



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јелена Кордић Бојиновић

„Значај модулације калијумских канала и азот  
моноксида (NO) у механизму релаксантног  
ефекта пинацидила и пентоксифилина“

Докторска дисертација

Крагујевац, 2013. година

*Изузетна ми је част да се најискреније захвалим:*

*Свом ментору, проф. др Слободану Миловановићу, који ме је увео у научно истраживачки рад и осмислио ову докторску тезу. Такође, дугујем му захвалност за несебичну стручну помоћ и пријатељску подршку коју ми је пружио у току израде овог рада, као и многих радова које смо презентовали на домаћим и међународним конгресима.*

*Колегиницама са Катедре за фармакологију Медицинског факултета у Фочи, на искреној и великој помоћи и корисним сугестијама да овај рад буде што бољи.*

*Лабораторијском техничару, г-ђи Милени Забуновић, за помоћ у експерименталном раду, као и за указано стрпљење и пријатељско разумевање.*

*Научном саветнику Института за биолошка истраживања „Синиша Становић“ на Одељењу за Физиологију, др Душку Благојевићу, на помоћи и сугестијама приликом статистичке обраде резултата.*

*Члановима комисије:*

*Председнику комисије, проф. др Слободану Јанковићу, који ме својим предавањима на модулу Експериментална и клиничка фармакологија припремио за научно истраживачки рад и дао смернице како приступити писању научних радова. Такође му се захваљујем на указаном поверењу када сам на Првом конгресу рационалне терапије у Крагујевцу, као студент докторских студија, први пут презентовала свој научни рад, што ми је дало подстрех за даља ангажовања у писању радова и учешћу на конгресима.*

*Проф. др Драгану Миловановићу, на корисним предавањима из области Експерименталне и клиничке фармакологије која су ми помогла да се одредим за предмет интересовања своје докторске тезе и који ме је својим позитивним ставом охрабрио да истрајем у научно истраживачком раду.*

*Проф. др Неђу Чутури, на сталном интересовању, подршци и подстреку да ова докторска теза буде што боља, као и на стручним саветима и сугестијама у току свих фаза израде ове докторске тезе.*

*Највећу захвалност дугујем својој породици на безграничној подршци и разумевању.*

*Овај истраживачки рад је урађен у фармаколошким лабораторијама на Високој Медицинској школи „Милутин Миланковић“ у Београду и на Медицинском факултету у Фочи.*

**САДРЖАЈ:**

<b>I. УВОД</b> .....	5
Фармакологија и физиологија глатког мишића утеруса .....	6
Карактеристике глатких мишића .....	8
Типови активности и инервација глатке мускулатуре .....	14
Молекуларни механизми контракције и релаксације глатке мишићне ћелије .....	16
Контракција глатког мишића .....	16
Молекуларна основа контракције мишића .....	18
Улога цикличних нуклеотида и калцијума .....	18
Значај слободних радикала и антиоксидативног система (AOS) за контракцију глатког мишића.....	22
Анатомско-хистолошке и хормонске особине утеруса .....	24
Анатомско/хистолошке специфичности утеруса пацова .....	24
Утицај хормона на репродуктивни циклус женке пацова .....	25
Особине контрактилне активности утеруса током еструса .....	26
<b>Азот моноксид (NO)</b> .....	27
Структура и синтеза NO .....	30
Улога NO у релаксацији глатких мишића (вазодилатација/токолиза) .....	32
Азот- моноксид као слободан радикал .....	33
Молекуларне интеракције NO и гванилатне циклазе/механизам деловања .....	34
L-аргинин .....	37
<b>Пентоксифин</b> .....	38
<b>Пинацидил</b> .....	38
<b>Протамин- сулфат</b> .....	39
Јонски канали/ <b>Калијумски канали</b> .....	40
Основне карактеристике калијумских канала .....	41
Структура калијумских канала .....	43
<i>Волтажно-зависни калијумски канали-<math>K_v</math></i> .....	47
<i>Касно исправљачки <math>K_v</math> канали</i> .....	49
<i>Калцијум-зависни калијумски канали</i> .....	51
<i>Добро-проводни калцијум-зависни калијумови канали (<math>BK_{Ca}</math>)</i> .....	51
<i>Слабо-проводни калцијум-зависни калијумови канали <math>SK_{Ca}</math></i> .....	54
<i>Улазно исправљачки калијумски (<math>K^+</math>) канали-<math>K_{ir}</math></i> .....	55
<i>Калијумски канали који се активирају посредством АТР (<math>K_{ATP}</math>)</i> .....	56
<i><math>K^+</math> канали са четири трансмембранска домена и две поре (двопорни калијумски канали)</i> .....	59
<i>Карактеристике калијумских канала у утерусу</i> .....	60
<i><math>K_v</math></i> .....	61
<i><math>BK_{Ca}</math></i> .....	61
<i><math>K_{ATP}</math></i> .....	62
<i><math>K_{2P}</math></i> .....	62
<i>Експресија <math>K^+</math> канала за време еструса пацова</i> .....	63
<b>Садашње и потенцијалне индикације отварача/ОКК и блокатора/ВКК калијумских канала</b> .....	63
Отварачи калијумских канала .....	64
Блокатори калијумских канала .....	66

<b>II. РАДНА ХИПОТЕЗА</b> .....	68
<b>III. ЦИЉ РАДА</b> .....	68
<b>IV. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	70
Експериментални модел систем .....	71
Фармаколошке методе .....	71
Супстанце и раствори .....	75
Статистичка обрада података .....	75
<b>V. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	77
<b>I ПЕНТОКСИФИЛИН</b> .....	78
Утицај различитих типова активације утеруса на релаксантни ефекат пентоксифилина; .....	78
Утицај претретмана са L-аргинином на релаксантни ефекат растућих концентрација пентоксифилина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом; .....	81
Утицај претретмана метиленским плавим (МВ) на релаксантни ефекат растућих концентрација пентоксифилина; .....	84
Утицај блокатора калијумских канала, глибенкламида (GLB), 4-аминопиридина (4АР) и тетраетиламонијума (ТЕА), на релаксантни ефект пентоксифилина на спонтаној ритмичкој активности; .....	86
Утицај блокатора калијумских канала (глибенкламида, 4-аминопиридина и етраетиламонијума) на релаксантни ефект пентоксифилина на контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом; .....	88
Генерални закључак о експериментима са пентоксифилином. ....	89
<b>II ПРОТАМИН-СУЛФАТ</b> .....	92
Утицај типа активације утеруса на релаксантни ефекат растућих концентрација протамин- сулфата; .....	92
Утицај протамин-сулфата на контракције изолованог утеруса у присуству блокатора калијумских канала; .....	95
Утицај претретмана глибенкламидом на релаксацију спонтано активних утеруса изазвану растућим концентрацијама протамин- сулфата; .....	95
Утицај претретмана глибенкламидом на релаксантни ефект протамин-сулфата на Ca <sup>2+</sup> -индукованом типу активације утеруса; .....	97
Утицај претретмана тетра-етил-амонијумом (ТЕА) на релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтани и Ca <sup>2+</sup> -индуковани тип активације изолованог утеруса; .....	99
Утицај претретмана 4-амино-пиридином (4АР) на релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтани и Ca <sup>2+</sup> -индуковани тип активације изолованог утеруса пацова; .....	101
Утицај протамин-сулфата на спонтане контракције изолованог утеруса у присуству блокатора калијумских канала (GLB, ТЕА и 4-АР); .....	103
Утицај протамин-сулфата на контракције изолованог утеруса индуковане Ca <sup>2+</sup> у присуству блокатора калијумских канала (GLB, ТЕА и 4-АР); .....	105
Утицај претретмана метиленским плавим (МВ) на релаксантни ефекат растућих концентрација протамин-сулфата; .....	107
Утицај протамин-сулфата у присуству индометацина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова и спонтану активност индуковану калцијумом; .....	108
Генерални закључак о експериментима са протамин-сулфатом. ....	110



III ПИНАЦИДИЛ .....	112
Утицај типа активације утеруса на релаксантни ефекат пинацидила; .....	112
Утицај пинацидила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова индуковане калцијумом (0.018 mM) у присуству блокатора калијумских канала: GLB, TEA и 4-AP; .....	115
Утицај претретмана са различитим блокаторима калијумских канала на релаксантни ефект растућих концентрација пинацидила на спонтану ритмичку активност утеруса; .....	115
Утицај претретмана са различитим блокаторима калијумских канала на релаксантни ефект растућих концентрација пинацидила на $Ca^{2+}$ -индуковану активност утеруса; .....	117
Испитивање инхибиторног ефекта пинацидила у присуству метиленског плавила и L-NAME на спонтану ритмичку активност и $Ca^{2+}$ -индуковану активност изолованог утеруса пацова; .....	119
Испитивање инхибиторног ефекта пинацидила у присуству индометацина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова .....	121
Генерални закључак о експериментима са пинацидилем. ....	123
<b>VI. ДИСКУСИЈА</b> .....	126
САДРЖАЈ ДИСКУСИЈЕ .....	127
<b>ПЕНТОКСИФИЛИН</b> .....	128
Специфичности утицаја пентоксифилина на различите типове активације изолованог утеруса пацова (контракције проузроковане електричном пољном стимулацијом/неурогене контракције, егзогеним ацетилхолином, окситоцином и додавањем калцијума у медијум); ....	128
Специфичности инхибиције контрактилности утеруса/токолитици .....	130
Утицај пентоксифилина у присуству L-аргинина и метиленског плавила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом; .....	135
Утицај блокатора калијумских канала (глибенкламида, 4-аминопиридина и тетраетиламонијума) на релаксантни ефект пентоксифилина на спонтаној ритмичкој активности и на контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом; .....	137
<b>ПРОТАМИН СУЛФАТ</b> .....	141
Утицај претретмана са различитим блокаторима (TEA, 4AP и глибенкламид) калијумских канала (ВКК) на релаксантни ефект растућих концентрација протамина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом; .....	144
Утицај претретмана са глибенкламидом на релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтаним и $Ca^{2+}$ индукованим контракцијама изолованог утеруса; .....	144
Утицај претретмана тетра-етил-амонијумом (TEA) на релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтаним и $Ca^{2+}$ индукованим контракцијама изолованог утеруса; .....	144
Утицај претретмана 4-амино-пиридином (4AP) на релаксацију спонтано и $Ca^{2+}$ -индукованих активних утеруса; .....	145
Ефект протамин-сулфата у присуству индометацина. ....	146

<b>ПИНАЦИДИЛ</b> .....	147
Карактеристике утицаја пинацидила на различите типове активације изолованог утеруса пацова (контракције проузроковане електричном пољном стимулацијом /неурогене контракције/, ацетилхолином, додавањем калцијума у медијум и различитим концентрацијама КСl (50, 100 и 150 mM); .....	151
Испитивање инхибиторног ефекта пинацидила у присуству метиленског плавила (MP) на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова; .....	158
Испитивање инхибиторног ефекта пинацидила у присуству 10 $\mu$ M L-аргинина, L-NAME и индометацина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова; .....	160
Утицај претретмана са различитим блокаторима (TEA, 4AP и глибенкламид) калијумских канала (ВКК) на релаксантни ефект растућих концентрација пинацидила на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом .....	161
<b>VII. ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	173
Закључци о експериментима са пентоксифилином .....	174
Закључци о експериментима са протамин-сулфатом .....	175
Закључци о експериментима са пинацидиллом .....	176
<b>СКРАЋЕНИЦЕ</b> .....	180
<b>VIII. ЛИТЕРАТУРА</b> .....	181

# УВОД

## ФАРМАКОЛОГИЈА И ФИЗИОЛОГИЈА ГЛАТКОГ МИШИЋА УТЕРУСА

### Увод

Активност утеруса варира у зависности од тренутних функционалних потреба јединке (гестација, партум, пост партум). Током трудноће, глатки мишић утеруса у суштини мирује, једино слабе, неправилне контракције обезбеђују умерен тонус зида утеруса. За време и након порођаја, глатки мишић утеруса ствара снажне и уједначене контракције, како би омогућио излазак плода и одмах потом зауставио крварење. Сличне, али мање изражене промене се дешавају и током менструалног циклуса (Morrison *i sar.*, 1993).

Контрола миоетријске екситабилности је важан терапијски циљ код миоетријске дисфункције, будући да она може бити узрок превременог порођаја или побачаја, чија је инциденца висока и у развијеним земљама (Kalezić *i sar.*, 1993). Истраживања о генези и патогенези порођаја, помажу идентификацију нових места на која би могле да делују супстанце које модификују контрактилност глатког мишића утеруса. Такође, изнети су чврсти докази који подржавају становиште да јонски канали могу бити место за деловање различитих токолитика (Hall *i sar.*, 1997; Khan *i sar.*, 1998; Khan *i sar.*, 2001; Sanborn, 2000).

Познато је да се ткиво утеруса спонтано контрахује (постоји спора таласна активност, али и једноставни и комплексни акциони потенцијали) и може да, као и поједини миоцити, показује пејсмејкерску активност, која за основу има различите јонске струје (Hartmann *i sar.*, 1991; Novaković *i sar.*, 2007). Две суштинске особине које карактеришу понашање јонских канала су: отварање (енгл. *gating*), процес конформацијских промена каналског протеина и селективност, односно могућност дискриминације јона на основу величине и наелектрисања. Према врсти јона које пропуштају, јонски канали могу бити  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ , а на основу иницијатора отварања, волтажно-зависни и лиганд-зависни (Piper *i sar.*, 1990; Kažić *i Bukarića*, 1998).

Калијумски канали су богато заступљени у глаткој мускулатури органа, укључујући и утерус. Они имају широку дистрибуцију у свим проучаваним типовима ћелија и представљају основу многих целуларних процеса: регулишу ослобађање неуротрансмитера, побуђеност неурона, контролишу ритмику срца, лучење инсулина, транспорт епителних електролита, контракције глатке мускулатуре (Kažić *i Bukarića*, 1998; Milovanović *i sar.*, 2012). Једна од њихових главних функција је одржавање ћелијске екситабилности, тако што се деполаризујућим стимулусима супротставља излазна калијумска струја, проузрокујући хиперполаризацију или реполаризацију, омогућавајући постизање мембранског потенцијала мировања, што обезбеђује поновно генерисање акционог потенцијала (Kažić *i Bukarića*, 1998; Milovanović *i sar.*, 1988, 2012).

Због великог протока јона калијума кроз канал (106 до 108 јона у секунди), калијумски канали су опремљени сетом видљивих компоненти: пором, која је испуњена водом и омогућава да  $K^+$  јони „пливају“ кроз ћелијску мембрану; селективним филтером, који препознаје  $K^+$  јоне као стално присутне; „вратима“, која служе као прекидач између отворене и затворене конформације канала (Khan i sar., 2001; Novaković i sar., 2007; Sanborn, 2000).

Разумевање улоге коју калијумски канали имају у одржавању здравља и развоју болести почело је са знатним закашњењем у односу на остале типове јонских канала. Сада се са сигурношћу зна да, поремећаји њихове функције доприносе дисфункцији миометријске екситабилности, која је најчешћи узрок превременог порођаја или побачаја, као и дисменореје. (Khan i sar., 2001; Novaković i sar., 2007; Sanborn, 2000).

Значај модулације калијумских канала и азот монооксида, под дејством ендогених и екзогених фактора, су одлучујући у припреми утеруса за промене кроз које треба да прође, од нидације оплођеног овулума, раста ембриона, до смештаја фетуса који расте и на крају порођаја, за шта је неопходна изразита хиперплазија и хипертрофија глатког мишића утеруса. У том периоду нису пожељне превремене контракције, порођај мора да се деси на време, а након тога утерус врати у физиолошко стање пре гравидитета (Wray i sar., 2001, 2003; Wray, 1999, 2007).

Поремећај овако сложеног механизма, зачећа, трудноће и порођаја, на молекуларном нивоу, вероватно је последица промена у физиолошкој модулацији калијумских канала и азот монооксида, које могу утицати на плод. Тако на пример, сувише слабе или неуједначене контракције успоравају порођај или, ако се јаве прерано, могу довести до превременог порођаја или побачаја. С друге стране, прејаке контракције током порођаја могу изазвати хипоксију и смрт фетуса (Thomas i sar., 2000).

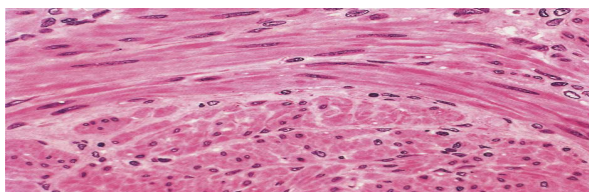
Међутим, и поред обиља научних чињеница о овом проблему, још увек се недовољно зна о патофизиолошким механизмима одговорним за нерегуларни порођај. Због тога, и поред интензивног проучавања, још немамо потпуне одговоре на сва питања која се тичу спречавања превременог побачаја или порођаја.

