacidila na inhibiciju NOR-kontrakcija u poređenju sa neurogenim kontrakcijama izazvanim ES. Ovi nalazi su u skladu sa ispitivanjem istih efekata pinacidila na humanoj radijalnoj arteriji (127). Veća osetljivost neurogene kontrakcije HVS na inhibitorni efekat pinacidila nego NOR-kontrakcije, sugeriše da inhibicija oslobađanja različitih neurotransmitera može da bude vrlo važna u sprečavanju spazma grafta. Dok je kod ES kontrakcija

HVS, koncentracija pinacidila od 10 μM izazivala više od 90% inhibicije kontrakcija, a 100 μM pinacidila i potpunu inhibiciju, u slučaju NOR-kontrakcije primena najveće koncentracije pinacidila (100 μM) dovela je tek do inhibicije kontrakcije od oko 80%. Ispitujući dalje samo jednu koncentraciju pinacidila ($\text{IC}_{70} = 30 \mu\text{M}$) koja je dovela do snažne inhibicije NOR-kontrakcija, razmatrali smo ulogu K-kanala u tom efektu. Interesantno, svi primenjeni antagonisti K-kanala: GLB, TEA i 4-AP, su uticali na antivazokonstriktorni efekat pinacidila na fazne kontrakcije koje je izazivao NOR. Ovaj rezultat bi mogao da ukaže da K-kanali imaju bitnu ulogu u inhibitornom efektu pinacidila na NOR kontrakcije, što je izuzetno važno ako se uzme u obzir da je NOR jedan od najvažnijih endogenih cirkulišućih vazokonstriktora. Upravo su endogeni cirkulišući vazokonstriktori jedan od glavnih faktora koji dovodi do peri- i postoperativnog spazma bajpas grafta (210). Takođe, činjenica da veće koncentracije pinacidila kompletno inhibiraju neurogenu kontrakciju HVS usmeravaju nas ka ideji da pinacidil inhibira ES-kontrakcije ispitivanog krvnog suda na više različitih mesta, ali ostavlja prostor i za razmatranje mogućnosti da pinacidil deluje i na K-kanale u nervnom završetku (204).

Kod ITA, primena najveće koncentracije pinacidila (100 μM) dovela je tek do 65-70% inhibicije kontrakcije, ukazujući na manju osetljivost faznih kontrakcija izazvanih NOR na pinacidil. U ovom slabom antivazokonstriktornom efektu pinacidila moguće je da svoju ulogu imaju K_{ATP} i K_{Ca} kanali, dok je izostao efekat kroz K_{v} kanale. Ranije je i na humanoj radijalnoj arteriji demonstrirano da na fazne kontrakcije izazvane NOR pinacidil utiče delujući na K_{ATP} i K_{Ca} kanale, dok K_{v} kanali nisu bili uključeni u ove efekte (127). U tim istraživanjima korišćena je 10 puta manja koncentracija pinacidila koja je dovela tek do oko 25-30% inhibicije kontrakcije. Upotreba P1075 koji je potentni analog pinacidila, takođe, na ITA je potvrdila da je antivazokonstriktorni efekat P1075 na NOR-indukovane kontrakcije posredovan K_{ATP} kanalima na VGMĆ (112).

ZAKLJUČCI

1. Pinacidil ima vazodilatatorno i antivazokonstriktorno dejstvo na ispitivanim humanim bajpas graftovima. Prisustvo dijabetesa utiče na razlike u relaksantnim efektima pinacidila na HVS kod osoba muškog pola. Takođe, gojaznost može biti jedan od faktora koji dovodi do razlika u vazodilatatornim efektima pinacidila na HVS NDM pacijenata muškog pola. Nije bila prisutna razlika u relaksantnim efektima pinacidila između polova, a nije uočeno ni postojanje razlike u zavisnosti od toga da li je pacijent insulin-zavisan ili uzima samo oralne antidijabetike.
2. Vazodilatatorni i antivazokonstriktorni efekti pinacidila se delimično ostvaruju interakcijom sa K-kanalima. Pinacidil ostvaruje uporedivu relaksaciju HVS pacijenata sa i bez DMT2. Takođe, pinacidil prouzrokuje relaksaciju dijabetične ITA uporedivu sa dijabetičnom HVS, bez razlike u senzitivnosti. Drugi OKK, P1075, kao i NS1619, na koncentracijski-zavisan način relaksiraju HVS delujući na K_{ATP} , odnosno BK_{Ca} kanale. P1075 možda ima i dodatne mehanizme dejstva koji su nezavisni od K_{ATP} kanala.
3. Pinacidil stvara uporedivu relaksaciju HVS posredovanu K_{ATP} kanalima kod pacijenata i sa i bez DMT2. Veća osetljivost na GLB HVS kod pacijenata sa NDM verovatno je povezana sa većom ekspresijom funkcionalnih K_{ATP} kanala u vaskularnom glatkom mišiću (SUR2B / Kir6.1). Ovo može implicirati da prisustvo dijabetesa smanjuje nivo ekspresije SUR2B subjedinice. Potvrda ovih nalaza na široj grupi segmenata HVS je potrebna, kao i detaljna analiza koja bi uključila i podelu segmenata HVS u zavisnosti od tipa antidijabetika (oralni vs. insulin) korišćenih za tretman DMT2.
4. Kod ITA dijabetičnih pacijenata, pinacidil izaziva relaksaciju predominantno interagujući sa K_v kanalima, i to $K_v1.0 - K_v4.0$. Ulogu u ovoj relaksaciji nema $K_v1.3$ kanal niti BK_{Ca} kanal. Dodatno, kao potvrda izostanka vazorelaksantnog efekta pinacidila na dijabetičnim ITA detektovana je značajno manja ekspresija Kir6.1 subjedinice, u poređenju sa uzorcima ITA pacijenata bez dijabetesa. Takođe, pored uočene smanjene ekspresije Kir6.1 subjedinice bila je smanjena i ekspresija Kir6.2 subjedinice, ali kod NDM pacijenata. Potrebno je dodatnim farmakološkim eksperimentima na široj grupi ITA pacijenata bez dijabetesa potvrditi ovaj rezultat.
5. Antivazokonstriktorni mehanizmi delovanja pinacidila na fazne kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom su posredovani K-kanalima na ispitivanim bajpas graftovima. Kod HVS dijabetičnih pacijenata u mehanizme delovanja pinacidila su uključene sve tri ispitivane grupe K-kanala: K_{ATP} , K_v i K_{Ca} , dok je kod ITA dijabetičnih bolesnika, potvrđena uloga K_{ATP} i K_{Ca} kanala. Kada je u pitanju antivazokonstriktorni efekat, uočena je manja senzitivnost na pinacidil kod arterijskog grafta u poređenju sa graftom vene. Kada su fazne kontrakcije bile prouzrokovane električnom stimulacijom kod HVS bolesnika sa DMT2, potvrđena je isključivo uloga K_{ATP} kanala. Električna stimulacija dijabetične ITA nije bila

moguća. Dodatni eksperimenti na nedijabetičnim graftovima bi ukazali na potencijalne sličnosti/razlike u efektima među nedijabetičnim i dijabetičnim krvnim sudovima.