Велики број аутора верује да, применом нових или старих лекова о којима се данас више зна, односно откривају се нови механизми деловања који укључују модулацију калијумских канала и азот монооксида (NO), могу да се спрече неповољни исходи за трудноћу и плод. Тим новим потенцијалним лековима, о којима ће се говорити у овој докторској тези, на основу наших истраживања могуће је спречити превремени порођај или побачај, или кориговати предозирање окситоцином. Све ово указује да је, контрактилна активност утеруса феномен од изузетне физиолошке важности, као и важно оруђе за фармаколошка испитивања дејстава различитих контрактилних и релаксирајућих супстанци.

## КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋА

Постоје два основна типа мишића: попречно-пругаста и глатка мишићна влакна. Попречно-пругасти мишићи, у које спадају скелетни и срчани мишић, се одликују карактеристичним светлим и тамним пругама у цитоплазми. Насупрот томе, глатка мишићна влакна, која улазе у састав органа којима су потребне дуготрајне и споре контракције (бешика, утерус, репродуктивни и гастроинтестинални тракт, крвни судови, цилијарни мишић) су влакна без попречне испруганости, отуд назив „глатки“ мишићи. Контракција обе врсте мишићних влакана остварује се на сличан начин, али уз постојање неколико битних разлика у механизму мишићне контракције између ова два типа мишићних влакана, што значи да се глатки мишићи разликују од попречно-пругастих, како по својој хистолошкој грађи, тако и по функцији.

Глатка мускулатура настаје углавном од мезодерма. Међутим, мишићи аорте и плућних артерија потичу од ектомезенхима нервне кресте, док глатки мишићи коронарне артерије воде порекло од мезодерма (Bolton i sar., 1983, 1986).

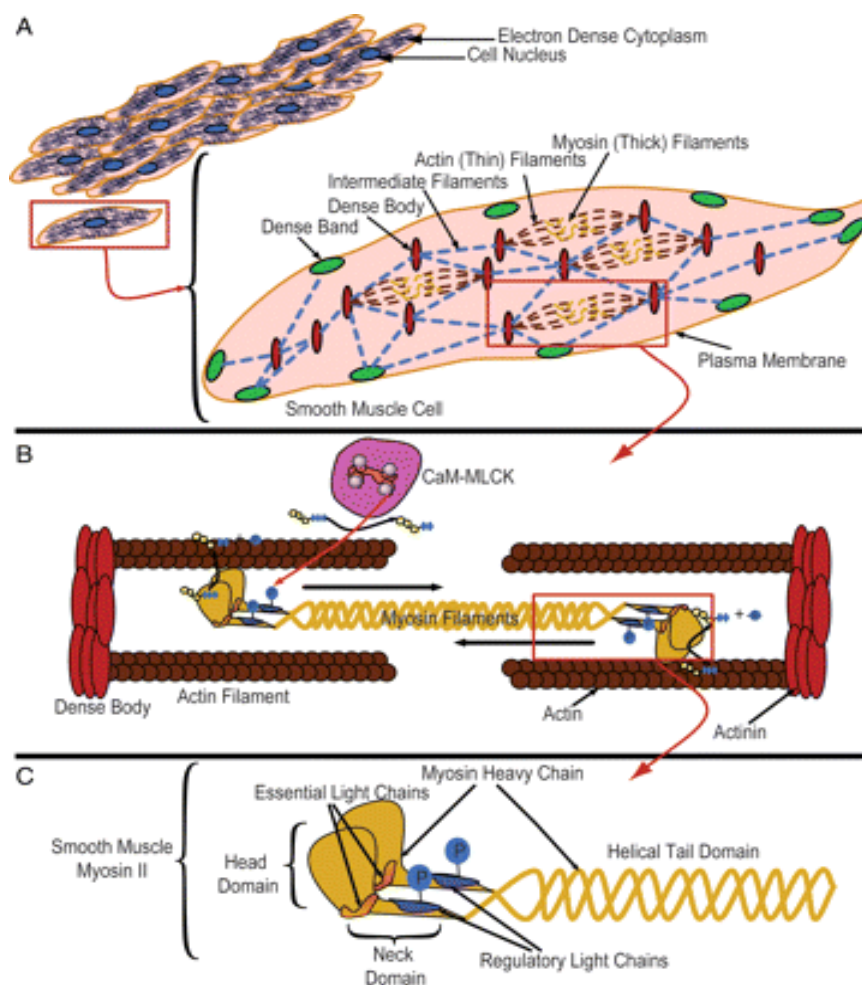


**Слика 1** Глатки мишић-хистолошки пресек

Глатки мишић је изграђен од издужених вретенастих ћелија, које се групишу у снопове различитих димензија, са карактеристичним везивним ткивом између њих. Између суседних ћелија налазе се танка колагена, еластична и ретикуларна влакна. У њиховој цитоплазми запажају се танки и дебели филаменти, постављени уздужно. Тамне аморфне масе, које се налазе између филамената или су приљубљене уз мембрану, симулирају Z-линију и представљају додирна места актинских и миозинских филамената. Између суседних ћелија уочавају се пукотинасте везе, које обезбеђују јонски континуитет (Bolton i sar., 1983, 1986), (сл. 1, 2А)

Глатки мишићи који су инервисани аутономним нервним системом имају већу еластичност и дуже одржавају контрактилно стање него попречно-пругасте мишићне ћелије, а уз то показују спонтану ритмичку активност. Контракtilна функција глатких мишића је кључна за функционисање многих органа. Тако на пример, спонтане перисталтичке контракције су одговорне за нормални крвни притисак (контракција глатких мишића артериола одређује

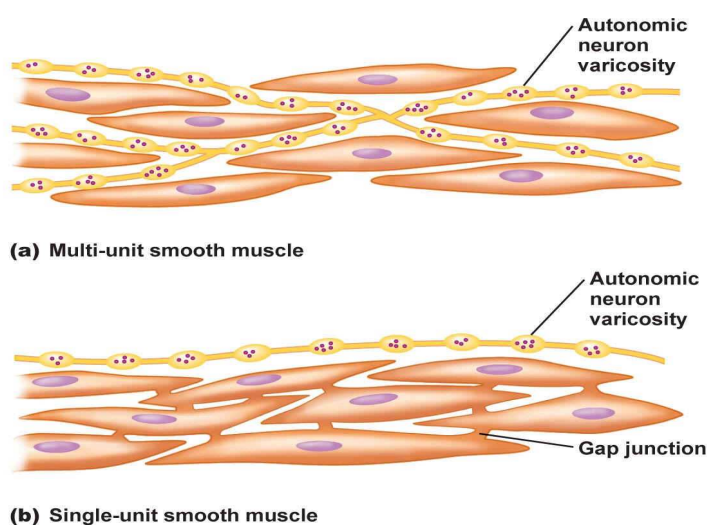
њихов дијаметар, а у артеријама углавном еластична својства зида), гравидитет, пасажу хране кроз дигестивни тракт, секрецију урина и жучи и количину светла у ретини (Šerban, 1995).



**Слика 2 ABC** Глатке мишићне ћелије које садрже само једно, централно постављено једро су вретенастог облика, дуга 20–500  $\mu\text{m}$  и дијаметра око 5  $\mu\text{m}$  (слика 2A). Међутим, попречно пругасти мишићи су ширине од 10–100 $\mu\text{m}$ . На хистолошком лонгитудиналном пресеку оно се уочава издужено, облика цигаре ако је ћелија релаксирана (слика 2B) , или облика вадичена ако је ћелија контрахована (слика 2C) (Welsch, 2006).

Висока еластичност је врло битна карактеристика глатких мишића, која омогућује њихову истегнутост, захваљујући томе што се лучи сложен екстрацелуларни матрикс од колагена, еластина, гликопротеина и протеогликана. Због тога, глатки мишићи имају специфичне рецепторе за еластин и колаген, како би интераговали са контрактилним протеинима. Одржавање димензија органа под притиском, омогућено је механичким везивањем ћелија једне за другу, везивним местима на сарколеми. Као последица повезаности, контракција једне ћелије, изазива делом контракцију суседне ћелије. Пукотинасте везе глатких мишићних ћелија повезују суседне ћелије, хемијски и електрично, олакшавајући ширење молекула (нпр. калцијум) или акционог потенцијала између ћелија (Guyton&Hall, pogl.8, 2003).

На основу различите организације влакана, а највише на основу горе наведене повезаности ћелија, глатки мишићи се могу поделити на једнојединичне и мултијединичне (сл. 3ab). Мишићна влакна која граде једнојединичне мишиће, а која се налазе у утерусу, гастроинтестиналном тракту и мокраћној бешици, али и облажу крвне судове (осим великих еластичних артерија), груписана су у густе траке, углавном тако да ужа страна једног влакна налаже на ширу страну суседног влакна, која међусобно комуницирају преко поменутих пукотинастих веза малог отпора, што омогућује врло брзу пропацију електричног импулса (потенцијала) кроз ткиво. Иако мембране тих ћелија пријањају једне уз друге, између њих постоје поменуте бројне пукотинасте везе, због чега једнојединични мишићи функционишу као целина, односно аутономни нервни систем инервише једну ћелију у оквиру листова или снопова у којима су организоване ћелије, и онда се акциони потенцијал шири пукотинастим везама на суседне ћелије, изазивајући контракцију целе групе ћелија, које омогућавају лако преношење акционог потенцијала. Овај тип мишића се стога назива још и синцицијални или висцерални глатки мишићи, јер они граде већину унутрашњих органа. Насупрот томе, мултијединичне глатке мишиће, који се налазе у трахеји, великим еластичним артеријама, али и у ирису ока, чине влакна чије плазма мембране нису у комуникацији преко пукотинастих веза јер се између њих налази везивно ткиво. Свако влакно је независно од осталих и често је инервисано појединачним нервним завршетком, као скелетна мишићна влакна. Као такви, они омогућују фину контролу и постепене одговоре, сличне моторним јединицама скелетних мишића. Спољашња површина ових влакана покривена је мембраном, коју чине колаген и гликопротеински фибрили, који помажу изолацију појединачних влакана (Sherwood, 2010; Welsch, 2009).

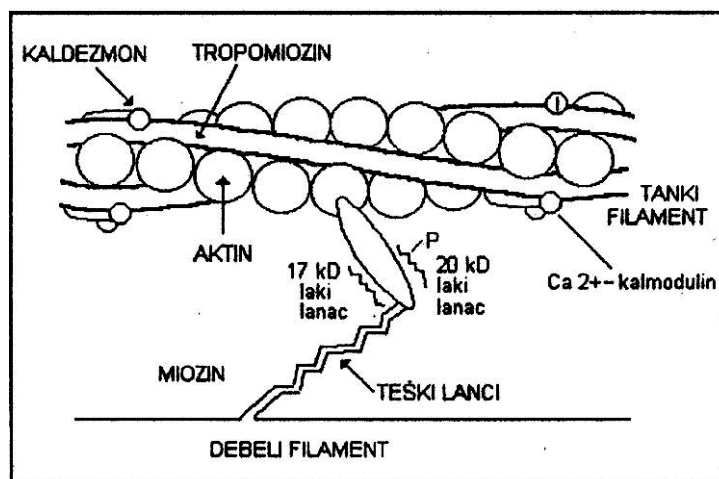


Слика 3 Вишејединични (a) и једнојединични (b) глатки мишићи



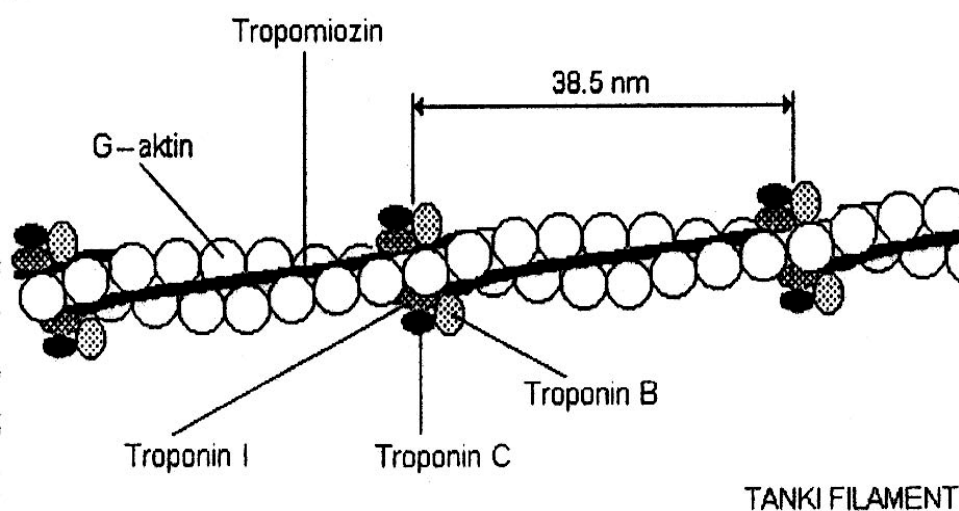
Контракtilни апарат глатких мишићних ћелија сачињавају дебели и танки миофиламенти, као и цитоскелет изграђен од интермедијарних филамената. Филаменти глатких мишића су сличне грађе као у попречно-пругастим мишићима, али другачије распоређени, не формирају саркомере, а танки и дебели миофиламенти су распоређени по целој ћелији. Дебеле миофиламенте гради миозин, а танке миофиламенте сачињавају молекули актина, тропомиозина и калдезмон, док је тропонин одсутан. Танки миофиламенти су спојени са густим телима (еквиваленте Z дискова), од којих су нека припојена за сарколему, а већина плива по цитоплазми (сл. 4). Чине их актин и тропомиозин. Дебели миофиламенти су саграђени од миозина. Миозинске главице су изграђене од тешких и лакких протеинских ланаца. Постоје четири лака ланца - два имају молекулску тежину од 17kD, а преостала два имају по 20kD. Лаки ланци од 20kD подлежу фосфорилацији при повећању нивоа јона калцијума и тако почиње контракција мишића. Цитоскелет глатких мишићних ћелија формира густа тела, која су смештена између миофиламената и богата су протеином  $\alpha$ -актинином. За њих се везују танки и интермедијарни филаменти. Густа тела су аналогна Z линијама попречно-пругастих мишића. На сарколеми глатких мишићних ћелија налазе се бројна везивна места, адхезивне плоче, које граде протеини винкулин и талин. За ова везивна места се везују филаменти актина и интермедијарни филаменти. Када актин и миозин интерагују, сила се преноси на сарколему. Тропонинску улогу (у скелетним мишићима), у глатким мишићима игра калдезмон, који везивањем за актин спречава спајање актина са миозином. Актин је код глатких мишићних ћелија знатно више присутан од миозина. За један миозин се везује око 13–14 влакана актина. Однос актин-миозин је око 6:1 у скелетним мишићима, 4:1 у срчаном мишићу и 16.5:1 у глатким мишићима.

Према теорији клизања, увлачење танких филамената међу дебеле, покреће контракцију. Танки филаменти се састоје из актина, тропомиозина и калдезмона (сл. 5). Молекули G-актина су глобуларни једноланчани протеини,  $M_r = 42 \text{ kD}$ , чији низ формира дволанчану завојницу. Тропомиозин је димерни протеин,  $M_r = 42 \text{ kD}$ , у облику траке која покрива локусе на актину који се везују за миозин. Калдезмон је димер,  $M_r = 120\text{--}150 \text{ kD}$ . Овај протеин је способан да везује двовалентне катјоне и да се фосфорилише (Welsch, 2009).



Слика 4 Шематски приказ главних контрактилних протеина у глатким мишићима. Акто-миозинска интеракција је примарно регулисана јонима  $Ca^{2+}$  преко  $Ca^{2+}$ - калмодулин-стимулисане фосфорилације на Р-ланцу. Калдезмон, који се такође може фосфорилисати и који може узети комплекс  $Ca^{2+}$ - калмодулин, вероватно има важну улогу у развоју и одржавању контракције (Bolton i sar., 1996; Welsch, 2009)

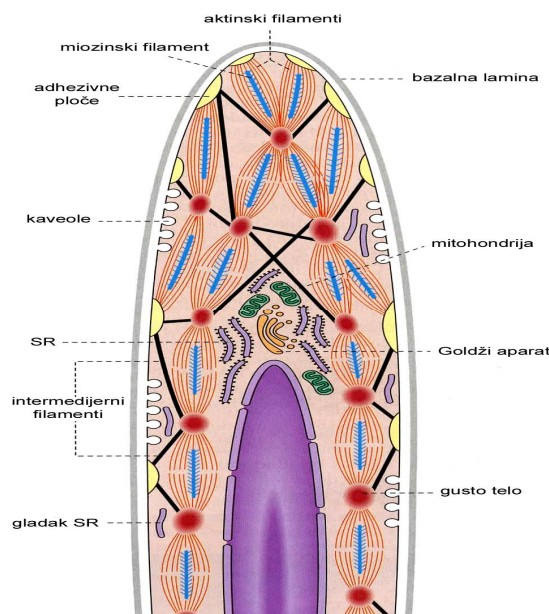
Иако је количина протеина у глатким мишићима знатно мања када се пореди са скелетним мишићима, и то посебно миозина (свега 20–30%), они развијају скоро исту силу при контраховању, али уз знатно дуже време. У заступљености актина и тропомиозина нема разлике, а познато је да тропонина нема у ћелијама глатких мишића, као ни Т-тубула. Секвенца аминокиселина, као и тродимензионална структура актина, веома је слична у обе врсте мишића (Obladen i sar., 2005).



Слика 5 Шематски приказ грађе танког филамента

Дебели филаменти састоје се искључиво од миозина (сл. 4). Миозин је хексамерни протеин, у чији састав улазе два тешка и четири лака ланца. Два молекула миозина се повезују својим репним деловима, док им се главе пружају из дебелог филамента и везују се за одређене локусе на актину. Ултраструктурне анализе су доказале да у састав главе улазе два пара лаких ланаца,  $M_r = 17 \text{ kD}$  и  $M_r = 20 \text{ kD}$ . Овај други ланац, означен као Р – ланац, може се фосфорилсати. Та је фосфорилација зависна од  $\text{Ca}^{2+}$ . Фосфорилација ових лаких ланаца, под дејством ензима миозин киназе лаког ланца (MLCK-myosin light chain kinase), под условом да је мишић стимулисан, започиње контракцију глатког мишића, при чему главица миозина постаје активирана. Протеин који исто има улогу у контрактилном апарату глатких мишића је калмодулин. Калмодулин везује  $\text{Ca}^{2+}$  и овај комплекс,  $\text{Ca}^{2+}$ -калмодулин, се потом везује за калдезмон и изазива његову фосфорилацију. Интермедијарне филаменте гради протеин дезмин, а у васкуларним глатким мишићима, осим дезмина и виментин. Постоје докази да се и фосфорилација калпоница и калдезмона дешава за време контракције глатког мишића. Ови танки филаменти су углавном инхибиторни при фосфорилацији калцијумом активиране миозин АТФ-азе. Постоје докази да се фосфорилацијом различитим киназама, калпонин и калдезмон, одвајају од актина, или им се мења њихова инхибиторна активност (Phillips i sar., 1995; Packer i sar., 1997; Deng i sar., 1993; Saez i sar., 1990; Simons i sar., 1991).

Доказано је и постојање три врсте тешких ланаца миозина: **SM-МНС** (smooth muscle myosine heavy chain) и то искључиво у глатким мишићним ћелијама, **NM-МНСА** и **NM-МНСВ** (non muscle myosine heavy chain). NM-МНСВ се налази у ембрионским глатким мишићима (SMemb) и у ћелијама глатких мишића које пролиферишу. NM-МНСА се налази у миоетријуму материце, глатким мишићима крвних судова, укључујући аорту и ductus arteriosus (Phillips i sar., 1995; Packer i sar., 1997; Deng i sar., 1993; Saez i sar., 1990; Simons i sar., 1991).



**Слика 6** Организација контрактилног апарата глатке мишићне ћелије

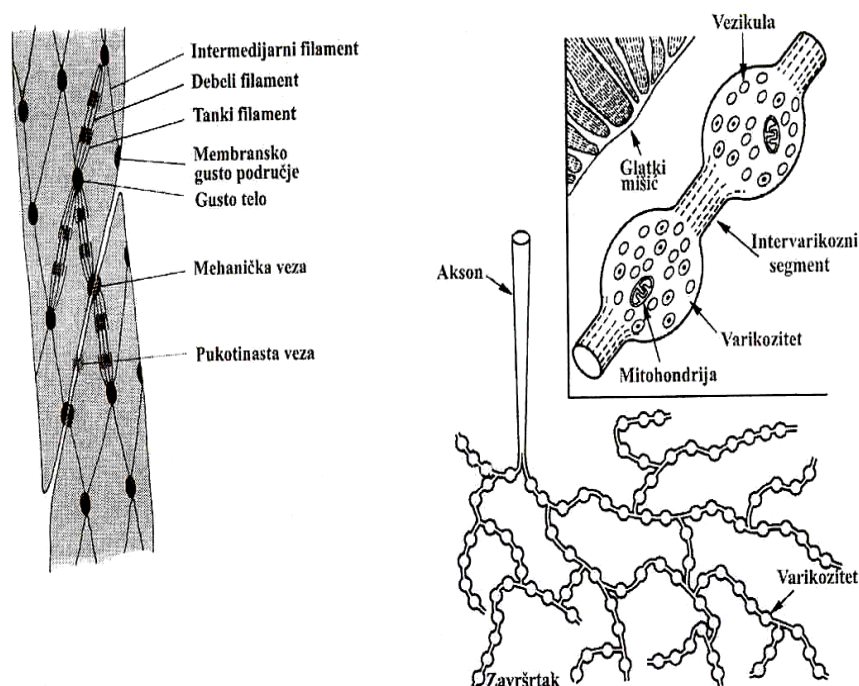
Мембране глатких мишићних ћелија се издвајају од осталих по великом броју инвагинација сарколеме, познате као липидни рафтови, који су нерастворљиви региони мембране, богати холестеролом и сфинголипидима. Висок ниво холестерола смањује флуидност у овим регионима, чинећи да они плутају у течнијим нерафт регионима и одатле и потиче њихов назив. Када је за рафтове везан протеин кавеолин-1, формирају се на површини мембране инвагинације облика  $\Omega$ , познате као кавеоле (сл. 6). О метаболичкој улози кавеола говори чињеница да се оне налазе у близини саркоплазматичног ретикулума или митохондрија. Инвагинације у саркоплазми садрже разноврсне рецепторе за простациклин, ендотелин, серотонин, мускарин, адреналин, али и јонске канале. Елиминацију и реорганизацију рафтова и кавеола може да изазове  $\beta$ -метил циклодекстрин (MCD), који издваја холестерол у хидрофобне одељке (Bergdahl i sar., 2004).

### Типови активности и инервација глатке мускулатуре

По типу контракције, као одговор на додавање раствора калијума хлорида (KCl) у купатило за изоловане органе, глатки мишићи се могу поделити на тоничне и фазне. Фазични глатки мишићи у гастроинтестиналном и урогениталном тракту контрахују се и опуштају брзо, док се тонични контрахују и опуштају полако, уз чување енергије, односно одржава се продужена контракција са мало утрошка енергије. Тако на пример, активација мишићних ћелија са KCl, доводи до јако брзе, пролазне контракције велике силе, а затим следи тонични тип контракције-значајно мање силе ( $1/3$  почетне силе) и мале брзине, која заправо представља брзину померања миозина дуж актина. Фазни тип контраховања омогућује кретање материја

кроз лумен гастроинтестиналног тракта током перисталтике. Фазични глатки мишићи у гастроинтестиналном и уrogenиталном тракту су регулисани цревним нервним системом и перисталтичким пејсмејкер ћелијама. Тонични тип контракције глатких мишића заступљен је у репродуктивном, дигестивном, респираторном и уринарном систему, али и кожи, очима и крвним судовима, при чему је ниво калцијума у овој фази активности мишића близу базалног нивоа (Morano i sar., 2000; Löfgren i sar., 2003; Mita i sar., 2002; Kupittayanant i sar., 2001).

Глатки мишићи су примарно под контролом аутономног нервног система, а скелетни под утицајем соматског нервног система. Једнојединични глатки мишићи имају пејсмејкерске регионе, у којима се контракције генеришу спонтано и ритмички. Влакна се контрахују потпуно усаглашено јер је једнојединични глатки мишић по форми синцицијум. С друге стране, мултијединичне глатке мишићне ћелије су инервисане симпатичким и парасимпатичким нервним влакнима, при чему на стимулусе одговарају независно један од другог. Поред нервне стимулације, контракција глатких мишића може бити изазвана оптерећењем - истезањем, струјом пукотинастих веза и хуморалним агенсима. Глатки мишићи, за разлику од скелетних, не поседују праве нервно-мишићне спојнице. Аксон се завршава многобројним гранама које имају проширења, варикозитете (сл. 7). У овим варикозитетима се налази неуротрансмитерска супстанца, која после ослобађања дифундује и долази до већег броја глатких мишићних ћелија (Bolton, 1979; Papka i sar., 2001, 2003).

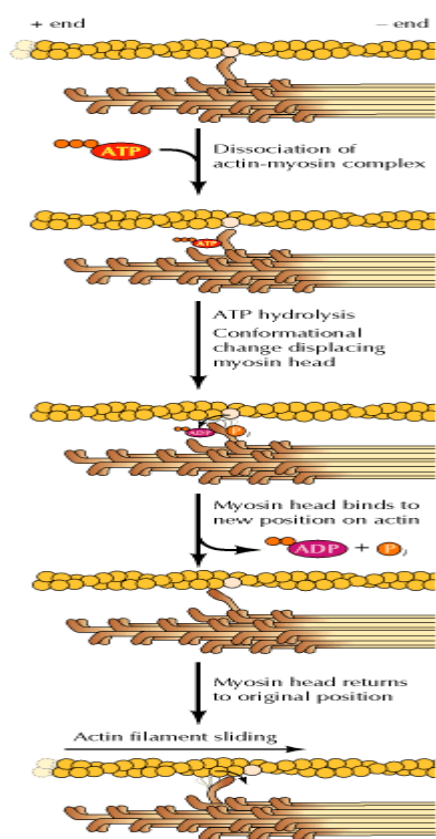


Слика 7 Структура глатких мишића (лево) и аксона који их инервишу (десно)

## МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ КОНТРАКЦИЈЕ И РЕЛАКСАЦИЈЕ ГЛАТКЕ МИШИЋНЕ ЋЕЛИЈЕ

Контракција и релаксација глатких мишића се може изазвати бројним хемијским агенсима, укључујући хормоне, лекове и неуротрансмитере. Глатки мишићи, у различитим деловима крвних судова, плућа, бубрега и утеруса, експримирају различите субтипове јонских канала, контрактилних протеина, рецептора и ћелијских сигналних путева, што омогућује разноврсност њихових функција. Тако на пример, већина крвних судова се контрахује под дејством норадреналина и адреналина, посредством стимулације  $\alpha_1$ -адренергичких рецептора, али уз испољавање разлика у односу на врсту и порекло крвног суда. Активација глатких мишића артериола смањује њихов лумен, а активација глатких мишића аорте не мења лумен аорте али повећава еластичност зида. Такође, регистроване су разлике у односу на кисеоник ( $O_2$ ) који изазива вазоконстрикцију, док угљен диоксид ( $CO_2$ ) изазива вазодилатацију глатких мишића артерија. С друге стране, крвни судови плућа се шире при високом притиску  $O_2$ , а сужавају када он опада. Глатки мишићи бронхиола се релаксирају при високим концентрацијама  $CO_2$ , а сужавају када он опада.

### Контракција глатког мишића



Слика 8 Контракција мишића

Глатки мишић утеруса одликују спонтане ритмичке контракције, које у већој мери зависе од концентрације екстрацелуларног калцијума, а потичу од промена мембранског потенцијала које стварају пејсмејкерске ћелије (Milovanović i sar., 1988). Глатке мишићне ћелије могу да постигну и стање дуготрајне тоничне контракције, која омогућава продужење контракције глатких мишића. Ове контракције су резултат продужених директних ексцитација глатких мишићних ћелија локалним факторима или циркулишућим супстанцијама, као што су ангиотензин, вазопресин и норадреналин. Глатке мишићне ћелије при контракцији могу да се скрате чак за 50–75% своје првобитне дужине, што омогућава шупљинама у висцеларним органима да драстично мењају свој пречник, од малог до веома великог волумена (истезањем глатке мишићне

ћелије постају краће, у средишњем делу њихов пречник се повећава, а на површини између суседних аморфних поља се јављају испупчења). Долази и до промене изгледа једра (сл. 8) – једро се прилагођава промени простора у коме лежи и спирално се увија. У основи ове промене проистичу из промена у нивоу унутрашњег ћелијског скелета (Šerban, 1995.)

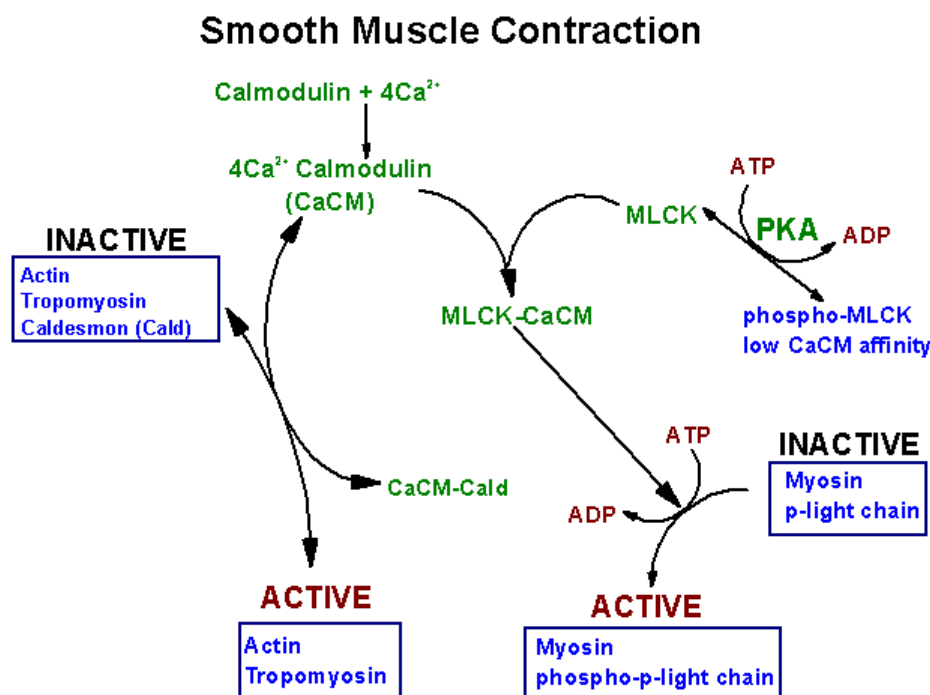
Контракције сва три типа мишићних ћелија (попречно пругастих, срчаних и глатких), као и миоепителијалних ћелија, остварују се истим механизмом - клизањем актинских и миозинских нити (филамената). Али, за разлику од скелетних и срчаних мишићних ћелија у којима контракцију покреће везивање  $\text{Ca}^{2+}$  за тропонин С, у глатким мишићним ћелијама главни покретач контракције је комплекс  $\text{Ca}^{2+}$  калмодулин (Hoffman i sar., 2003).

Интрацелуларна концентрација калцијума зависи од укупног баланса између концентрације калцијума која улази у ћелију или се отпушта из интрацелуларних депоа и концентрације калцијума која се уклања из ћелије. Присуство довољне количине калцијума у мишићној ћелији је кључан услов за активацију контрактилног апарата (сл. 9). Калцијум улази у ћелију преко волтажно-зависних и лиганд-зависних калцијумских канала. Унутарћелијски депои калцијума су саркоплазматски ретикулум, ћелијска мембрана и митохондрије (сл. 6). Калцијум се уклања из ћелије енергетски зависним путем помоћу АТФ- зависне калцијумске пумпе или  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  пумпом (Bolton i sar., 1983, 1986; Stojiljković, 1998.)

Калмодулин, мали протеин који се налази у цитоплазми (сензор за  $\text{Ca}^{2+}$ ), је мултифункционални рецептор за калцијум који учествује у ћелијској регулацији. Интрацелуларно ослобођен калцијум везује се за калмодулин и индукује одређене промене у молекулу, који онда активира акто-миозински систем и регулише метаболизам цикличних нуклеотида. За један молекул калмодулина везује се сукцесивно 4 јона калцијума (сл. 9). Молекул калмодулина глатких мишићних ћелија је сличан тропонину ћелија скелетних мишића. Такође, постоје и други калцијум-везујући протеини – калдезмин и калпонин. За контракцију глатке мишићне ћелије је неопходно повећање концентрације интрацелуларног калцијума, које се постиже различитим путевима сигналне трансдукције. Калмодулин такође, у васкуларном мишићу, утиче на аденилатну и гванилатну циклазу, на калцијумски транспорт, као и на енергетски метаболизам ћелије. У процесу регулације контрактилности, како васкуларног, тако и не васкуларног глатког мишића, калмодулин игра водећу улогу, удружен са системом цикличних нуклеотида. Према теорији клизања, увлачење танких филамената међу дебеле покреће контракцију (Bolton i sar., 1983, 1986; Stojiljković, 1998.).