6. Pinacidil svoje vazodilatatorne efekte na bajpas graftovima ostvaruje delom kroz K-kanale potvrđujući da svoj pun efekat ostvaruje i kroz mehanizme nezavisne od K-kanala. Potvrđeno je da primena pinacidila u koncentracijama višim od 1 μM u prisustvu rastvora sa visoko molarnom koncentracijom K jona relaksira bajpas graftove mehanizmima nezavisnim od K-kanala. U slučaju HVS možemo isključiti ulogu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumpe u ovim efektima. Potencijalnu ulogu u K-nezavisnim efektima pinacidila imaju voltažno-zavisni Ca-kanali L-tipa, posebno kod nedijabetične HVS, ukazujući na neophodnost daljih ispitivanja kako bi se potvrdila/opovrgla potencijalna razlika u ekspresiji ovih kanala između HVS pacijenata sa i bez DMT2.
7. Dobijeni rezultati naše studije mogu biti klinički korisni pružajući dokaz da dijabetes izaziva oslabljenu dilataciju humane vene, ali i arterije interakcijom sa K_{ATP} kanalima. Ovakva smanjena vazodilatacija, može se povezati i sa vaskularnim komplikacijama izazvanim dijabetesom, kao što su vazospazam ili hipertenzija. Shodno tome, kako se segmenti velike vene safene i unutrašnje torakalne arterije koriste kao graftovi u bajpas operaciji, dobijeni rezultati, takođe, ukazuju na to da izmenjena dilatacija koja se odvija posredstvom K_{ATP} može igrati bitnu ulogu u odabiru/definisanju karakteristika grafta kod pacijenata sa DMT2. Time bismo mogli preciznije da predvidimo funkcionalnost odabranog grafta i nekoliko godina nakon operacije.

LITERATURA

1. MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett* 2003; 555(1): 62-65.
2. Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, et al. Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: Impact on clinical management part iii. *Circulation* 1999; 99(5): 674-681.
3. Millar ID, Bruce J, Brown PD. Ion channel diversity, channel expression and function in the choroid plexuses. *Cerebrospinal Fluid Res* 2007; 4: 8.
4. Hill CE. Inward rectification and vascular function: As it was in the beginning. *J Physiol* 2008; 586(6): 1465-1467.
5. Jahangir A, Terzic A. K(atp) channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39(1): 99-112.
6. Protić D, Todorović Z, Gojković-Bukarica L. Kalijumovi kanali kao ciljno mesto za delovanje lekova u terapiji kardiovaskularnih oboljenja - 25 godina kasnije. *Sanamed* 2013; 8(1): 71-78.
7. Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279(5): F793-801.
8. Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 2005; 12(1): 113-127.
9. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. 1992.
10. Zhong YS, Wang J, Liu WM, Zhu YH. Potassium ion channels in retinal ganglion cells (review). *Mol Med Rep* 2013; 8(2): 311-319.
11. Gojković-Bukarica L, Kažić T. Jonski kanali i kanalopatije. In: Kažić T, Ostojić M, editors. Klinička kardiovaskularna farmakologija. 4 ed. Beograd: Inegra; 2004.
12. Sandhiya S, Dkhar SA. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res* 2009; 129(3): 223-232.
13. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4): 557-594.
14. Dogan MF, Yildiz O, Arslan SO, Ulusoy KG. Potassium channels in vascular smooth muscle: A pathophysiological and pharmacological perspective. *Fundam Clin Pharmacol* 2019; 33(5): 504-523.
15. Oonuma H, Iwasawa K, Iida H, et al. Inward rectifier k(+) current in human bronchial smooth muscle cells: Inhibition with antisense oligonucleotides targeted to kir2.1 mrna. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26(3): 371-379.
16. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of k+ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 2008; 44(2): 65-81.
17. Werner ML, J. K+ channels in biological processes: Vascular k+ channels in the regulation of blood pressure. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research* 2014; 7: 51-60.
18. Noma A. Atp-regulated k+ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305(5930): 147-148.
19. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: Mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 2000; 92(6): 1731-1739.
20. Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A, Soria B. Nuclear katp channels trigger nuclear ca(2+) transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(14): 9544-9549.
21. Quayle JM, Standen NB. Katp channels in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 1994; 28(6): 797-804.

22. Löffler-Walz C, Hambroek A, Quast U. Interaction of k(atp) channel modulators with sulfonylurea receptor sur2b: Implication for tetramer formation and allosteric coupling of subunits. *Mol Pharmacol* 2002; 61(2): 407-414.
23. Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T, Ueda K. Different binding properties and affinities for atp and adp among sulfonylurea receptor subtypes, sur1, sur2a, and sur2b. *J Biol Chem* 2000; 275(37): 28757-28763.
24. Babenko AP, Gonzalez GC, Bryan J. Hetero-concatemeric kir6.X4/sur14 channels display distinct conductivities but uniform atp inhibition. *J Biol Chem* 2000; 275(41): 31563-31566.
25. Teramoto N, Zhu HL, Shibata A, et al. Atp-sensitive k⁺ channels in pig urethral smooth muscle cells are heteromultimers of kir6.1 and kir6.2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(1): F107-117.
26. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268(5209): 423-426.
27. Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of sur2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular katp channels. *Diabetes* 1996; 45(10): 1439-1445.
28. Fujita H, Ogura T, Tamagawa M, et al. A key role for the subunit sur2b in the preferential activation of vascular katp channels by isoflurane. *Br J Pharmacol* 2006; 149(5): 573-580.
29. Nichols CG. Katp channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 2006; 440(7083): 470-476.
30. Akrouh A, Halcomb SE, Nichols CG, Sala-Rabanal M. Molecular biology of k(atp) channels and implications for health and disease. *IUBMB Life* 2009; 61(10): 971-978.
31. de Wet H, Fotinou C, Amad N, Dreger M, Ashcroft FM. The atpase activities of sulfonylurea receptor 2a and sulfonylurea receptor 2b are influenced by the c-terminal 42 amino acids. *Febs j* 2010; 277(12): 2654-2662.
32. Ammälä C, Moorhouse A, Gribble F, et al. Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* 1996; 379(6565): 545-548.
33. Hambroek A, Löffler-Walz C, Quast U. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: Dependence on adenine nucleotides. *Br J Pharmacol* 2002; 136(7): 995-1004.
34. Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marbán E, Seharaseyon J. Pharmacological comparison of native mitochondrial k(atp) channels with molecularly defined surface k(atp) channels. *Mol Pharmacol* 2001; 59(2): 225-230.
35. Shi WW, Yang Y, Shi Y, Jiang C. K(atp) channel action in vascular tone regulation: From genetics to diseases. *Sheng Li Xue Bao* 2012; 64(1): 1-13.
36. Cole WC, Clément-Chomienne O. Atp-sensitive k⁺ channels of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14(1): 94-103.
37. Zhang HL, Bolton TB. Two types of atp-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1996; 118(1): 105-114.
38. Beech DJ, Zhang H, Nakao K, Bolton TB. K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1993; 110(2): 573-582.
39. Zhang H, Bolton TB. Activation by intracellular gdp, metabolic inhibition and pinacidil of a glibenclamide-sensitive k-channel in smooth muscle cells of rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1995; 114(3): 662-672.
40. Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H. International union of pharmacology. Lii. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4): 463-472.
41. Verónica M, Aiello EA, Rebolledo A, Gomez Alvis A, Grassi de Gende AO. Role of a ca²⁺-activated k⁺ current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells. *Pflügers Archiv* 1999; 437(3): 455-461.