Контракција глатких мишићних ћелија може бити изазвана механичким, хемијским и електричним стимулусима, или пасивним истезањем глатке мишићне ћелије. Тако на пример, неуротрансмитери, преко ослобођеног норадереналина или ацетилхолина из симпатикуса односно парасиматикуса, окситоцина у утерусу, котрансмитери (ангиотензин II, вазопресин,

ендотелин-I и тромбоксан A2), хормони, али и лекови, могу изазвати каскаду догађаја која се испољава контракцијом путем везивања за специфичне рецепторе. Локалне промене у условима средине која окружује мишићну ћелију (pH вредност средине, осмотска вредност, промене у јонима), такође могу утицати на процес контракције. Електрични стимулус доводи до промене вредности мембранског потенцијала и изазива отварање волтажно-зависних калцијумских канала L-типа. На тај начин се повећава интрацелуларна концентрација калцијума (Andus, 2001).



copyright 1996 M.W.King

Слика 9 *Схема механизма контракције мишића*

## МОЛЕКУЛАРНА ОСНОВА КОНТРАКЦИЈЕ МИШИЋА/УЛОГА ЦИКЛИЧНИХ НУКЛЕОТИДА И КАЛЦИЈУМА

Главни покретач акто-миозинске интеракције је фосфорилација лаког ланца миозина (MLC), коју врши киназа лаког ланца миозина (MLCK), уз помоћ калдезмона, главног модулятора овог процеса. Стимулација мишићне ћелије доводи до повећања интрацелуларне концентрације  $\text{Ca}^{2+}$ . Главни извор  $\text{Ca}^{2+}$  неопходног за мишићну контракцију је екстрацелуларни  $\text{Ca}^{2+}$ , који улази кроз L тип калцијумских канала и саркоплазматични ретикулум. Промене на мембрани условљавају и активацију инозитол-бифосфата, који се цепа на инозитол-3-фосфат ( $\text{IP}_3$ ) и диацилглицерол (DAG).  $\text{IP}_3$  делује на рецепторе на саркоплазматичном ретикулуму (SR) и кроз рианодин рецепторске канале се ослобађа калцијум (али и кроз редокс процес и кроз  $\text{IP}_3$  рецепторске канале преко секундарног гласника). При повећаној концентрацији



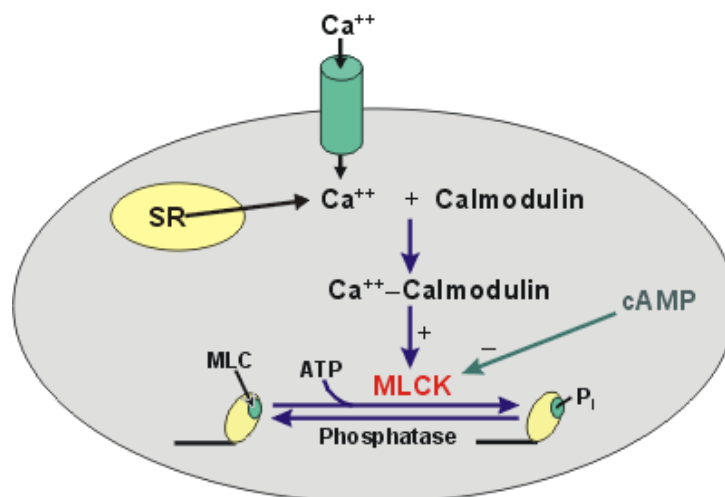
интрацелуларног  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелији (већој од  $10^{-6}\text{M}$ ) активира се калмодулин. Јони  $\text{Ca}^{2+}$  се везују за регулаторни протеин калмодулин. Комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ - калмодулин активира лако-ланчану миозинску киназу (myosin light chain kinase - MLCK), протеин који фосфорилише миозинске лаке ланце од 20kD (Сл. 10), у присуству аденозин трифосфата (АТФ), на позицији 19 Р- ланца, као што је то код фазних контракција мишића утеруса. Фосфорилацијом лаког ланца миозина активира се миозин АТФ-аза. Фосфорилисана главица миозина се везује са актином и омогућује контракцију мишића. Доминантно се фосфорилише серин 19 у MLC (myosin light chain) и тада долази до конформационих промена које активирају АТФ- азну функцију и афинитет миозина за актин. Фосфорилација треонина на месту 18 има веома мали утицај на миозин АТФ- азну активност и брзину померања актина (Obladen i sar., 2005). DAG, заједно са јонима калцијума, активира протеин киназу С (PKC), а она даље врши фосфорилацију серинских и треонинских остатака протеина, који подстичу контракције мишића (нпр. калцијумске канале за улазак калцијума MLC, али на ser1, ser2 и thr9 позицији). Висок ниво калцијума активира и Rho киназу, која фосфорилише ензим миозин фосфатазу лаког ланца (MLCP) и на тај начин инхибира њену активност, односно спречава дефосфорилацију MLC. CPI-17 је протеин који такође учествује у инхибицији MLCP ланца од 17kDa.

Сматрало се да је CPI-17- протеин киназа С зависан протеин, али новији подаци показују да се активира Rho-киназама (Parkington i sar., 2001). Треба напоменути да је миозински лаки ланац (myosin light chain - MLC) регулаторна субјединица, смештена у главама миозинских филамената. Фосфорилација MLC доводи до активације миозинских филамената. Да би овако активирани филаменти могли да остваре везу са актинским филаментима, неопходно је присуство молекула АТФ-а, који се везује за главу миозинског молекула (поседује АТФ-азну активност) и бива хидролизован. Са хидролизом АТФ-а долази до одмицања главе миозинског молекула од површине дебелог филамента, до њеног усмеравања ка актинском филаменту и везивања за њега. Између филамената се успоставља угао од  $90^{\circ}$ . Потом се од главе миозинског филамента одваја неоргански фосфор (Pi), што доводи до ротације миозинског филамента у нивоу вратног дела молекула и померања главног региона за око  $45^{\circ}$ . Тако долази до померања актинског филамента за око 10nm. Тада се ADP одваја од главе миозинског молекула. Нови молекул АТФ се везује на његово место и миозински филамент може да се одвоји од актинског. Ова фосфорилација повећава брзину интеракције актин - миозин и покреће иницијалну фазу контракције. Могућа је и фосфорилација треонина Р- ланца, која још више убрзава контракцију. У одсуству  $\text{Ca}^{2+}$ , ова киназа није активна и фосфатаза одстрањује фосфатне групе са Р-ланца (Šerban, 1995).

Брзина и величина фосфорилације MLC мењају се сразмерно променама у концентрацији интрацелуларног  $\text{Ca}^{2+}$ . Због тога је претпостављено постојање додатног регулаторног система

контракције и указано на могућу регулаторну улогу леитонина С, који везује  $\text{Ca}^{2+}$  и леитонина А, који показује афинитет за актин и тропомиозин. Као што је напоменуто, у процесу контракције централну регулаторну улогу може имати калдезмон, који иначе показује висок афинитет за тропомиозин и актин. Везивањем  $\text{Ca}^{2+}$  за калдезмон, откривају се актински локуси, до тада заштићени тропомиозинском траком и постају доступни главама миозинских молекула (Ebashi i Nonomura, 1980; Silver, 1984; Weiss i sar., 1990).

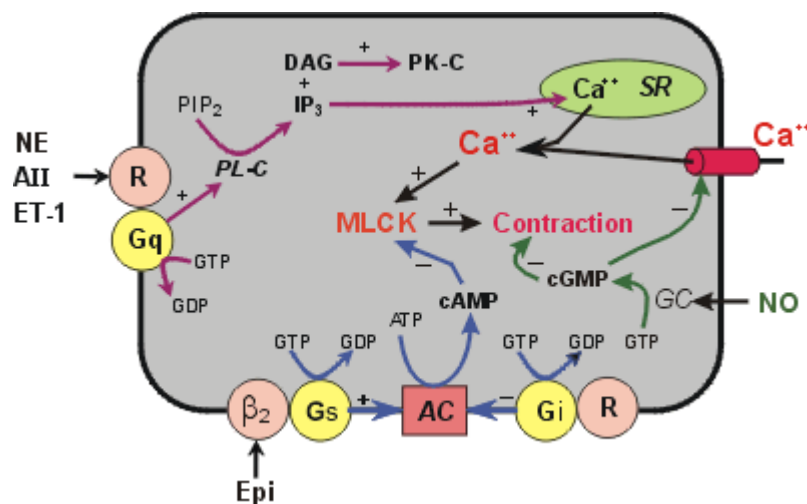
Екситаторни агенси углавном контрахују мишић деполаризацијом ћелијске мембране и активирањем екстрацелуларног  $\text{Ca}^{2+}$ . Међутим, глатки мишићи могу да се контрахују и без деполаризације, али уз коришћење  $\text{Ca}^{2+}$  из интрацелуларних депоа. Тако на пример, норадреналин изазива контракцију каротидне артерије зеца без деполаризације ћелијске мембране, док ацетилхолин изазива контракцију коронарне артерије у условима хиперполаризације ћелијске мембране. Када се концентрација интраћелијског калцијума смањи, процес иде у обрнутом смеру, а ензим миозин фосфатаза врши дефосфорилацију главеце миозина (сл. 10). Са смањењем концентрације интраћелијског калцијума, пада ниво фосфорилације MLC, смањује се потрошња АТФ-а, односно енергије. Преостали јони калцијума се преко АТФ-зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала избацују из ћелије, односно враћају у саркоплазматски ретикулум (Kitamura i sar., 1979; Mekata i sar., 1972).



**Слика 10** Регулација тонуса глатке мишићне ћелије помоћу калцијума и cAMP (SR: саркоплазматски ретикулум; MLCK: миозинска лаколанчана киназа; MLC: лаки ланац миозина;  $\text{P}_i$ : фосфатна група)

Постоји неколико различитих типова сигналне трансдукције који модулишу концентрацију интрацелуларног калцијума и на тај начин утичу на тонус мишића. Један од њих је фосфоинозитолски пут (сл. 11), који започиње везивањем норадреналина за  $\alpha_1$ -адренергичке рецепторе, ангиотензина II за  $\text{A}_2$  рецепторе, ендотелина I за ETA рецепторе. На тај

начин се активира ензим фосфорилаза C, која повећава концентрацију **инозитол трифосфата** ( $IP_3$ ), који се ствара из фосфатидилинозитола ( $PIP_2$ ).  $IP_3$  се онда везује за рецепторе на саркоплазматском ретикулуму и на тај начин отпушта јоне калцијума. С друге стране, повећана концентрација **азотног оксида** (NO), активира ензим гванилатну циклазу, а тиме и продукцију **цикличног гванозин монофосфата** (*cGMP*), који потом активира *cGMP*- зависну протеин киназу (спречава се инфлукс јона калцијума), активира калијумске канале и смањује ниво  $IP_3$  (сл. 11), уз вазодилатацију као крајњи ефект. Наведену каскадну реакцију релаксације глатког мишића антагонизује метиленско плавило, јер спречава активацију гванилатне циклазе (Kordić-Bojinović, 2010, 2012). Међутим, у неким експериментима показано је да метиленско плавило не може да антагонизује релаксантно дејство натријум-азида и нитроглицеролана, који су такође познати као стимулатори гванилатне циклазе на изолованом утерусу пацова (Milovanović, 1984). **Циклични АМР** такође учествује у регулацији мишићног тонуса (сл. 11). Сигнални пут који укључује повећање његове концентрације отпочиње стимулацијом  $\beta_2$  – адренергичких рецептора.  $\beta_2$  - адреноцептор је прикопчан за  $G_s$  протеин, који активира ензим аденилат циклазу, која затим повећава концентрацију **цикличног аденозин монофосфата** (*cAMP*). На тај начин, повећана концентрација *cAMP*, смањује фосфорилацију лаквих ланаца миозина, што смањује интеракције између актинских и миозинских филамената и онемогућава контракцију мишићних ћелија.



**Слика 11** Сигнални пут регулације тонуса глатке мишићне ћелије (NE: норадреналин; АИ: ангиотензин II; ET-1: ендотелин1; R: рецептор; PL-C: фосфолипаза C;  $PIP_2$ : фосфатидилинозитол;  $IP_3$ : инозитол-3-фосфат; DAG: диацилглицерол; SR: саркоплазматски ретикулум; MLCK: миозинска лаколанчана киназа; MLC: лаки ланац миозина; Pi: фосфатна група; GC: гванилат циклаза; Epi: епинефрин;  $\beta_2$ : бета-2-адренергички рецептор; AC: аденилат циклаза).

Јонски канали имају важну улогу у процесу мишићне контракције. Натријумови канали пропуштају струју позитивних јона у унутрашњост ћелије, што изазива деполаризацију. За враћање мембранског потенцијала на почетну вредност одговорна је излазна струја позитивних наелектрисања кроз калијумове канале (Andus, 2001.). Калијумови канали су богато заступљени у глаткој мускулатури органа, укључујући и утерус. Једна од главних функција калијумових канала је одржавање ћелијске екситабилности. Током стварања акционог потенцијала, деполаризација мишићних ћелија активира калијумове канале, који су одговорни за фазу реполаризације мембране. Излазна калијумска струја повећава концентрацију позитивних наелектрисања са спољашње стране ћелијске мембране и тако доводи до реполаризације или хиперполаризације. Реполаризација омогућава постизање мембранског потенцијала мировања, што обезбеђује могућност за поновно стварање акционог потенцијала (о калијумовим каналима биће више речи у посебном поглављу увода ове докторске тезе).

### **Значај слободних радикала и антиоксидативног система (AOS) за контракцију глатког мишића**

Оксидациона фосфорилација у митохондријама обезбеђује довољну количину АТФ-а, односно енергије, за одвијање контрактилног процеса утеруса, током кога у респираторном ланцу долази, у 95% случајева, до редукције молекулског кисеоника до воде (везивањем 4 електрона преко цитохром С оксидазе). У преосталих 5% случајева, долази до редукције молекулског кисеоника мањим бројем електрона, при чему настају делимично редуковани међупроизводи, слободни радикали, односно реактивне врсте кисеоника (ROS), за које се веровало да су врло штетне (Halliwell and Gutteridge, 1988) јер изазивају оштећења на липидној мембрани, DNK, протеинима и угљеним хидратима, стварајући оксидационе продукте који могу да делују цитотоксично и мутагено. Међутим, ензими супероксид дисмутаза -SOD, каталаза -CAT, глутатион пероксидаза -GSHPX, глутатион редуктаза -GR, који чине тз. антиоксидативну заштиту, стварају услове да концентрација ROS буде на нетоксичном нивоу (Marnett i sar., 2003; Halliwell & Gutteridge, 1988, 1985,1999).

Дуго је била на снази доктрина да је примена антиоксиданаса од велике користи у антагонизовању штетних ефеката ROS. Међутим, последњих година наводи се да ROS не делују само као токсични молекули одговорни за болест, већ да имају значајну физиолошку функцију, јер се континуирано стварају и код здравих особа (Graier & Hecker, 2008). Процес мишићне контракције је различито осетљив на редокс модулације. Тако на пример, расте вероватноћа отварања калцијумских канала саркоплазматичног ретикулума (SR), уз повећање концентрације  $Ca^{2+}$ , након оксидације слободних тиола (Aghdasi i sar., 1997). Улазак калцијума у SR се може спречити високим концентрацијама  $H_2O_2$  (Andrade i sar., 1998), уз испољавање временски и

концентрацијски зависне осетљивости миофибрила на калцијум, у присуству оксиданаса (Wilson *i sar.*, 1991; Andrade *i sar.*, 1998). Потрошња кисеоника се може значајно увећати током снажних мишићних контракција, а тиме и продукција ROS. Током мишићног замора, због појачане и продужене активности мишића, долази до повећане продукције ROS, а тиме и неправилне контрактилне активности (Davies *i sar.*, 1996; Allen *i sar.*, 1995, 2000). Повећана продукција ROS се јавља и код исхемије, изазване снажним контракцијама које спречавају довод крви у утерус и узрокују оштећења плода услед реперфузије/исхемије (Nakai *i sar.*, 2000; Warren *i sar.*, 2005). Такође, појачана продукција ROS постоји код дијабетеса (Karasu, 2000) и хипертензије (Lacy *i sar.*, 1998). Побачај и превремени порођај изазван запаљенским процесима (Gibbs *i sar.*, 1992), могу изазвати повећану продукцију реактивних врста, укључујући водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), супероксид ањон ( $O_2^-$ ), пероксинитрит ( $ONOO^-$ ). Напорна физичка активност, посебно у професионалном спорту, изазива продукцију ROS, што не значи да је она штетна, јер постоје и други адаптациони механизми који омогућују да се неке карике AOS повећавају током процеса тренирања (Schulze *i sar.*, 2002). Повећана антиоксидативна активност ензима која се развија код тренажног процеса је корисна у спречавању оксидативног стреса (Ji *i sar.*, 1988; Warren *i sar.*, 2004), што наводи на закључак да су ROS и AOS узајамно зависни и нераздвојиви, као и да контрактилна активност мишића утиче на промене, како једних, тако и других.

$H_2O_2$ , који игра значајну улогу у метаболизму ROS, је ненаелектрисан оксидант са два електрона, који због дугог полуживота у биолошким системима и добре дифундабилности кроз ћелијске мембране делује као сигнални молекул у бројним физиолошким одговорима (Bergendi *i sar.*, 1999; Droge, 2002).  $H_2O_2$  може да изазове релаксацију крвног суда (Ardanaz & Pagano, 2006) повећањем продукције NO, због дуготрајне експресије eNOS и повећане фосфорилације eNOS (Drummond *i sar.*, 2000), акутном активацијом ензима (Thomas *i sar.*, 1994, 1990, 2000, 2002). Поред тога,  $H_2O_2$  директно изазива релаксацију крвног суда преко cGMP зависног механизма (Burke & Wolin, 1987; Yang *i sar.*, 1999), али и другим механизмима, као што је ендотелијум хиперполаришући фактор (EDHF) или отварање  $K^+$  канала (Barlow *i sar.*, 2000; Iida and Katušić, 2000; Gao *i sar.*, 2001; Rogers *i sar.*, 2007; Appiah *i sar.*, 2012; Slavić, 2013), што омогућује хиперполаризацију и снижење концентрације  $Ca^{2+}$  у глаткој мишићној ћелији. Улога  $H_2O_2$  у регулацији контрактилне активности утеруса је прилично нејасна, јер је изнето да  $H_2O_2$  може деловати као контрактилни и релаксантни агенс (Gao & Lee, 2005; Gil-Longo & Gonzalez, 2005; Warren *i sar.*, 2005), или може испољити бифазан ефекат (Gao *i sar.*, 2003; Lucchesi *i sar.*, 2005).  $H_2O_2$  има мали директни ефект на интрацелуларни  $Ca^{2+}$ , али продужено излагање  $H_2O_2$  смањује инкорпорацију  $Ca^{2+}$  у SR (Andrade *i sar.*, 1998). Промене у ћелијском  $Ca^{2+}$  дешавају се са релативном временском задршком након излагања дејству  $H_2O_2$ . Пораст  $[Ca^{2+}]$  је стандардни догађај у патолошким стањима везаним за оксидативни стрес (Camello-Almaraz *i sar.*, 2006;

Feissner i sar., 2009). Велики број ROS и AOS генератора у живим ћелијама је  $\text{Ca}^{2+}$ -зависно (Gordeeva i sar., 2003; Brookes i sar., 2004). Због тога, велики број истраживача напомињу да,  $\text{Ca}^{2+}$  зависна регулација компонената ROS хомеостазе, може утицати на интрацелуларну редокс равнотежу и *vice versa*, што чини темељ ROS- $\text{Ca}^{2+}$  интеракције (Yan i sar., 2006). На основу горе изнетог може се закључити да, промене концентрације  $\text{H}_2\text{O}_2$  могу утицати на контрактилну активност, не само васкуларног, већ и других глатких мишића, укључујући и утерус.

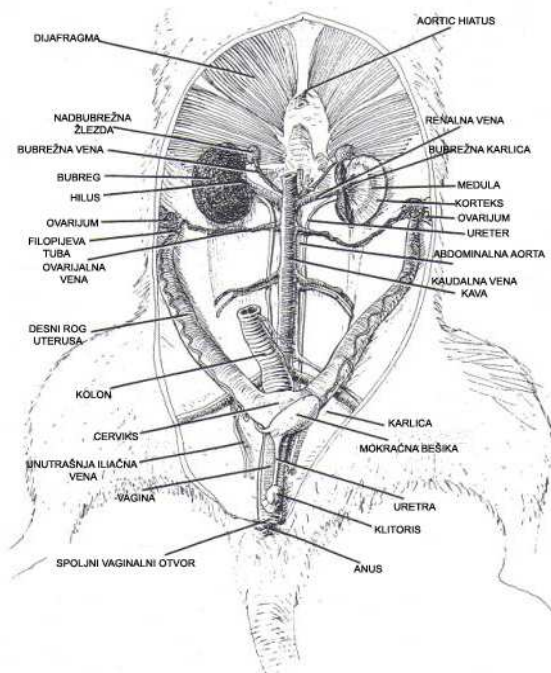
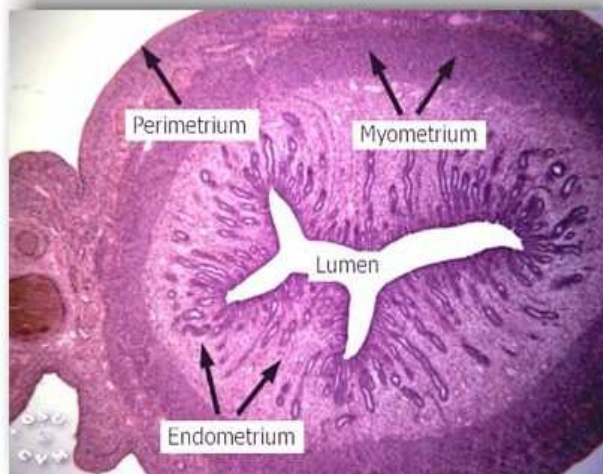
## АНАТОМСКО-ХИСТОЛОШКЕ И ХОРМОНСКЕ ОСОБИНЕ УТЕРУСА

(модел за истраживања механизма деловања контрактилних и релаксантних супстанција)

*Анатомско/хистолошке специфичности утеруса пацова*

Утерус пацова чине два рога који дају утерусу облик слова V (сл. 12 Б), што омогућава симултани развој неколико ембриона. Зид утеруса граде: ендометријум, миометријум и периметријум (сл. 12 АБ). **Ендометријум** је унутрашњи, мукозни слој утеруса, који подлеже највећим променама, односно хипертрофира паралелно са сазревањем јајне ћелије и овулацијом, састоји се из *tunica mucosa* и *tunica submucosa* и чврсто је везан за миометријум. Ћелије епитела ендометријума, испод којих је тзв. ендометријална строма (*Lamina propria*), се љуште уколико не дође до оплодње. У *Lamina propria*, која је изграђена од растреситог везивног ткива, налазе се неутрофили, лимфоцити и жлезде које синтетишу простагландине. **Миометријум** (*tunica muscularis*) је глатки мишић утеруса, а састоји се од три мишићна слоја: спољашни, средњи и унутрашњи. Спољашни слој чине два подслоја (унутрашњи/циркуларна мишићна влакна и спољашњи/лонгитудинална мишићна влакна). Средњи слој је изграђен од мишићних влакана дијагоналне оријентације, а унутрашњи слој је изграђен од циркуларних влакана. *Stratum vasculare* је слој између унутрашњег и спољашњег слоја миометријума, у ком се налазе велики крвни судови. Током трудноће, вишеструко се повећава број и величина глатких мишићних ћелија и еластично ткиво, а нове ћелије настају од недиференцираних ћелија везивног ткива, као и од већ постојећих глатких мишића. У ендометријуму и миометријуму се синтетишу простагландини ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$  и  $\text{PGI}_2$ ), који утичу на контрактилност глатке мускулатуре тела и грлића утеруса.  $\text{PGI}_2$ - простациклин је вазодилататор и инхибитор агрегације тромбоцита, док  $\text{PGF}_{2\alpha}$  и  $\text{PGE}_2$  контрахују материцу.  $\text{PGE}_2$  олакшава почетак порођаја, ширењем грлића и контраховањем тела утеруса.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  и  $\text{PGE}_2$ , пред менструацију, избацују некротичан слој ендометријума у лумен материце. **Периметријум** или спољни слој (*tunica serosa*), саграђен од растреситог везивног ткива, је заправо пелвични перитонеум око утеруса, у коме се налазе лигаменти који одржавају утерус на свом месту у организму. Кроз овај слој до утеруса допиру нерви (симпатикус преко хипогастричног плексуса, а парасимпатикус од

2., 3. и 4. пара сакралних нерава), као и многи крвни и лимфни судови (Devedeux i sar., 1993; Guyton & Hall, pogl.81, 2003). Зреле јајне ћелије пацова пролазе од јајника кроз јајоводе и оплођују се у утерусу, а период гестације траје 21 дан и рађа се у просеку 6–8 младунаца. На основу изгледа епителних ћелија, нивоа васкуларизације и микрофлоре утеруса пацова, могу се одређивати еструсне фазе циклуса (Westwood, 2008).



Слика 12 АБ (А) Попречни пресек утеруса пацова (периметријум, миометријум и ендометријум); (Б) Репродуктивни систем женке пацова

### Утицај хормона на репродуктивни циклус женке пацова

Женке пацова имају кратак еструсни (репродуктивни) циклус (4–5 дана), који има пет фаза: *proestrus*/траје 12–14h, *estrus*/25–27h, *metestrus*/6–8h, *diestrus*/55–57h и *anestrus*. Група фоликула почиње да се развија пред крај *proestrusa*, у *estrusu* се убрзава осмоструко, а парење се у еструсној фази дешава око 16.00–22.00h. Спонтана овулација, која се поклапа са копулацијом, обично се одиграва 8–11 сати од почетка еструса. Ендометријум у *metestrusu*, под утицајем прогестерона, постаје мукозан, уз раст жутог тела до максималне величине у наредна 3 дана (*diestrus*), а потом се смањи на половину пред *metestrus* следећег циклуса и онда нагло смањи пред еструс. Из наведеног може се закључити да, оваријуми пацова имају 3 различите групе жутог тела у различитим фазама развоја, а у случају изостанка копулације не развија се потпуно жуто тело. Гравидитет пацова траје 21 дан и рађа се у просеку 6–8 младунаца.. *Diestrus* се завршава разградњом жутог тела и реапсорпцијом ендометријума, док у *anestrusu* циклус мирује. Током еструсног циклуса и трудноће утерус подлеже хормонским променама, јер је концентрација прогестерона и 17β- естрадиола у оваријуму значајно виша него у крви. Лучење

17β- естрадиола из развојног фоликула је слабо у еструсу, почиње да расте у метеструсу и диеструсу и достиже максимум дана у проеструсу (око 11h), а враћа се на почетни ниво у еструсу. Ниво пролактина, лутеинизирајућег хормона и фоликулостимулирајућег хормона се нагло увећава након врхунца естрогена у проеструсу, током поподнева до поноћи. Дан након тога (метеструс) долази до изражаја синергично деловање естрогена и прогестерона. Али, у току ове фазе у односу на еструсу, повећано је лучење прогестерона. У диеструсу долази до изражаја деловање прогестерона из жутог тела. Током еструсног циклуса региструју се два максимална нивоа у лучењу прогестерона. Први „*pik*“ се дешава током метеструса од новоформираног жутог тела (уз смењивање пада и пораста лучења, пореклом од грануларних ћелија преовулаторног фоликула), а други „*pik*“ настаје на крају проеструса. Током циклуса прогестерон утиче на задебљање ендометријума, припрема материцу за оплодњу, одржава гравидитет пацова у стању мировања до 18. и 20. дана, када његов ниво нагло опада, а расте ниво естрогена, што повећава контрактилну активност утеруса, неопходну за порођај (Ross, 2004; Welsch, 2006; Westwood, 2008). Нормалан ниво прогестерона је кључан за одржавање гравидитета, јер смањује број и сензитивност контрактилних рецептора, а повећава број β<sub>2</sub> адренергичких рецептора, захваљујући којима се одржава релаксација, а тиме и мировање утеруса. Појачана контрактилна активност утеруса је удружена са смањеним нивоом прогестерона и повећаним нивоом естрогена. У нормалним случајевима, до снижења нивоа прогестерона долази 18. дана гравидитета, да би 20. дана, раст прогестерона био замењен порастом естрогена, као и током порођаја пацова, 22. дана, што коинцидира са контрактилношћу и порастом калцијума у глатком мишићу утеруса (Wray i sar., 2001, 2003, 2005; Marcondes i sar., 2002; Wray & Noble, 2008; Noble i sar., 2009).

На основу изнетог може се рећи да током еструсног циклуса, ниво хормона подлеже значајним променама. Тако на пример, ниво естрогена, након овулације, у постеструсу и диеструсу, почиње да расте, а максимални ниво достиже у проеструсу. Крајем постеструса, расте ниво прогестерона, пореклом из жутог тела. Ниво прогестерона се полако смањује до краја проеструса, када поново расте, лучењем из зрелог фоликула, који потом овулира. После максималног нивоа естрогена, долази до наглог повећања нивоа пролактина, LH, FSH.

#### *Особине контрактилне активности утеруса током еструса*

Утерус је глатки мишић који је у стању да се контрахује у одсуству спољашње стимулације, са разликама у фреквенцији и амплитуди контракција током еструсног циклуса, иако његове ћелије не поседују пејсмејкерски потенцијал (Popescu i sar., 2007; Hinescu i sar., 2008). Електрична активност је скоро одсутна у проеструсу, повећана у еструсу и метеструсу, уз постепено смањене током диеструса. Тако на пример, у „*in vitro*“ условима након изоловања



утеруса, спонтана ритмичка активност се јавља код 100% испитиваних миоетријума у метеструсу, 89% у диеструсу, а 60% у еструсу и проеструсу пацова. Амплитуда контракција изолованог утеруса пацова је била већа у метеструсу и диеструсу у односу на проеструс. Контракције gravidног утеруса у време порођаја, под дејством окситоцина, постају синхронизоване захваљујући везама између мишићних ћелија које се зову пукотинасте везе (Wray & Noble, 2008). Величина и снага тих контракција, мањим делом зависи од инфлукса јона калцијума из екстрацелуларног простора (кроз L-тип  $Ca^{2+}$  канала), а већим делом од ослобађања из интрацелуларних депоа, односно саркоплазматског ретикулума (SPR). С друге стране, различите изоформе T канала имају велики капацитет и бржу кинетику од L-типа, а уз то се активирају при нижим концентрацијама  $Ca^{2+}$ . Основна њихова улога је у подизању потенцијала мембране до - 40mV, што омогућује активирање L- типа канала, који могу дуже да одржавају ниво ексцитираности глатког мишића. Блокирањем T-типа  $Ca^{2+}$  канала, успорава се фреквенција спонтаних контракција утеруса (Ohkubo i sar., 2005; Blanks i sar., 2007). На моделу хуманог и анималног утеруса уочено је ослобађање јона калцијума из саркоплазматског ретикулума (SR) и идентификовани су  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) и рианодин рецептори (RyRs) на мембрани SR. Међутим, када је утерус у питању, за разлику од глатких мишића других органа, изгледа да ослобађање  $Ca^{2+}$  активацијом ових рецептора, незнатно доприноси контракцијама миоетријума (Kurittayamant i sar., 2002; Noble&Wray, 2002). Захваљујући експериментима на глатким мишићима уретера и крвних судова, разјашњена је улога тзв. искри јона калцијума („sparks“) из SR у одржавању тонуса, али још више њихова улога у активацији  $Ca^{2+}$ -зависних  $K^+$  канала (BK канали). SR је локализован у близини плазма мембране мишићне ћелије, тако да је локална струја јона калцијума у близини BK канала довољна да изазове активацију канала, а тиме малу хиперполаризацију мембране, која је потребна за постепено смањивање отворености L-типа  $Ca^{2+}$ - канала и релаксирање мишића (Nelson i sar., 1995; Miriel i sar., 1999; Burdyga and Wray, 2005).

## АЗОТ МОНОКСИД (NO)

Азот-моноксид (NO, азотни оксид) је, с једне стране, познати загађивач човекове околине, састојак смога, прекурсор киселих киша и вероватно карциноген, а с друге стране, је битан медијатор и модулатор многих процеса у физиолошким и патолошким условима. Производе га ендотелијалне ћелије крвних судова, ћелије имунског система и неурони централног нервног система (Moncada i sar., 1997). Азот-моноксид (NO) је од изузетне биолошке важности и предмет је интензивног интересовања научника, почев од 1980. године, када је откривено да, ендотел, под утицајем ацетилхолина (али и других супстанција), ослобађа

фактор релаксације, који је због тога назван EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) (Furchgott & Zawadzki, 1980). Неколико година касније EDRF је хемијски идентификован као азот моноксид, а ово откриће је 1996. године завредило Nobelovu награду (Ignarro i sar., 1987; Palmer i sar., 1987).