42. Tseng-Crank J, Foster CD, Krause JD, et al. Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca^{2+} -activated K^+ channel isoforms from human brain. *Neuron* 1994; 13(6): 1315-1330.
43. Brainard AM, Korovkina VP, England SK. Potassium channels and uterine function. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18(3): 332-339.
44. Chen L, Tian L, MacDonald SH, et al. Functionally diverse complement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel (bk) α -subunits generated from a single site of splicing. *J Biol Chem* 2005; 280(39): 33599-33609.
45. Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M, et al. Primary sequence and immunological characterization of β -subunit of high conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel from smooth muscle. *J Biol Chem* 1994; 269(25): 17274-17278.
46. Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, et al. Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 2000; 407(6806): 870-876.
47. Barrett JN, Magleby KL, Pallotta BS. Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Physiol* 1982; 331(1): 211-230.
48. Cox DH, Cui J, Aldrich RW. Allosteric gating of a large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *J Gen Physiol* 1997; 110(3): 257-281.
49. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, et al. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995; 270(5236): 633-637.
50. Pérez GJ, Bonev AD, Patlak JB, Nelson MT. Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Gen Physiol* 1999; 113(2): 229-238.
51. Wellman GC, Nelson MT. Signaling between sr and plasmalemma in smooth muscle: Sparks and the activation of Ca^{2+} -sensitive ion channels. *Cell Calcium* 2003; 34(3): 211-229.
52. Löhn M, Jessner W, Fürstenau M, et al. Regulation of calcium sparks and spontaneous transient outward currents by $ryr3$ in arterial vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2001; 89(11): 1051-1057.
53. Sorensen CM, Braunstein TH, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302(5): F505-518.
54. Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992; 256(5056): 532-535.
55. Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI. The pharmacology and molecular biology of large-conductance calcium-activated (bk) potassium channels. *Adv Pharmacol* 1997; 37: 319-348.
56. Jackson WF. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. *Adv Pharmacol* 2017; 78: 89-144.
57. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, et al. International union of pharmacology. Liii. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4): 473-508.
58. Korovkina VP, England SK. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29(4): 317-323.
59. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biology* 2000; 1(4): reviews0004.0001.
60. Albarwani S, Nemetz LT, Madden JA, et al. Voltage-gated K^+ channels in rat small cerebral arteries: Molecular identity of the functional channels. *J Physiol* 2003; 551(Pt 3): 751-763.
61. Cidad P, Moreno-Domínguez A, Novensá L, et al. Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(6): 1203-1211.
62. Jackson WF. $K(v)$ channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation* 2018; 25(1).
63. Ohya S, Sergeant GP, Greenwood IA, Horowitz B. Molecular variants of $KCNQ$ channels expressed in murine portal vein myocytes: A role in delayed rectifier current. *Circ Res* 2003; 92(9): 1016-1023.

64. Greenwood IA, Yeung SY, Tribe RM, Ohya S. Loss of functional k⁺ channels encoded by ether-à-go-go-related genes in mouse myometrium prior to labour onset. *J Physiol* 2009; 587(Pt 10): 2313-2326.
65. Napp J, Pardo LA, Hartung F, Tietze LF, Stühmer W, Alves F. In vivo imaging of tumour xenografts with an antibody targeting the potassium channel k(v)10.1. *Eur Biophys J* 2016; 45(7): 721-733.
66. Testai L, Rapposelli S, Martelli A, Breschi MC, Calderone V. Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs. *Med Res Rev* 2015; 35(3): 520-553.
67. Köhler R, Kaistha BP, Wulff H. Vascular kca-channels as therapeutic targets in hypertension and restenosis disease. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(2): 143-155.
68. Maqoud F, Cetrone M, Mele A, Tricarico D. Molecular structure and function of big calcium-activated potassium channels in skeletal muscle: Pharmacological perspectives. *Physiol Genomics* 2017; 49(6): 306-317.
69. Humphries ES, Dart C. Neuronal and cardiovascular potassium channels as therapeutic drug targets: Promise and pitfalls. *J Biomol Screen* 2015; 20(9): 1055-1073.
70. Panyi G, Possani LD, Rodríguez de la Vega RC, Gáspár R, Varga Z. K⁺ channel blockers: Novel tools to inhibit t cell activation leading to specific immunosuppression. *Curr Pharm Des* 2006; 12(18): 2199-2220.
71. Quesada I, Soria B. Intracellular location of katp channels and sulphonylurea receptors in the pancreatic beta-cell: New targets for oral antidiabetic agents. *Curr Med Chem* 2004; 11(20): 2707-2716.
72. Tsang SY, Yao X, Wong CM, Au CL, Chen ZY, Huang Y. Contribution of na⁺ -ca²⁺ exchanger to pinacidil-induced relaxation in the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2003; 138(3): 453-460.
73. Lawson K. Potassium channel activation: A potential therapeutic approach? *Pharmacol Ther* 1996; 70(1): 39-63.
74. Ahnfelt-Rønne I. Pinacidil: History, basic pharmacology, and therapeutic implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12 Suppl 2: S1-4.
75. Bray KM, Newgreen DT, Small RC, et al. Evidence that the mechanism of the inhibitory action of pinacidil in rat and guinea-pig smooth muscle differs from that of glyceryl trinitrate. *Br J Pharmacol* 1987; 91(2): 421-429.
76. Quast U. Do the k⁺ channel openers relax smooth muscle by opening k⁺ channels? *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14(9): 332-337.
77. Brayden JE. Functional roles of katp channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29(4): 312-316.
78. Ritchie AK. Two distinct calcium-activated potassium currents in a rat anterior pituitary cell line. *J Physiol* 1987; 385: 591-609.
79. Walsh KB. Targeting cardiac potassium channels for state-of-the-art drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10(2): 157-169.
80. Rendell M. The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2004; 64(12): 1339-1358.
81. Kazić T, Gojković-Bukarica L. [potassium channels and the development of new drugs]. *Med Pregl* 1998; 51(11-12): 481-488.
82. Novakovic R, Milovanovic S, Protic D, Djokic J, Heinle H, Gojkovic-Bukarica L. The effect of potassium channel opener pinacidil on the non-pregnant rat uterus. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101(3): 181-186.
83. Devine CE, Somlyo AV, Somlyo AP. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J Cell Biol* 1972; 52(3): 690-718.
84. Lewis DH, Mellander S. Competitive effects of sympathetic control and tissue metabolites on resistance and capacitance vessels and capillary filtration in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 1962; 56(2): 162-188.