Сазнање да једна иста супстанца јесте отров, али истовремено и битан фактор у физиологији и патофизиологији организма, била је иницијална каписла за бројна истраживања разноврсне улоге азотног оксида у организму човека и животиња (Varagić i Milošević, 2010). Може се рећи да је његов још неартикулисан значај наслеђен још давне 1867.године (када је амил-нитрит први пут употребљен код оболелог од ангине пекторис), али су теоријска објашњења уследила тек након више од једног века. Данас знамо да је амил-нитрит-NO донор, који надокнађује биохемијску лезију његовог недостатка. NO, који се синтетише у васкуларном ендотелу као одговор на хемијске и физичке стимулусе, је значајан за одржавање вазодилататорног тонуса и нормалног протока крви и крвног притиска. Азот моноксид, релаксацијом глатких мишића крвних судова, изазива њихову вазодилатацију, укључујући и коронарне крвне судове (повећава проток крви у срчаном мишићу). На овај начин се и објашњава механизам дејства нитроглицерина, који се још назива донор NO, због метаболичке трансформације у NO, који на крају релаксира коронарне крвне судове и повећава проток крви у срчаном мишићу и употребљава се више од сто година за олакшавање тегоба код пацијената са ангином пекторис (Murad, 1994; Murphy and Steenbergen, 2008; Moncada, 1997).

У централном нервном систему NO, као неуротрансмитер и модулатор синаптичке трансмисије, учествује у процесу стварања меморије, али и у координацији нервне активности и крвног притиска (сам NO делује вазодилататорно), модулацији и перцепцији бола. У периферном нервном систему NO је познат као медијатор који ослобађа широко распрострањена мрежа неурона са превасходно антиадренергичком и антихолинергичком активношћу. Ови неурони посредују у остваривању тзв. неурогене вазодилатације и регулишу извесне процесе у ГИТ-у, респираторном и генитоуринаром тракту. У имунолошким реакцијама NO се генерише у великим количинама, нпр. у активираним макрофагима (значајна улога у акутном и хроничном запаљењу), где доприноси њиховом цитотоксичном ефекту против туморских ћелија, вируса, бактерија и осталих патогена. Овај ефекат NO је резултат његовог деловања на ензиме респираторног циклуса и ензиме који учествују у синтези DNK. Осим тога, NO спречава адхезију тромбоцита и леукоцита за ендотел и утиче на пропустљивост крвних судова. NO се одликује кратким биолошким полуживотом и изразитом реактивношћу према интраћелијским ензимима као циљним молекулима. (Moncada, 1997; Murphy and Steenbergen, 2008).

NO инхибира оксидацију липопротеина мале густине, који су важан фактор ризика у патогенези атеросклерозе. Због свог значајног утицаја на кардиоваскуларни систем, у медицини се користе различите супстанце које повећавају концентрацију NO, као што су NO донори, стимулатори рецептора који појачавају синтезу NO, или оне које обезбеђују супстрат за NO.

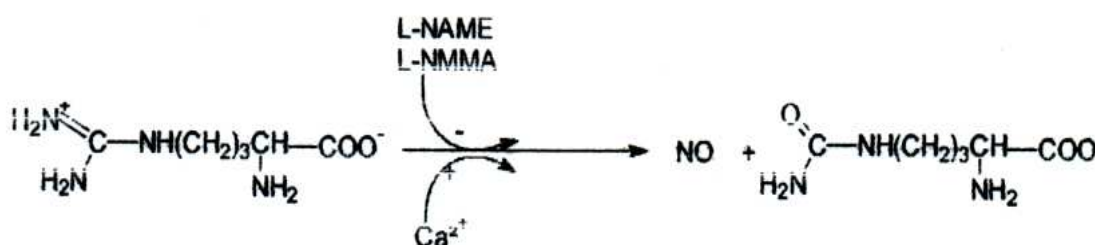
У групу NO донора спадају: органски нитрати(нитроглицерол, изосорбид-динитрат), неорганска азотна једињења (Na- нитропрусид) и S- нитрозотиол. Традиционално NO донори се користе због свог вазодилаторног дејства. Међутим, како су ове супстанце снажни инхибитори агрегације и адхезије тромбоцита, могу се користити и у терапији тромбоцитних поремећаја. NO донори ослобађају NO (или неку другу редокс форму овог молекула, као нпр. нитрозонијум јон - NO<sup>+</sup>, нитроксил ањон - NO<sup>-</sup>), под каталитичким утицајем микрозомне фракције глатких мишићних ћелија крвних судова, глутатион -S- трансферазе и/или цитохром P450. Међутим, показано је да у току ослобађања NO-а, долази и до везивања органских нитрозодилатора за специфичне рецепторе у зиду крвног суда, при чему долази до реакције са сулфхидрилним (-SH) групама рецептора. **Нитроглицерол**, који је важан лек у терапији ангине пекторис, у глатким мишићним ћелијама такође подлеже дејству ензима глутатион-S-трансферазе и уз денитрацију се ослобађа нитритни јон, који делује вазодилаторно. С друге стране, једним другим, за сада непознатим механизмом, из нитроглицерола се ослобађа азотни оксид (NO), много јачи вазодилатор од нитритног јона, али и од самог нитритног јона може такође настати NO (Murad, 1994). **Нитроглицерол** или **натријум-нитропрусид**, путем ензима *гванилатне циклазе*, директно или посредством ослобађања NO, стимулишу синтезу цикличног гванозин-монофосфата (сGMP), који отпочиње процес релаксације глатких мишића крвних судова. Најзначајнији ефект нитроглицерола, делом и натријум-нитропрусида, је постартериоларна венска вазодилатација, која задржавањем крви на периферији смањује оптерећење срца и прекида ангинозни напад, односно хипертензивну кризу. Међутим, продужено узимање NO донора, може смањити продукцију ендогеног NO, о чему се мора водити рачуна приликом дуготрајне терапије са NO донорима (Murad, 1994; Varagić i Milošević, 2010; Sausbier i sar., 2000).

Инхибитори ангиотензин-конвертујућег ензима (ACE инхибитори) повећавају ослобађање NO-а насталог у ендотелу, под дејством сNOS и уз помоћ брадикинина, јер ови лекови, као што су рамиприл и лизиноприл, блокирају разградњу брадикинина. Ослобођени брадикинини, преко β<sub>2</sub> рецептора, повећавају улазак калцијума у ћелије васкуларног ендотела и тиме стимулишу ослобађање NO-а, под дејством конститутивног, калцијум-зависног ензима. NO донори се углавном користе у вазодилаторне сврхе. Међутим, због инхибиције агрегације тромбоцита, могу се користити и као антиагрегацијски лекови. Продужено узимање NO донора, смањује продукцију ендогеног NO, о чему се мора водити рачуна приликом дуготрајне терапије NO донорима.

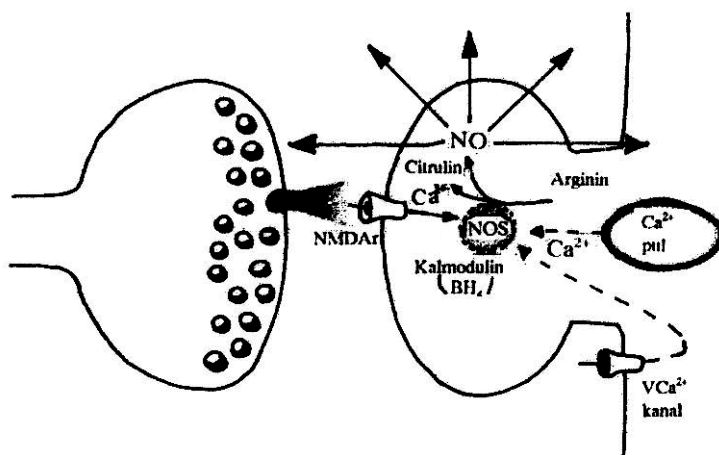
## Структура и синтеза NO

NO се код ћелија сисара ствара из терминалне групе L-аргинина (непосредни прекурсор NO-а) и цитрулина, реакцију катализује ензим NO-синтаза (NOS). Овај ензим катализује почетне фазе конверзије L-аргинина у NO, које подразумевају хидроксилацију азота гванидинске групе L-аргинина (сл. 13, 14, 15). Реакција се одиграва у присуству O<sub>2</sub>, уз учешће комплекса Ca<sup>2+</sup>- калмодулин и кофактора као што су NADPH, FADH, FАМН, хем и тетрахидробиоптерин (BH<sub>4</sub>). Као резултат реакције стварају се NO и цитрулин, као нус продукт, који се може поново искористити за синтезу L-аргинина (Palmer i sar., 1987).

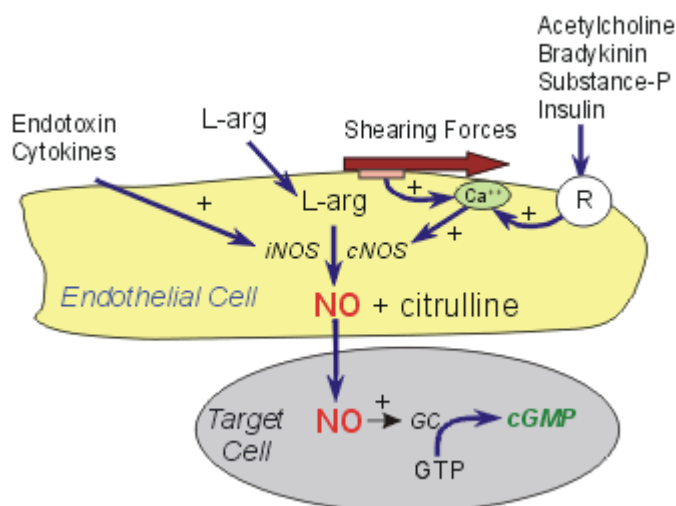
Познато је више изо-облика ензима NOS, као и више деривата L- аргинина који делују као конкуритивни инхибитори ензима NO-синтазе (један од таквих је, на пример, N- монометил -L- аргинин или L-NNMA). До сада су изоловане три форме овог ензима, од којих су две конститутивне, а једна индуцибилна. Конститутивне форме су откривене у ендотелним (eNOS) и неуронским (nNOS) ћелијама. Оне имају слична својства и продукују мале количине NO. Насупрот томе, индуцибилна форма (iNOS), првобитно откривена у активираним макрофагима, продукује велике, токсичне количине NO. За своју активност NOS захтевају различите доноре електрона. NOS у крвним судовима, активирају јони калцијума везани за калмодулин. Калцијум се ослобађа из унутарћелијских депоа дејством инозитол трифосфата. Различите супстанце могу да подстакну стварање NO овим механизмом – ацетилхолин, брадикинин, хистамин, инсулин и супстанција P (сл. 15). Важан механизам у регулацији активности ендотелијалне cNOS је и сила притиска коју крв остварује на површини ендотелијума крвних судова. Повећана брзина протока крви, стимулише ослобађање калцијума и повећава активност cNOS (Moncada, 1997; Stojiljković, 1998.). Фактори који подстичу стварање NO су показани на сликама 13, 14 и 15.



Слика 13 Синтеза NO: Ензимском конверзијом L-аргинина у L- цитрулин издваја се NO. (L-NAMA: N-Монометил-L-Аргинин; L-NAME: N-Нитро-L- Аргининметилестар)



**Слика 14** Синтеза азот оксида (NO). NO се синтетише у постсинаптичкој ћелији из аминокиселине L-аргинина, активирањем NO-синтазе (NOS) Ca<sup>2+</sup> - калмодулинским комплексом, уз присуство коензима птеридина (BH<sub>4</sub>), при чему настаје и цитрулин)



**Слика 15** Фактори који подстичу стварање NO у ендотелским ћелијама (R: рецептор; cNOS: конститутивна NO синтаза; iNOS: индуцибилна NO синтаза; GTP: гванозинтрифосфат; cGMP: циклични гванозинмонофосфат).

Неуронална NOS (nNOS), која продукује NO у периферном и централном нервном систему, има улогу у ћелијској комуникацији и везана је за плазма мембрану. Индуцибилна NOS (iNOS) - присутна је у имуном систему, као и у кардиоваскуларном систему. Ендотелна или конститутивна NOS (eNOS/cNOS) - ствара NO у крвним судовима и учествује у регулацији њихове функције услед дејства различитих стимулуса (ангиотензин II, ацетилхолин, цитокини). eNOS је везана за плазма мембрану ћелије и за мембрану Goldži апарата у ћелији.

Све NOS изоформе имају цинк тиолат групацију. NOS ензими имају четири редокс активне простетичне групе (FAD, FMN, хем и BH<sub>4</sub>), које могу проводити електроне до кисеоника. Стога, пренос електрона у NOS ензимима мора бити строго контролисан, да би се

спречило одвајање редукције кисеоника од NO синтезе, што би функционалан NOS учинило нефункционалним супероксид продукујућим ензимом (Stuehr i sar., 2001).

Ефект инхибиције NOS зависи од изоформе NOS која је инхибирана. eNOS и nNOS су  $Ca^{2+}$ -зависне, док iNOS није. Када је повећана количина интрацелуларног  $Ca^{2+}$ , eNOS активност знатно расте.  $Ca^{2+}$  индукује везивање CaM за ензим, што повећава пренос електрона са NADPH на хем (Hemmens & Mayer, 1998). iNOS није регулисан  $Ca^{2+}$ , али га индукују ROS и инфламаторни цитокини, активацијом NF- $\kappa$ B и MAPK (Adams i sar., 2002). Забележен је повећан ниво iNOS mRNK у скелетним мишићима пацова након акутног вежбања (Balon, 1999; Gomez-Cabrera i sar., 2005). Ипак, хронично вежбање није индуковало iNOS у мишићима пацова, али је повећало nNOS и eNOS активност и експресију протеина (Vassilakopoulos i sar., 2003; Ji, 2008). Индукција iNOS је углавном катаболичка и коекспримирана је са проинфламаторним цитокинима и адхезионим молекулима током повреде и замора мишића (Schulze i sar., 2002). eNOS се такође може индуковати стимулусом који не изазива непрекидан пораст  $Ca^{2+}$ , а изазива дуготрајно ослобађање NO. Најпознатији такав стимулус је *shear* стрес протока крви, који може повећати активност ензима при мировању  $Ca^{2+}$ . Ова активација ензима настаје услед фосфорилације серина акт/протеин киназом B, протеин киназом A (PKA), 5'-AMP активираним протеин киназом (AMPK) и калмодулин зависном киназом II (CAMKII). С друге стране, фосфорилација треонина (протеин киназом C, PKC), смањује ензимску активност (Forstermann, 2010).

Због тога што се у патолошким стањима повећава синтеза NO-а из L-аргинина (ендотоксични шок), претпоставља се да би снижавање нивоа циркулишућег L- аргинина, инфузијом аргиназе (из говеђе јетре), могло спречити даљи пад артеријског притиска и изазвати хипертензивни ефект. С друге стране, неке супстанције, на пример, Na- нитропрусид, спонтано генеришу NO у воденим растворима, док неке друге, на пример, нитроглицерол, то чине тек у присуству тиолних једињења, као што је цистеин (Теравчевић i sar., 2008; Varagić i Milošević, 2010).

### **Улога NO у релаксацији глатких мишића (вазодилатација/токолиза)**

NO, који се синтеше у васкуларном ендотелу као одговор на физичке и хемијске стимулусе, је есенцијалан за одржавање нормалног протока крви и висине крвног притиска. Главни физички стимулус за ослобађање NO је нагло повећање протока крви, при чему су ћелије изложене већем трењу. Повећање периферног васкуларног отпора током физичког рада, хипоксија, механичко истезање и други фактори, могу довести до повећане синтезе и

ослобађања NO, а тиме и настанка изражене вазодилатације крвних судова срца и скелетне мускулатуре. Физички напор је круцијалан стимуланс за синтезу и ослобађање NO, због повећања регионалног протока крви. Активацијом специфичних рецептора ендотела, као што су мускарински, хистамински, серотонински, вазопресински и брадикинински, различитим хемијским агенсима/лековима, може се постићи ослобађање NO, који стимулацијом гванилатне циклaze повећава концентрацију цикличног гванозин монофосфата (сGMP), као предуслова за релаксацију глатких мишића крвних судова, али и утеруса (сл. 15, 16). NO је посебно користан јер инхибира оксидацију липопротеина мале густине, који су важан фактор ризика у патогенези атеросклерозе (Теравчевић и сар., 2008; Moncada, 1997).

Ендогено ослобођен или егзогено додат ацетилхолин изазива посредну релаксацију глатких мишића крвних судова, ослобађањем NO из ендотелијалних ћелија. Такође, ослобођени NO је значајан за вазодилатацију крвних судова одговорних за ерекцију. Пошто је запажено да NO разара хемоглобин, његов ефекат на проток крви може да служи као само-ограничавајући механизам ефекта NO на проток крви. Његово формирање у васкуларним ендотелним ћелијама као одговора на хемијске и физичке стимулусе одржава вазодилаторни тонус, који је есенцијалан за одржавање нормалног протока крви и нормалне висине крвног притиска. Тако на пример, животиње којима је оштећен ген који детерминише синтезу ензима неопходног за продукцију NO (сл. 15) имају хипертензију, јер им је смањена базална и стимулирана продукција NO у васкуларном ендотелу (Stojiljković, 1998; Schubert i sar., 2004; Moncada, 1997).

***За NO је такође доказана токолитичка улога***, односно да је снажан инхибитор спонтаних контракција утеруса. У истраживању где су коришћени NO донори и прекурсори NO, показано је да се релаксација глатких мишића негравидног хуманог утеруса одвија преко сGMP-независног пута. Претпоставља се да се ова релаксација одвија, као и код крвних судова, отварањем калијумских канала. У експерименту са гравидним утерусом где је коришћена „patch clamp“ техника, пружени су директни докази да NO може одржавати мировање хуманог утеруса за време трудноће, активацијом  $Ca^{2+}$ -зависних  $K^{+}$  канала. Метиленско плавило, блокирањем ензима гванилатне циклaze и спречавањем стварања цикличног GMP-а, инхибира релаксацију глатких мишићних ћелија која зависи од сGMP-а. NO ослобођен из ендотелних ћелија, такође ***инхибира агрегацију и адхезију тромбоцита***, као и леукоцитну адхезију и модулира пролиферацију глатких мишићних ћелија (Shimano i Nakaya, 2000; Orešćanin i sar., 2004; Теравчевић и сар., 2008).

#### ***Азот моноксид као слободан радикал***

Азот-моноксид (NO) је веома лабилна супстанца, која може да брзо интерагује са металним јонима, сулфхидрилним групама, јоном супероксида и слободним радикалима

кисеоника. Азот моноксид је неполаран молекул са особинама слободних радикала јер садржи један неспарен електрон, који се од других слободних радикала разликује јер нема тенденцију да димеризује (Henry i sar., 1993; Fukuto, 1995).

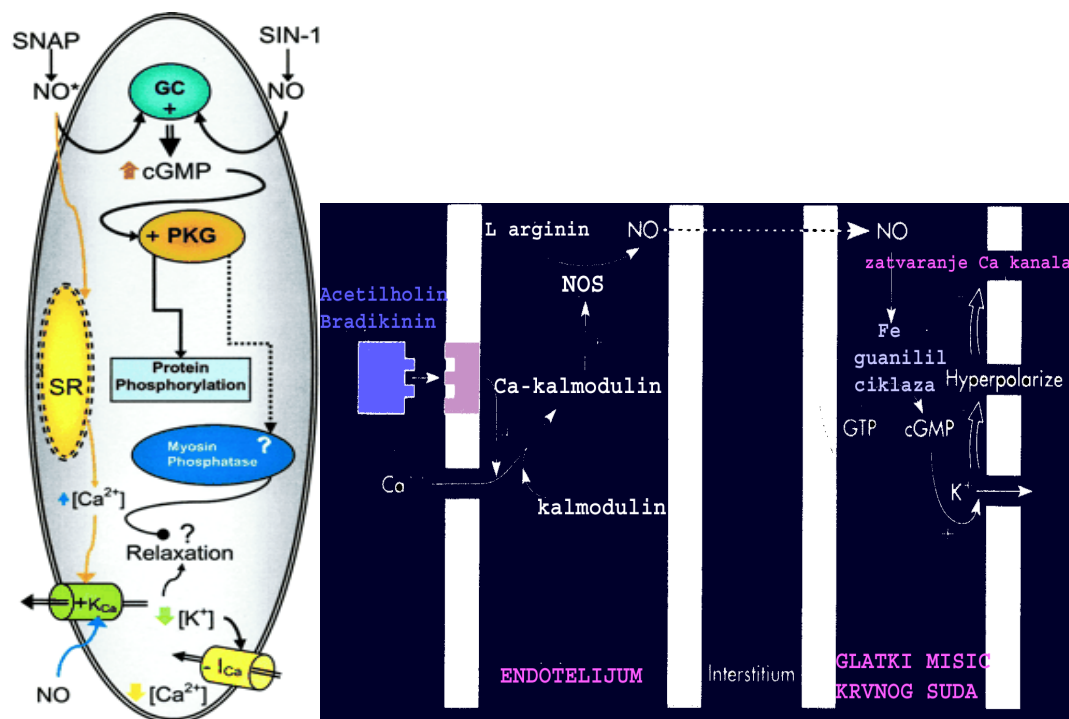
**NO** лако дифундује кроз ћелије, а дистанцу дифузије врста одређује њихов полуживот (ROS имају различите полуживоте). Тако на пример, SOD дифундује током свог полуживота до дистанце од 0.4mm, а пероксинитрит 5 mm, што га ограничава на локално деловање унутар ћелије у којој настаје. Насупрот њему, NO досеже дистанцу дифузије од 100 mm, што му омогућује дејство и у суседним ћелијама, односно паракрини утицај из ендотелних ћелија крвног суда на глатки мишић смештен испод њих. NO може да реагује и са слободним радикалима кисеоника, стварајући токсично оксидационо једињење – пероксинитрит ( $\text{ONNO}_2^-$ ), са полуживотом од свега једне секунде. При нормалним физиолошким условима, каталитичка активност цитосолне, митохондријалне и екстрацелуларне супероксидизмутазе (SOD) штити ћелије, тако што катализује реакцију претварања  $\text{O}_2^-$  у водоник-пероксид и кисеоник. Међутим, висок ниво NO компетише за ову дисмутациону реакцију, што води настанку поменутог пероксинитрита, који може са својим продуктима деградације да допринесе оштећењу ћелије, појавом пероксида липида и нитрификацијом тирозина. Значи,  $\text{O}_2^-$  лимитира физиолошку функцију NO. С друге стране, NO је у стању да уклања слободне радикале и да делује као универзални цитопротективни агенс. У нормалним условима ћелије су заштићене од оштећења пероксинитрита синергистичким деловањем SOD и редукованог глутатиона. Под дејством SOD, реакција L-arg/NO помера се у правцу ослобађања NO. Реакција  $\text{NO/O}_2^-$ , у физиолошким концентрацијама, као резултат има формирање S-нитрозо глутатиона, који је, за разлику од слободног NO, стабилан у присуству кисеоника и служи као транспортна или складишна форма NO, из које се ослобађа посредством јона калцијума (Pacher i sar., 2007; Myatt, 2010).

### ***Молекуларне интеракције NO и гванилатне циклазе/механизам деловања***

Већина ефеката које остварује NO су резултат дејства азот-моноксида на ензим-солубилну гванилат циклазу (GC), која у своје молекулу садржи хем, одговоран за њену активацију. Приликом везивања NO за  $\text{Fe}^{2+}$  у порфиринском прстену хема, настаје конформацијска промена и активација циклазе GC, услед које се повећава ниво cGMP, који затим, модулацијом јонских канала, блокира улазак калцијума у ћелију (сл. 15, 16), утиче на активност фосфодиестеразе или активира протеин киназе зависне од cGMP. Пораст cGMP-а под дејством NO у глатким мишићним ћелијама, може да активира cGMP зависну протеин киназу, преко које се одвија релаксација мишића. Такође, cGMP смањује интрацелуларни ниво  $\text{Ca}^{2+}$ , што опет доводи до релаксације. Поред тога, недавно је откривено да NO може, у крвним судовима, директно да активира  $\text{Ca}^{2+}$ -зависне  $\text{K}^+$  канале, изазивајући хиперполаризацију



васкуларног ендотела (сл. 16) и вазодилатацију. Реакција између NO и GC може се инхибирати метиленским правилом. (Stojiljković, 1998; Oreščanin i sar., 2004; Teravčević i sar., 2008; Kordić-Bojinović, 2011).



Слика 16 Релаксанти механизам деловања NO на глатким мишићима крвних судова

Молекуларни аспекти деловања NO су последица његове снажне реакције са кисеоником, супероксид ањоном и гвожђем хема, као и нехем гвожђем. Треба истаћи да NO и његови деривати, такође реагују са тиолима и глутатионом, образујући нитрозотиоле (Oreščanin i sar., 2007). Нитрозилација ензима (GAPDH, протеин киназе C, фосфотирозин фосфатазе и NADPH оксидазе) смањује њихову каталитичку активност. Неки истраживачи сматрају да ефекти NO могу бити *директни и индиректни*.

*Директно деловање* NO подразумева реакције у којима NO директно реагује са циљним молекулима. Тако на пример, ендотел крвних судова, ослобађајући NO, генерише импулс околним глатким мишићима да се, после сложене каскадне молекуларне интеракције, релаксирају. NO, као јако реактиван слободни радикал, улази у глатке мишићне ћелије крвног суда и реагује са солубилном фракцијом ензима гванилат циклaze (sGC). Услед интеракције између NO и гвожђа у оквиру хема, долази до одвајања хистидинског остатка и активације ензима. Активирана sGC синтетише циклични гванозин монофосфат (cGMP). Солубилни cGMP активира cGMP-зависну протеин киназу (PKG). PKG фосфорилише бројне протеине који

регулишу концентрацију калцијума, интеракцију актина и миозина, инхибицију фосфолипазе C, уз релаксацију глатког мишића као крајњи ефект. Ова сложена молекуларна интеракција је основа механизма дејства нитроглицерина, амилнитрата и других нитратних деривата у лечењу оболелих од ангине пекторис и плућне хипертензије (McDonald & Murad, 1994, 1995; Fukuto, 1995).

**Индиректно деловање** NO подразумева његову већ поменућу интеракцију са супероксид ањон радикалом или молекуларним кисеоником, након чега настаје врло токсичан пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>), који може оксидовати/нитрирати друге молекуле, или се распадати и произвести друге реактивне врсте (OH<sup>-</sup> и NO<sub>2</sub>) и на крају довести до оксидационог стреса (Halliwell, 1999; Halliwell and Long, 2000). Пероксинитрит изазива модификацију протеина, механизмом другачијим од ROS и NO, нитрацијом, тако што брзо реагује са триптофаном, тирозином или цистеином и изазива сакупљање протеинских карбонил група. Ова нитрација и ковалентна модификација протеина је описана као нитративни стрес. Ковалентне модификације настале нитрацијом узрокују губитак функције многих протеина, као SOD и PGI<sub>2</sub> синтаза, али и успостављање функције код других, као PARP и COX-2 (Myatt, 2010).

За разлику од већине **неуротрансмитера** који преносе информацију само са пресинаптичког на постсинаптички неурон, NO, као мали молекул, може дифундовати свуда у ЦНС и тако деловати и на суседне неуроне који нису повезани синапсом, што је од значаја за формирање меморије, координацију нервне активности, проток крви и модулацију перцепције бола. Поред тога, у периферном нервном систему NO је медијатор антиадренергичке и антихолинергичке активности, која доприноси неурогеној вазодилатацији и модулирању функције гастроинтестиналног (повећање капацитета за складиштење хране и течности), респираторног и генитоуринарног тракта (Moncada, 1997.). **NO има улогу у постизању и одржавању ерекције пениса**, јер омогућавањем вазодилатације допрема се више крви у corpus cavernosum. На тај начин делује лек *sildenafil*, који инхибицијом фосфодиестеразе повећава концентрацију cGMP, а тиме вазодилатацију, односно ерекцију. **NO има улогу у ћелијском имуном одговору**, нарочито макрофага, чиме доприноси њиховом цитотоксичном ефекту против туморских ћелија, вируса, бактерија и осталих патогена. Међутим, приликом сепсе, макрофаги производе велику количину NO како би убили бактерије, услед чега настаје вазодилатација, која је највероватније главни узрок хипотензије приликом септичног шока. Цитостатички и цитотоксични ефекат NO је резултат његовог инхибиторног дејства на кључне ензиме у респираторном циклусу и синтези DNK у туморским ћелијама. У високим концентрацијама NO је токсичан, па се сматра делом и одговоран за оштећења настала срчаним ударом. NO, такође инхибира митохондријалну респирацију, компетицијом са кисеоником за цитохром оксидазу (Brown & Borutaite, 1999; Warner i sar., 2004).

**NO, такође утиче и на AOS механизам ћелија.** NO- посредована инактивација глутатион пероксидазе се дешава прво нитровањем селенијума (овај процес је реверзибилан, додавањем редукујућег агенса као што је дитиотреитол). Други корак је иреверзибилна реакција стварања сулфур-селено моста (Miyamoto i sar., 2003). NO при малим концентрацијама има антиоксидативну функцију, неутрализацијом  $O_2^-$  (Reid, 2001). Његов вазодилаторни ефект повећава проток крви до активних мишића и тако побољшава допремање енергетских субстрата и антиоксиданата (Ji, 2008).

### **L-аргинин**

L-аргинин је прекурсор NO, а ову реакцију катализује ензим NO-синтаза. Акутна инфузија L-аргинина код човека значајно повећава ендотел зависну вазодилатацију. Високе дозе L-аргинина повећавају проток крви кроз крвне судове срца, мезентеријума, плућа и јетре, не мењајући при томе укупан периферни отпор и крвни притисак. Претпоставља се да је разлог томе стимулативно дејство L-аргинина на срчане хемодинамске параметре (ударни и минутни волумен, пуњење). Ово дејство L-аргинина може се антагонизовати са L-NAME. L- аргинин, међутим, може изазвати и значајну хипотензију код нормотензивних пацова, али само код животиња претретираних физостигмином. Насупрот томе, хипертензивни ефекат физостигмина код пацова остаје непромењен после или у току и. в. инфузије L-аргинина (Geldern i sar., 1991; Schubert i sar., 2004; Prostran i sar., 1994; Orešćanin i sar., 2004; Varagić i Milošević, 2010).

L-аргинин (преко L-аргинин-NO система) у облику инфузије значајно смањује, код животиња, степен плућне хипертензије изазване хипоксијом или тромбоксаном. Такође, растуће концентрације L-аргинина проузрокују концентрацијски-зависну инхибицију спонтане ритмичке активности изолованог утеруса. Ова инхибиција спонтаних контракција утеруса, највероватније се одвија преко cGMP-независног пута. L-аргинин изазива пораст лучења инсулина код људи, који L-NAME само делимично блокира и при томе не мења концентрације глукозе и инсулина у плазми. Насупрот овим резултатима *in vivo*, у експерименту са културом ендокриног ткива панкреаса миша, L-NAME је дозно-зависно потенцирао ефект L-аргинина на ослобађање инсулина (Natuzzi i sar., 1993).

Забележена је повећана синтеза NO током нормалног гравидитета животиња, као и смањена продукција NO у трудноћи, одговорна за вазоконстрикцију и прееклампсију код жена. Не постоји довољно података о ефектима примене NO донора у трудноћи, али није уочен њихов тератогени или ембриотоксични потенцијал. Артериосклероза у крвним судовима оштећује ендотел, а тиме смањује стварање NO и могућност вазодилатације. Изгледа да је ендотелна дисфункција изазвана повећањем деградације NO, последица дисбаланса између активности

SOD-a и продукције супероксид ањона у артериосклеротичним крвним судовима. Такође, хипертрофија глатких мишићних ћелија артериола која се јавља код хипертензије, може бити последица смањене NO синтезе. Лекови који се користе у терапији артериосклерозе служе као NO донори и аналози cGMP и инхибишу пролиферацију глатких мишићних ћелија. Обзиром да NO има релативно кратак биолошки полуживот од 5–10 секунди, само се у облику гаса користи као лек код плућне хипертензије (Choi i sar., 2002; Oreščanin i sar., 2004).

### **Пентоксифин**

*Пентоксифин*, дериват метилксантина, користи се као лек у терапији периферних васкуларних обољења, јер шири крвне судове и мења реолошке карактеристике крви, што олакшава проток крви кроз сужене артерије и крвне судове малог дијаметра. Пентоксифин повећава способност еритроцита да мењају облик и лакше пролазе кроз сужене крвне судове. Поред тога, испољава антиагрегацијски ефект (Kordić-Bojinović i sar., 2010). Пентоксифин смањује ослобађање тумор некрозис фактора алфа (TNF алфа) и других садржаја лизозома неутрофила и смањује њихову адхезију за ћелије ендотела и површине других ћелија, што је основа смањења запаљенске реакције и стварања тромба. На лимфоцитима, пентоксифин инхибира експресију рецептора за IL2. Пентоксифин спречава ослобађање фактора раста пореклом из тромбоцита и на тај начин спречава пролиферацију фибробласта. Пентоксифин је стимулатор покретљивости сперматозоида, због чега се користи у *in vitro* фертилизацији за појачавање опходне моћи сперматозоида (Matson i sar., 1995). Молекуларни механизам релаксантног деловања пентоксифина, посебно на крвним судовима, још увек није довољно јасан, уз постојање супротстављених закључака. Нека истраживања указују да је вазодилататорно дејство и побољшање циркулације са пентоксифином, повезано са ендотелним ћелијама (Sonkin i sar., 1992; Milovanović i sar., 2013). Неки аутори као кључни механизам деловања пентоксифина наводе инхибицију ензима фосфодиестеразе (Kamphius, 1994; Calogero i sar., 1998), док други искључују ову претпоставку (Karutlu and Sadan, 1994).