85. Mellander S, Lewis DH. Effect of hemorrhagic shock on the reactivity of resistance and capacitance vessels and on capillary filtration transfer in cat skeletal muscle. *Circ Res* 1963; 13: 105-118.
86. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart disease and stroke statistics 2019 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2019; 139(10): e56-e528.
87. Perić MS. Hirurška revaskularizacija ishemičnog miokarda. Beograd: Medicinski fakultet; 2013.
88. Diodato M, Chedrawy EG. Coronary artery bypass graft surgery: The past, present, and future of myocardial revascularisation. *Surg Res Pract* 2014; 2014: 726158.
89. Tatić V, Kanjuh V, Rafajlovski S, Šušćević D, Ilić R. Morfološke promene u aortokoronarnom venskom graftu - analiza autopsijskog i biopsijskog materijala. *Vojnosanitetski preglad* 2004; 61(5): 499-506.
90. Downing SW, Edmunds LH, Jr. Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992; 54(6): 1236-1243.
91. He GW, Yang CQ. Comparison among arterial grafts and coronary artery. An attempt at functional classification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109(4): 707-715.
92. Rosenfeldt FL, He GW, Buxton BF, Angus JA. Pharmacology of coronary artery bypass grafts. *Ann Thorac Surg* 1999; 67(3): 878-888.
93. He GW. Arterial grafts: Clinical classification and pharmacological management. *Ann Cardiothorac Surg* 2013; 2(4): 507-518.
94. Raza S, Sabik JF, 3rd, Masabni K, Ainkaran P, Lytle BW, Blackstone EH. Surgical revascularization techniques that minimize surgical risk and maximize late survival after coronary artery bypass grafting in patients with diabetes mellitus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014; 148(4): 1257-1264; discussion 1264-1256.
95. Li X, Kong M, Jiang D, Dong A. Comparing coronary artery bypass grafting with drug-eluting stenting in patients with diabetes mellitus and multivessel coronary artery disease: A meta-analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2014; 18(3): 347-354.
96. Gurpinar T, Gok S. Vasodilator effects of cromakalim and ha 1077 in diabetic rat aorta. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13558.
97. Lu T, Ye D, He T, Wang XL, Wang HL, Lee HC. Impaired Ca^{2+} -dependent activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in the coronary artery smooth muscle cells of Zucker diabetic fatty rats. *Biophys J* 2008; 95(11): 5165-5177.
98. Nieves-Cintrón M, Syed AU, Nystoriak MA, Navedo MF. Regulation of voltage-gated potassium channels in vascular smooth muscle during hypertension and metabolic disorders. *Microcirculation* 2018; 25(1).
99. Nieves-Cintrón M, Syed AU, Buonarati OR, et al. Impaired Ca^{2+} channel function in native vascular smooth muscle from humans with type 2 diabetes. *Sci Rep* 2017; 7(1): 14058.
100. Li SS, Cui N, Yang Y, et al. Impairment of the vascular K_{ATP} channel imposes fatal susceptibility to experimental diabetes due to multi-organ injuries. *J Cell Physiol* 2015; 230(12): 2915-2926.
101. Remedi MS, Friedman JB, Nichols CG. Diabetes induced by gain-of-function mutations in the Kir6.1 subunit of the K_{ATP} channel. *J Gen Physiol* 2017; 149(1): 75-84.
102. Miura H, Wachtel RE, Loberiza FR, Jr., et al. Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: Reduced activity of ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 2003; 92(2): 151-158.
103. Yöntem O, Sahilli M, Karasu C, Özçelikay AT, Altan VM, Ari N. Troglitazone has no effect on K_{ATP} channel opener induced-relaxations in rat aorta and in human saphenous veins from patients with type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 68(5): 557-568.
104. Ren Y, Xu X, Wang X. Altered mRNA expression of ATP-sensitive and inward rectifier potassium channel subunits in streptozotocin-induced diabetic rat heart and aorta. *J Pharmacol Sci* 2003; 93(4): 478-483.

105. Sanborn BM, Ku CY, Shlykov S, Babich L. Molecular signaling through g-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12(7): 479-487.
106. Albuquerque AA, Carvalho MT, Evora PM, de Nadai TR, Celotto AC, Evora PR. In vitro reactivity ("organ chamber") of guinea pig tracheal rings-methodology considerations. *Ann Transl Med* 2016; 4(11): 216.
107. Yildiz O, Seyrek M, Polat GG, Macit E, Akgun OM. Encyclopedia of biomedical polymers and polymeric biomaterials dental polymers: Effects on vascular tone. In: Mishra M, editor. Encyclopedia of biomedical polymers & polymeric biomaterials. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2015.
108. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373-376.
109. Gojković Bukarica L, Kazić T, Sajić Z, et al. The effects of levcromakalim and pinacidil on the human internal mammary artery. *Fundam Clin Pharmacol* 1997; 11(6): 550-560.
110. Stojnic N, Gojkovic-Bukarica L, Peric M, et al. Potassium channel opener pinacidil induces relaxation of the isolated human radial artery. *J Pharmacol Sci* 2007; 104(2): 122-129.
111. Novaković A, Gojković-Bukarica L, Beleslin-Cokić B, et al. Differential antivasoconstrictor effects of levcromakalim and rilmakalim on the isolated human mammary artery and saphenous vein. *J Pharmacol Sci* 2003; 92(2): 108-114.
112. Gojkovic-Bukarica LC, Beleslin-Cokic BB, Novakovic AN, et al. The effects of potassium channel opener p1075 on the human saphenous vein and human internal mammary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 57(6): 648-655.
113. Stanišić J, Korićanac G, Čulafić T, et al. Low intensity exercise prevents disturbances in rat cardiac insulin signaling and endothelial nitric oxide synthase induced by high fructose diet. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 420: 97-104.
114. Gojkovic-Bukarica L, Markovic-Lipkovski J, Heinle H, et al. The red wine polyphenol resveratrol induced relaxation of the isolated renal artery of diabetic rats: The role of potassium channels. *Journal of Functional Foods* 2019; 52: 266-275.
115. Koch CG, Khandwala F, Nussmeier N, Blackstone EH. Gender profiling in coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126(6): 2044-2051.
116. Nielsen S, Giang KW, Wallinder A, et al. Social factors, sex, and mortality risk after coronary artery bypass grafting: A population-based cohort study. *Journal of the American Heart Association* 2019; 8(6): e011490-e011490.
117. Cornwell LD, Omer S, Rosengart T, Holman WL, Bakaeen FG. Changes over time in risk profiles of patients who undergo coronary artery bypass graft surgery: The veterans affairs surgical quality improvement program (vasqip). *JAMA surgery* 2015; 150(4): 308-315.
118. Porter KE, Riches K. The vascular smooth muscle cell: A therapeutic target in type 2 diabetes? *Clin Sci (Lond)* 2013; 125(4): 167-182.
119. Ranki HJ, Budas GR, Crawford RM, Jovanović A. Gender-specific difference in cardiac atp-sensitive k⁺ channels. *Journal of the American College of Cardiology* 2001; 38(3): 906-915.
120. Kocić I, Gruchała M, Petruszewicz J. Gender differences in effects of pinacidil but not diazoxide on heart automatism in the isolated guinea pig right atria. *Pol J Pharmacol* 2003; 55(3): 419-424.
121. Quast U, Stephan D, Bieger S, Russ U. The impact of atp-sensitive k⁺ channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 3: S156-164.
122. Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Identification of the high-affinity tolbutamide site on the sur1 subunit of the k(atp) channel. *Diabetes* 1999; 48(6): 1341-1347.
123. Engbersen R, Masereeuw R, van Gestel MA, et al. Differential effects of sulfonylurea derivatives on vascular atp-sensitive potassium channels. *Eur J Pharmacol* 2012; 681(1-3): 75-79.

124. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (ukpds 33). Uk prospective diabetes study (ukpds) group. *Lancet* 1998; 352(9131): 837-853.
125. Müller-Schweinitzer E, Reineke DC, Glusa E, Ebeigbe AB, Grapow MT, Carrel TP. Activated rho/rho kinase and modified calcium sensitivity in cryopreserved human saphenous veins. *Cryobiology* 2008; 57(1): 37-45.
126. Zimmermann PA, Knot HJ, Stevenson AS, Nelson MT. Increased myogenic tone and diminished responsiveness to atp-sensitive k⁺ channel openers in cerebral arteries from diabetic rats. *Circ Res* 1997; 81(6): 996-1004.
127. Gojkovic-Bukarica L, Savic N, Peric M, et al. Effect of potassium channel opener pinacidil on the contractions elicited electrically or by noradrenaline in the human radial artery. *Eur J Pharmacol* 2011; 654(3): 266-273.
128. Gojković-Bukarica L, Kazić T. Differential effects of pinacidil and levcromakalim on the contractions elicited electrically or by noradrenaline in the portal vein of the rabbit. *Fundam Clin Pharmacol* 1999; 13(5): 527-534.
129. Beattie DK, Gosling M, Davies AH, Powell JT. The effects of potassium channel openers on saphenous vein exposed to arterial flow. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998; 15(3): 244-249.
130. White RE, Carrier GO. Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels is enhanced in streptozotocin-diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253(3): 1057-1062.
131. Taylor PD, Oon BB, Thomas CR, Poston L. Prevention by insulin treatment of endothelial dysfunction but not enhanced noradrenaline-induced contractility in mesenteric resistance arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1994; 111(1): 35-41.
132. Tam ES, Ferguson DG, Bielefeld DR, Lorenz JN, Cohen RM, Pun RY. Norepinephrine-mediated calcium signaling is altered in vascular smooth muscle of diabetic rat. *Cell Calcium* 1997; 21(2): 143-150.
133. Atwal KS. Pharmacology and structure-activity relationships for katp modulators: Tissue-selective katp openers. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24 Suppl 4: S12-17.
134. Hart NJ, Weber C, Papas KK, Limesand SW, Vagner J, Lynch RM. Multivalent activation of glp-1 and sulfonylurea receptors modulates β -cell second-messenger signaling and insulin secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2019; 316(1): C48-c56.
135. Li H, Shin SE, Seo MS, et al. Alterations of atp-sensitive k⁽⁺⁾ channels in human umbilical arterial smooth muscle during gestational diabetes mellitus. *Pflugers Arch* 2018; 470(9): 1325-1333.
136. Yang Y, Li S, Konduru AS, et al. Prolonged exposure to methylglyoxal causes disruption of vascular katp channel by mrna instability. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 303(10): C1045-1054.
137. Li SS, Wu Y, Jin X, Jiang C. The sur2b subunit of rat vascular katp channel is targeted by mir-9a-3p induced by prolonged exposure to methylglyoxal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 308(2): C139-145.
138. Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, et al. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier kir6.1. *Nat Med* 2002; 8(5): 466-472.
139. Farzaneh T, Tinker A. Differences in the mechanism of metabolic regulation of atp-sensitive k⁺ channels containing kir6.1 and kir6.2 subunits. *Cardiovasc Res* 2008; 79(4): 621-631.
140. Seino S. Physiology and pathophysiology of k(atp) channels in the pancreas and cardiovascular system: A review. *J Diabetes Complications* 2003; 17(2 Suppl): 2-5.
141. Yoshida H, Feig JE, Morrissey A, Ghiu IA, Artman M, Coetzee WA. K atp channels of primary human coronary artery endothelial cells consist of a heteromultimeric complex of kir6.1, kir6.2, and sur2b subunits. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37(4): 857-869.
142. Isomoto S, Kondo C, Yamada M, et al. A novel sulfonylurea receptor forms with bir (kir6.2) a smooth muscle type atp-sensitive k⁺ channel. *J Biol Chem* 1996; 271(40): 24321-24324.
143. Reimann F, Gribble FM, Ashcroft FM. Differential response of k(atp) channels containing sur2a or sur2b subunits to nucleotides and pinacidil. *Mol Pharmacol* 2000; 58(6): 1318-1325.

144. Meisheri KD, Swirtz MA, Purohit SS, Cipkus-Dubray LA, Khan SA, Oleynek JJ. Characterization of k⁺ channel-dependent as well as -independent components of pinacidil-induced vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256(2): 492-499.
145. Cai B, Hao Q, Greenberg SS, et al. Differential effects of pinacidil and cromakalim on vascular relaxation and sympathetic neurotransmission. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72(7): 801-810.
146. Hill MA, Yang Y, Ella SR, Davis MJ, Braun AP. Large conductance, ca²⁺-activated k⁺ channels (bkca) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS Lett* 2010; 584(10): 2033-2042.
147. Hanner M, Schmalhofer WA, Munujos P, Knaus HG, Kaczorowski GJ, Garcia ML. The beta subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor for charybdotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(7): 2853-2858.
148. McGahon MK, Dash DP, Arora A, et al. Diabetes downregulates large-conductance ca²⁺-activated potassium beta 1 channel subunit in retinal arteriolar smooth muscle. *Circ Res* 2007; 100(5): 703-711.
149. Nystoriak MA, Nieves-Cintrón M, Nygren PJ, et al. Akap150 contributes to enhanced vascular tone by facilitating large-conductance ca²⁺-activated k⁺ channel remodeling in hyperglycemia and diabetes mellitus. *Circ Res* 2014; 114(4): 607-615.
150. Yi F, Wang H, Chai Q, et al. Regulation of large conductance ca²⁺-activated k⁺ (bk) channel β1 subunit expression by muscle ring finger protein 1 in diabetic vessels. *J Biol Chem* 2014; 289(15): 10853-10864.
151. Amberg GC, Santana LF. Downregulation of the bk channel beta1 subunit in genetic hypertension. *Circ Res* 2003; 93(10): 965-971.
152. 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(5): 717-724.
153. Bonnet S, Savineau JP, Barillot W, Dubuis E, Vandier C, Bonnet P. Role of ca(2+)-sensitive k(+) channels in the remission phase of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 60(2): 326-336.
154. Bychkov R, Gollasch M, Ried C, Luft FC, Haller H. Effects of pinacidil on k⁺ channels in human coronary artery vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 1): C161-171.
155. Smirnov SV, Beck R, Tammaro P, Ishii T, Aaronson PI. Electrophysiologically distinct smooth muscle cell subtypes in rat conduit and resistance pulmonary arteries. *J Physiol* 2002; 538(Pt 3): 867-878.
156. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268(4 Pt 1): C799-822.
157. Beech DJ, Bolton TB. A voltage-dependent outward current with fast kinetics in single smooth muscle cells isolated from rabbit portal vein. *J Physiol* 1989; 412: 397-414.
158. Chai Q, Liu Z, Chen L. Effects of streptozotocin-induced diabetes on kv channels in rat small coronary smooth muscle cells. *Chin J Physiol* 2005; 48(1): 57-63.
159. Chai Q, Xu X, Jia Q, et al. Molecular basis of dysfunctional kv channels in small coronary artery smooth muscle cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Chin J Physiol* 2007; 50(4): 171-177.
160. Ko EA, Park WS, Firth AL, Kim N, Yuan JX, Han J. Pathophysiology of voltage-gated k⁺ channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. *Prog Biophys Mol Biol* 2010; 103(1): 95-101.
161. Li H, Gutterman DD, Rusch NJ, Bubolz A, Liu Y. Nitration and functional loss of voltage-gated k⁺ channels in rat coronary microvessels exposed to high glucose. *Diabetes* 2004; 53(9): 2436-2442.
162. Bubolz AH, Li H, Wu Q, Liu Y. Enhanced oxidative stress impairs camp-mediated dilation by reducing kv channel function in small coronary arteries of diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(5): H1873-1880.

163. Rainbow RD, Hardy ME, Standen NB, Davies NW. Glucose reduces endothelin inhibition of voltage-gated potassium channels in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 2006; 575(Pt 3): 833-844.
164. Sargent CA, Sleph PG, Dzwonczyk S, Normandin D, Antonaccio MJ, Grover GJ. Cardioprotective effects of the cyanoguanidine potassium channel opener p-1075. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(4): 564-570.
165. Novakovic A, Pavlovic M, Milojevic P, et al. Different potassium channels are involved in relaxation of rat renal artery induced by p1075. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 111(1): 24-30.
166. Hu S, Kim HS. On the mechanism of the differential effects of ns004 and ns1608 in smooth muscle cells from guinea pig bladder. *Eur J Pharmacol* 1996; 318(2-3): 461-468.
167. Edwards G, Niederste-Hollenberg A, Schneider J, Noack T, Weston AH. Ion channel modulation by ns 1619, the putative bkca channel opener, in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1994; 113(4): 1538-1547.
168. Protić D, Beleslin-Čokić B, Novaković R, et al. Effect of wine polyphenol resveratrol on the contractions elicited electrically or by norepinephrine in the rat portal vein. *Phytother Res* 2013; 27(11): 1685-1693.
169. Holland M, Langton PD, Standen NB, Boyle JP. Effects of the bkca channel activator, ns1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1996; 117(1): 119-129.
170. Erne P, Hermsmeyer K. Modulation of intracellular calcium by potassium channel openers in vascular muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1991; 344(6): 706-715.
171. Spedding M, Cavero I. "Calcium antagonists": A class of drugs with a bright future. Part ii. Determination of basic pharmacological properties. *Life Sci* 1984; 35(6): 575-587.
172. Cairrão E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008; 376(5): 375-383.
173. He GW, Yang CQ. Hyperkalemia alters endothelium-dependent relaxation through non-nitric oxide and noncyclooxygenase pathway: A mechanism for coronary dysfunction due to cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1996; 61(5): 1394-1399.
174. He GW, Angus JA, Rosenfeldt FL. Reactivity of the canine isolated internal mammary artery, saphenous vein, and coronary artery to constrictor and dilator substances: Relevance to coronary bypass graft surgery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12(1): 12-22.
175. He GW, Yang CQ, Graier WF, Yang JA. Hyperkalemia alters edhf-mediated hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol* 1996; 271(2 Pt 2): H760-767.
176. Masuzawa K, Matsuda T, Asano M. Evidence that pinacidil may promote the opening of atp-sensitive k⁺ channels yet inhibit the opening of ca²⁺(+)-activated k⁺ channels in k⁽⁺⁾-contracted canine mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1990; 100(1): 143-149.
177. Mikkelsen E, Pedersen OL. Comparison of the effects of a new vasodilator pinacidil and nifedipine on isolated blood vessels. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1982; 51(5): 407-412.
178. Lytton J. Na⁺/ca²⁺ exchangers: Three mammalian gene families control ca²⁺ transport. *Biochem J* 2007; 406(3): 365-382.
179. Dong H, Jiang Y, Triggle CR, Li X, Lytton J. Novel role for k⁺-dependent na⁺/ca²⁺ exchangers in regulation of cytoplasmic free ca²⁺ and contractility in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(3): H1226-1235.
180. Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. The sodium/calcium exchanger family-slc8. *Pflugers Arch* 2004; 447(5): 543-548.
181. Hurtado C, Prociuk M, Maddaford TG, et al. Cells expressing unique na⁺/ca²⁺ exchange (ncx1) splice variants exhibit different susceptibilities to ca²⁺ overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(5): H2155-2162.
182. Tykocki NR, Jackson WF, Watts SW. Reverse-mode na⁺/ca²⁺ exchange is an important mediator of venous contraction. *Pharmacol Res* 2012; 66(6): 544-554.
183. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial atp-dependent potassium channels: Novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998; 97(24): 2463-2469.

184. Adebisi A, McNally EM, Jaggar JH. Sulfonylurea receptor-dependent and -independent pathways mediate vasodilation induced by atp-sensitive k⁺ channel openers. *Mol Pharmacol* 2008; 74(3): 736-743.
185. Mayhan WG. Effect of diabetes mellitus on response of the basilar artery to activation of atp-sensitive potassium channels. *Brain Res* 1994; 636(1): 35-39.
186. Bari F, Louis TM, Meng W, Busija DW. Global ischemia impairs atp-sensitive k⁺ channel function in cerebral arterioles in piglets. *Stroke* 1996; 27(10): 1874-1880; discussion 1880-1871.
187. Ghosh M, Hanna ST, Wang R, McNeill JR. Altered vascular reactivity and katp channel currents in vascular smooth muscle cells from deoxycorticosterone acetate (doca)-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44(5): 525-531.
188. Blanco-Rivero J, Gamallo C, Aras-López R, et al. Decreased expression of aortic kir6.1 and sur2b in hypertension does not correlate with changes in the functional role of k(atp) channels. *Eur J Pharmacol* 2008; 587(1-3): 204-208.
189. Stockbridge LL, French AS, Man SF. Subconductance states in calcium-activated potassium channels from canine airway smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1064(2): 212-218.
190. Malinowski M, Deja MA, Janusiewicz P, Golba KS, Roleder T, Wos S. Mechanisms of vasodilatory effect of perivascular tissue of human internal thoracic artery. *J Physiol Pharmacol* 2013; 64(3): 309-316.
191. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990; 259(1 Pt 1): C3-18.
192. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate atp-sensitive k⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989; 245(4914): 177-180.
193. Shao Y, Liew R, Guan B, et al. Different expression of large-conductance calcium-activated k⁺ channels in human internal mammary and radial arteries. *Cardiovasc Res* 2011; 89(2): 329-335.
194. Martens JR, Gelband CH. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and k⁺ channels in genetic and nongenetic hypertension. *Circ Res* 1996; 79(2): 295-301.
195. Rusch NJ, Runnells AM. Remission of high blood pressure reverses arterial potassium channel alterations. *Hypertension* 1994; 23(6 Pt 2): 941-945.
196. Liu Y, Pleyte K, Knaus HG, Rusch NJ. Increased expression of ca²⁺-sensitive k⁺ channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30(6): 1403-1409.
197. Novakovic A, Gojkovic-Bukarica L, Peric M, et al. The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery. *J Pharmacol Sci* 2006; 101(1): 85-90.
198. Hong da H, Li H, Kim HW, et al. Alterations of voltage-dependent k(+) channels in the mesenteric artery during the early and chronic phases of diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016; 43(9): 808-817.
199. Smyth L, Bobalova J, Ward SM, Keef KD, Mutafova-Yambolieva VN. Cotransmission from sympathetic vasoconstrictor neurons: Differences in guinea-pig mesenteric artery and vein. *Auton Neurosci* 2000; 86(1-2): 18-29.
200. Paterson G. The response to transmural stimulation of isolated arterial strips and its modification by drugs. *J Pharm Pharmacol* 1965; 17: 341-349.
201. Holman ME, Kasby CB, Suthers MB, Wilson JA. Some properties of the smooth muscle of rabbit portal vein. *J Physiol* 1968; 196(1): 111-132.
202. Sayet I, Neuilly G, Rakotoarisoa L, Mironneau C, Mironneau J. Relation between alpha 1-adrenoceptor subtypes and noradrenaline-induced contraction in rat portal vein smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1993; 110(1): 207-212.
203. de Moura RS, Jasbik W. Actions of cromakalim in isolated human saphenous vein. *Hypertension* 1992; 19(2 Suppl): Ii121-124.
204. Soares-da-Silva P, Fernandes MH. Inhibition by the putative potassium channel opener pinacidil of the electrically-evoked release of endogenous dopamine and noradrenaline in the rat vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990; 342(4): 415-421.

205. Cook NS, Quast U. Potassium channel pharmacology. In: Cook NS, editor. Potassium channels: Structure, classification, function, and therapeutic potential. New York: John Wiley and sons; 1990.
206. Reddy S, Kumar P, Prasad K. Histomorphometric and sympathetic innervation of the human internal thoracic artery. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(1): 131-136.
207. He GW, Shaw J, Hughes CF, et al. Predominant alpha 1-adrenoceptor-mediated contraction in the human internal mammary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21(2): 256-263.
208. He GW, Shaw J, Yang CQ, et al. Inhibitory effects of glyceryl trinitrate on alpha-adrenoceptor mediated contraction in the human internal mammary artery. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 34(3): 236-243.
209. Videbaek LM, Aalkjaer C, Mulvany MJ. Effect of pinacidil on norepinephrine- and potassium-induced contractions and membrane potential in rat and human resistance vessels and in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12 Suppl 2: S23-29.
210. He GW, Yang CQ, Starr A. Overview of the nature of vasoconstriction in arterial grafts for coronary operations. *Ann Thorac Surg* 1995; 59(3): 676-683.

SPISAK SKRAĆENICA KOJE SU KORIŠĆENE U TEKSTU

4-AP - 4-aminopirimidin

5-HT – 5-hidroksitriptamin, serotonin

Ach – acetilholin

ACE – angiotensin konvertujući enzim

ATP – adenzin-trifosfat

BCA – bicinoninska kiselina

BK_{Ca} – kalcijum-zavisni kalijumovi kanali velike provodljivosti

BKK – blokatori kalijumovi kanala

BMI – indeks telesne težine

°C – celzijus

Ca²⁺ - joni kalcijuma

Ca-kanali – kalcijumovi kanali

CABG – aorto-koronarni bajpas

CaCl₂ - kalcijum-hlorid

COX – ciklooksigenaza

DAG – diacilglicerol

dH₂O – destilovana voda

DMSO – dimetilsulfoksid

DMT2 – diabetes mellitus tip 2

EAG – ether-a-go-go

EC₅₀ – srednja efektivna koncentracija

EC₇₀ – efektivna koncentracija koja dovodi do relaksacije od 70%

ES – električna stimulacija

FE – fenilefrin

g – gram

GLB – glibenklamid

GMĆ – glatko-mišićna ćelija

h – čas

HCl – hlorovodonična kiselina

HRP – peroksidaza rena

HVS – humana vena safena

Hz – herc

IbTx – iberiotoksin

IC₅₀ – polovina maksimalne inhibitorne koncentracije

IC₇₀ – koncentracija koja dovodi do inhibicije od 70%

IHH – imunohistohemija

IK_{Ca} kanali – kalcijum senzitivni kalijumovi kanali srednje provodljivosti

IP₃ – inozitol-1,4,5-trifosfat

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

ITA – unutrašnja torakalna arterija

L – litar

K-kanali – kalijumovi kanali

K⁺ joni – joni kalijuma

K2P – kalijumovi kanali sa 2 pore

K_{ATP} kanali – ATP senzitivni kalijumovi kanali

K_{Ca} kanali – kalcijum senzitivni kalijumovi kanali

KCl – kalijum hlorid

KH₂PO₄ – kalijum dihidrogen fosfat

Kir kanali – ulazno ispravljajući kalijumovi kanali

Kv kanali – voltažno-zavisni kalijumovi kanali

KVS – kardiovaskularni sistem

M – mol

MGO – metilglioksal

MgSO₄ – magnezijum sulfat

MgTx – margatoksin

min – minut

ml – mililitar

Na⁺ - jon natrijuma

NaCl – natrijum hlorid

NaHCO₃ – natrijum hidrogen karbonat

NCX - Na⁺/Ca²⁺ pumpa

NDM – bez (non) diabetes mellitusa

NIF - nifedipin

NOR – noradrenalin

OKK – otvarač/i kalijumovih kanala

PAA – poliakrilamid

PAP – papaverin
PBS – fosfatni pufer
PCI – perkutana koronarna intervencija
 pD_2 – negativni logaritam od EC50
PI – fosfatidilinozitol
RIPA – radioimunoprecipitacioni esej
PKC – protein kinaza C
ROS – reaktivne kiseonične vrste
RyR – rijanodinski receptori
SD – standardna devijacija
SDS – natrijum dodecil sulfat
SEM – greška srednje vrednosti
 SK_{Ca} – kalcijum senzitivni kalijumovi kanali male provodljivosti
SR – sarkoplazmatski retikulum
STOC struje – spontano prolazno-izlazne struje
SUR – sulfonilurea receptorska subjedinica
TBS – Tris pufer
TBST – Tris pufer sa dodatkom Tweena
TEA – tetraetilamonijum hlorid
TM domen – transmembranski domen
TT – telesna težina
TV – telesna visina
WB – Western blot
V – volt
VGM - vaskularni glatki mišić
VGMĆ - vaskularna glatko-mišićna ćelija

DODATAK A

br.kartona

1. Inicijali pacijenta: _____

2. Pol: M Ž

3. Godište: _____

4. Th. pre op. _____

5. Dijabetes tip: I II

TT: _____

6. Pušač: DA NE BIVŠI

TV: _____

7. Hipertenzija: DA NE

8. Hiperlipoproteinemija: DA NE

Š.uk.

BIOGRAFIJA

Jovana Novica Rajković rođena je 02.03.1985. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu školu i gimnaziju, prirodno-matematički smer, završila je u Lazarevcu. Diplomirala je 2011. na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija, smeru Primenjena genetika. Eksperimentalni deo svog diplomskog rada odradila je na Stomatološkom fakultetu, u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku čiji je rukovodilac prof. dr Jelena Milašin. Dana 16.03.2011. godine odbranila je diplomski rad pod nazivom: "Analiza polimorfizama Pro47Ser i PIN Ins16bp p53 u keratocističnim odontogenim tumorima" sa ocenom 10 i prosečnom ocenom sa studija 9,14.

Jovana Rajković je od 1.11.2013. godine zaposlena na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu u svojstvu istraživača-saradnika u okviru nacionalnog projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Razvoj tehnologije proizvodnje crvenog vina i dijetetskih proizvoda iz vina bogatih biološki aktivnim polifenolima sa kardioprotektivnim dejstvima“ TR 31020 (ciklus 2011-2020. god.), čiji je rukovodilac prof. dr Ljiljana Gojković – Bukarica.

Doktorske studije upisala je na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na smeru Medicinska farmakologija, školske 2013/2014. godine.

Svoj naučno-istraživački rad je izlagala na više inostranih i domaćih kongresa, za čije učešće je nekoliko puta bila nosilac travel grantova. U više navrata boravila je na Institutu za fiziologiju, Univerziteta u Tibingenu, Nemačka u okviru saradnje sa članom projekta TR31020. Kao član Humboltovog bilateralnog projekta tokom ciklusa 2018.-2019. godine boravila je u dva navrata na stručnom usavršavanju na Max Planck Institutu za eksperimentalnu medicinu u Getingenu, Nemačka. Tokom pandemije korona virusom 2020. god. bila je volonter u HUO-YAN nacionalnoj laboratoriji za molekularnu detekciju infektivnih agenasa u Kliničkom centru Srbije, u Beogradu.

Živi, radi i uživa u Beogradu sa mužem i mačkom.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Jovana Rajković

broj upisa MF-04/13

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Efekti otvarača kalijumovih kanala na izolovane bajpas graftove bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.06.2020.

Jovana Rajković

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jovana Rajković

Broj upisa MF-04/13

Studijski program Medicinska farmakologija

Naslov rada Efekti otvarača kalijumovih kanala na izolovane bajpas graftove bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2

Mentor prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica

Potpisani Jovana Rajković

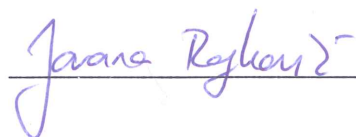
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, Jovana Rajković



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Efekti otvarača kalijumovih kanala na izolovane bajpas graftove bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.06.2020.

Jasna Rejković