### **Пинацидил**

*Пинацидил* (дериват цијаногванидина), који је испитиван у нашим експериментима као отварач КК, познат је од 1987., захваљујући Bray i saradnicima (1987), релаксира васкуларни глатки мишић, вероватно отварањем  $K_{ATP}$  канала и хиперполаризацијом мембране васкуларног глатког мишића. Међутим, постоје претпоставке да пинацидил у свом деловању укључује, не само отварање ове врсте калијумских канала, већ и друге механизме, међу којима и сигналне путеве NO. Постоје бројни подаци о ефекту пинацидила на крвне судове (регистрован као антихипертензивни лек), али се релативно мање зна о његовом утицају на глатку мускулатуру

утеруса. Jovanović i saradnici су 1994. године показали да пинацидил проузрокује дилатацију артерије утерине активацијом  $K_{ATP}$  канала, а Morrison i saradnici (1993) да истим механизмом инхибира и контракције хуманог гравидног утеруса. Међутим, на истом експерименталном моделу, Khan i saradnici (1998) су сугерисали да се релаксација одвија путем активације  $Ca^{2+}$ -зависних калијумских канала. Утицај пинацидила на негравидни утерус није довољно проучен. Стога је за разумевање регулације контракције и релаксације утеруса важно схватање механизма који укључује активност калијумских канала. Модулација експресије и активности калијумских канала, поред калцијумских, може омогућити алтернативне терапијске путеве за контролу миометријалне контрактилности (Jokanović i sar., 2012; Novaković i sar., 2007; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012, 2013).

### Протамин - сулфат

Протамин-сулфат је генерички назив за мешавину сулфата базних пептида, који се добијају у пречишћеном стању из сперме и тестиса риба из породица Clupeidae или Salmonidae. Протамин као 1% водени раствор носи вишак позитивног електричног наелектрисања и понаша се као јака органска база, што је основа његовог антидотског деловања код предозирања хепарином који се понаша као киселина. Из интеракције настаје со, као стабилни комплекс, који нема антикоагулантна својства. Клиничка ефикасност протамина у антагонизовању антикоагулантног ефекта хепарина, који се иначе користи за обављање екстракорпоралне циркулације у васкуларној хирургији, катетеризацији срца, хемодијализи и леукоферези, добро је позната. Протамин је такође индикуван за лечење предозирања хепарином када постоји хеморагија или повећан ризик од хеморагије. Примењује се у дози од 1 до 2 mg и. в. на сваких 100 јединица хепарина. Протамин-сулфат има самостално антикоагулантно дејство ако се да особи која није лечена хепарином, али то нема клиничког значаја. У новије време откривен је значајан концентрацијски и ендотел зависан вазорелаксантни ефекат протамина у *in vivo* условима, али и на изолованим крвним судовима узетим од нормотензивних и хипертензивних животиња. Обзиром да протамин-сулфат изазива значајан ендотел-зависан вазорелаксантни ефекат, ми смо у овој тези испитивали механизам релаксантног ефекта протамин-сулфата на глатки мишић изолованог утеруса пацова. Због тога смо проучавали ефект ове супстанције у присуству метиленског плавила, пропранолола, индометацина, L-аргинина, али и блокатора калијумских канала. Показано је да протамин-сулфат узрокује концентрацијски-зависну релаксацију глатког мишића утеруса, вероватно стимулативним деловањем на ослобађање азот-моноксида, путем активације ендотелне NO-синтазе. На овај закључак наводи чињеница да, присуство метиленског плавила (инхибитор cGMP-a), односно пропранолола (инхибитор

cAMP-a), није утицало на релаксантни ефекат протамина (Oreščanin i Milovanović, 2006; Oreščanin i sar., 2007; Oreščanin i sar., 2010; Kordić-Bojinović i sar., 2011).

## ЈОНСКИ КАНАЛИ/КАЛИЈУМСКИ КАНАЛИ

Ћелијска мембрана сваке ексцитабилне ћелије, која раздваја ванћелијску течност богату натријумом и калцијумом од цитосола богатог калијумом, садржи огроман број канала сличних порама, који могу бити затворени и тада су непропустљиви за јоне. Међутим, када су отворени, ови канали пропуштају милионе јона у свакој секунди, а правац кретања ових јона је одређен концентрацијским градијентом, па због тога, натријум и калцијум улазе у ћелију, а калијум излази из ћелије. Капацитет преноса јона кроз ове канале је велики, па тако сваки калцијумски (или натријумски) канал може да транспортује три милиона јона калцијума (или  $\text{Na}^+$ ) у једној секунди. Јонски канали се, на основу своје јонске специфичности, осетљивости према блокаторима, као и на основу брзине њихове активације, класификују на брзе и споре канале. Активација брзих канала се врши за свега неколико милисекунди, а активација спорих канала за неколико стотина милисекунди. Брзи канали преодминантно пропуштају јоне натријума, па се понекад називају само натријумски канали. Спори канали највише пропуштају калцијум, али су ипак по својој функционалности хетерогени, па поред  $\text{Ca}^{2+}$ , пропуштају и друге јоне. Неки јонски канали (познати као лиганд - зависни, односно рецепторски јонски канали или јонотропни рецептори) уграђени су у рецептор и отварају се само када се агонист веже за тај рецептор; остали јонски канали се отварају путем различитих механизма, а волтажно - зависне јонске канале треба споменути као посебно важне. Генерално, лекови утичу на функцију јонских канала тако што ступају у интеракције, или са рецепторским местом лиганд - зависних јонских канала, или са осталим деловима молекула канала. Интеракција може бити индиректна, тј. да укључује G – протеин и остале посреднике или директна, када се лек везује за јонски канал и мења његову функцију. Многи лекови модулирају функцију мембранских јонских канала и тим механизмом испољавају своје терапијске ефекте. Тако на пример делују локални анестетици, антиаритмијски лекови, антагонисти калцијума и деривати сулфониурее. Због тога што је ова теза у великој мери посвећена проучавању улоге калијумских канала и њиховој интеракцији са NO у механизму релаксантног деловања пентоксифилина, протамин-сулфата и пинацидила, у уводном поглављу ове дисертације биће говора само о калијумским каналима.

## Основне карактеристике калијумских канала

У миометријуму до данас је откривено више подтипова  $K^+$  канала (детално обрађени у посебном поглављу), међу којима су најприсутнији и најбоље изучени  $Ca^{2+}$ - високопроводни- волтажно-зависни  $K^+$  канали ( $BK_{Ca}$ ), АТР-зависни  $K^+$  канали ( $K_{ATP}$ ), волтажно зависни  $K^+$  канали ( $K_v$ ) и слабо проводни  $Ca^{2+}$  зависни  $K^+$  канали ( $SK$ ). Структура и типови/субтипови калијумских канала били су дуги низ година велика непознаница и загонетка, због недостатака специфичних лиганда за њихову активацију, односно блокирање. Значајан напредак у истраживању структуре појединачних  $K^+$  канала је настао након открића животињских токсина који су високо специфични за поједине типове, али и са увођењем електрофизиолошких метода („voltage clamp“ и „patch clamp“). Калијумски канали су полипептиди, који садрже шест трансмембранских сегмената, молекулске тежине 70,2 kDa, састављени од 616 аминокиселина. Сегмент четири је нарочито богат позитивно наелектрисаним аминокиселинама и има улогу напонског сензора. Претпоставља се да четири овакве јединице граде калијумов канал. Калијумов канал може бити хомо-олигомер или хетеро-олигомер. Комбинацијом различитих јединица настају калијумски канали са различитим функционалним својствима, што је основа за идентификацију типова и субтипова калијумских канала. Разматрањем молекулске структуре ових протеина, уочено је да сви садрже јединствену трипептидну секвенцу у сегменту поре, која се може сматрати селективним потписом  $K^+$  канала, а разлике се испољавају у броју сегмената, пептидима на њиховим завршцима и помоћним субјединицама. Калијумски канали су мембрански протеини, који селективно проводе  $K^+$  јоне кроз ћелијску мембрану низ електрохемијски градијент, брзином од  $10^6$ - $10^8$ /s.  $K^+$  канали имају улогу у регулацији мембранског потенцијала у електрично екситабилним ћелијама. Отварањем  $K^+$  канала у глатким мишићним ћелијама се ослобађа  $K^+$  и долази до хиперполаризације мембране, услед чега се затварају волтажно-зависни  $Ca^{2+}$  канали, смањује улазак  $Ca^{2+}$  и настаје релаксација. Насупрот томе, блокада  $K^+$  канала, проузрокује деполаризацију мембране и контракцију. Калијумски канали су највећа и најразноврснија група јонских канала. Има око 70 познатих локуса ових канала у геному сисара (Andus, 2001.). Одређивање структуре бактеријског канала *KcsA Streptomyces lividans* (1998.godine) омогућило је први увид у грађу  $K^+$  канала, због њихове структурне сличности (MacKinnon i sar., 1998). Иако је последњих година пронађено мноштво гена који учествују у кодирању ових канала, што је омогућило њихово клонирање и одређивање структуре, није још увек дошло до потпуног разјашњења њихове молекулске структуре и функције, упркос великом броју доказа који показују да је дисфункција калијумских канала уско повезана са одређеним оболењима (Shieh i sar., 2000). Један од најбоље проучених типова  $K^+$  канала је калцијум зависни калијумов канал ( $BK_{Ca}$ ), који је значајан за одржавање

потенцијала мировања и акционог потенцијала, посебно током гестационог периода и порођаја, јер се његовом инхибицијом обезбеђује повећани ниво интрацелуларног  $\text{Ca}^{2+}$ , неопходног за порођајне контракције. АТР-зависни калијумов канал ( $\text{K}_{\text{АТР}}$ ), који је фармаколошки, али не и сасвим електрофизиолошки доказан у утерусу, је такође важан, јер има сулфониуреа рецептор, за који се везују деривати сулфониурее (глибенкламид и толбутамид), који у експериментима служе као индикатори функција  $\text{K}_{\text{АТР}}$  канала (Andus, 2001.). Подтип, експресија, дистрибуција и функција  $\text{K}^{+}$  канала у утерусу, који су важни за контрактилност, су променљиви и зависе од метаболизма ћелије, гестационог периода, порођаја и старосног доба, због чега је разумљиво што постоји много подтипова и изоформи сваког од типова калијумских канала (Andus, 2001; Shieh i sar., 2000; Khan i sar., 2001).

Многобројни процеси у организму (ослобађање неуротрансмитера, рад срца, секреција инсулина, екситабилност неурона, транспорт електролита, контракција глатких мишића) су незамисливи без отварања или затварања  $\text{K}^{+}$  канала. *Због тога су мутације гена који кодирају  $\text{K}^{+}$  канале, или саме промене функције ових канала, уско повезане са оболењима срца, крвних судова, бубрега, панкреаса, ЦНС и сепсом. С друге стране, разна патолошка стања, која иницијално нису у вези са овом врстом јонских канала, могу на крају да промене функцију  $\text{K}^{+}$  канала и изазову одређену болест. Многи генски локуси који су повезани са наследним или стеченим оболењима имају за основу абнормалност протеина који граде  $\text{K}^{+}$  канале (Ko i sar., 2008; Jokanović, magistarski rad, 2011; Stanković, magistarski rad, 2012).*

Неколико врста  $\text{K}^{+}$  канала, путем утицаја на мембрански потенцијал мировања, рефрактарност и трајање акционог потенцијала, омогућују да акциони потенцијал вентрикуларних кардиомиоцита буде знатно продужен у односу на акциони потенцијал нервних ћелија, што је неопходно за правилан ритам срчаних контракција. Промене у броју или особинама  $\text{K}^{+}$  канала током развоја или услед болести, могу довести до поремећаја у раду срца. Тако на пример, откривена је директна веза између наследних поремећаја које карактерише продужена или одложена фаза реполаризације комора (на ЕКГ-у продужен QT интервал) и мутација на нивоу  $\text{Kir}$  канала (Shieh i sar., 2000). Неколико студија је показало да промене мембранских рецептора и интрацелуларних сигналних путева (повећана концентрација интрацелуларног  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP-а, инозитол фосфата и диацилглицерола), које су удружене са хипертрофијом и инсуфицијенцијом миокарда, за основу имају промене броја и/или особина  $\text{Kv}$  канала, односно смањен проток јона кроз ове канале (Wickenden i sar., 1997; Martens i Gelband, 1996; Kim i sar., 2001; Wellman i sar., 2001).

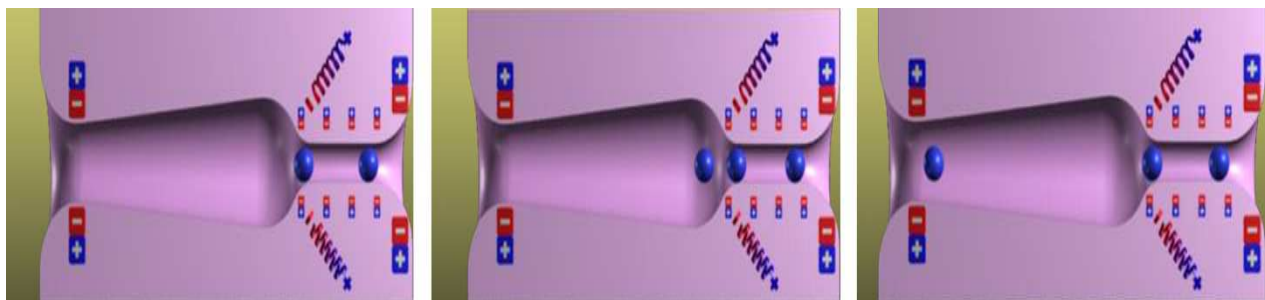
Добро је познато да је дијабетес последица измењене функције  $\text{K}_{\text{АТР}}$  канала у панкреасу, као и да блокатори ових канала, попут глибенкламида, се користе у терапији овог оболења. Такође, изнети су експериментални подаци да се у сепси појачава активност  $\text{K}_{\text{АТР}}$  канала, што



указује на то да примена глибенкламида може да буде од користи (Shi i sar., 2012). Код спонтано хипертензивних пацова, проток кроз  $K_{ATP}$  канале у ћелијама аорте је смањен у односу на исте канале нормотензивних пацова, што указује да је у хипертензивним крвним судовима смањена функција или експресија  $K_{ATP}$  канала (Ghosh i sar., 2004). С друге стране, појачана функција  $ВК_{Ca}$  канала се често налази код хипертензивних болесника (Liu i sar., 1998). Неке најновије студије показују и други угао гледања, а то је да неке болести, попут исхемије, хипертрофије миокарда и дијабетеса, могу мењати и функцију  $K_{ir}$  канала, још увек недовољно разјашњеним механизмом (Mayhan i sar., 2004; Park i sar., 2007b). Међутим, по нашем мишљењу, пре је за веровање да генетске промене на калијумском каналу могу да буду узрок појаве одређеног оболења.

### Структура калијумских канала

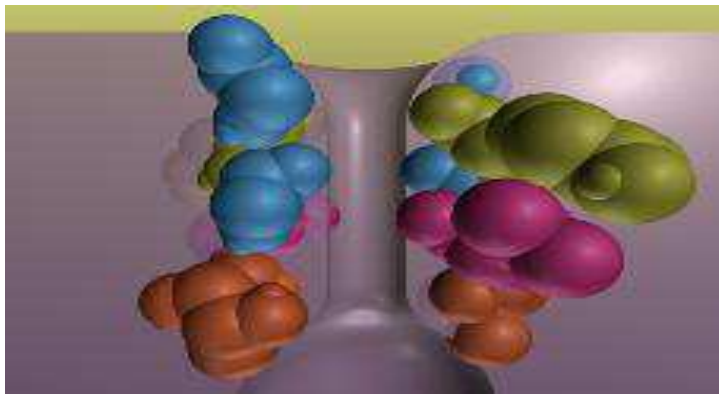
Калијумски канали су мембранске полимерне структуре, на којима је могуће разликовати екстрацелуларни и интрацелуларни отвор, као и трансмембрански део канала у коме се налази механизам (капије), који служи као прекидач између отворене и затворене конформације канала. Унутар канала налазе се наелектрисане регије каналских протеина, назване волтажни сензор и оне одређују да ли се „капије“ отварају или затварају (сл. 17). Канал почиње као тунел, а онда се око средишњег дела мембране шири. Дужина проводне поре је око 4,5 nm и завршава се негативно наелектрисаним подручјем које, променом електричног набоја, делује као филтер за распознавање различитих катјона, тзв. селективни филтер (Latorre & Miller, 1983; Doyle i sar., 1998; Yellen, 2002).



Слика 17 Шематски приказ попречног пресека калијумског канала

### Пора и селективни филтер

Селективни филтер је изграђен од 4 идентична полипептидна ланца (сл.18). Сваки од ових ланаца се састоји из: глицина, тирозина, валина и треонина.



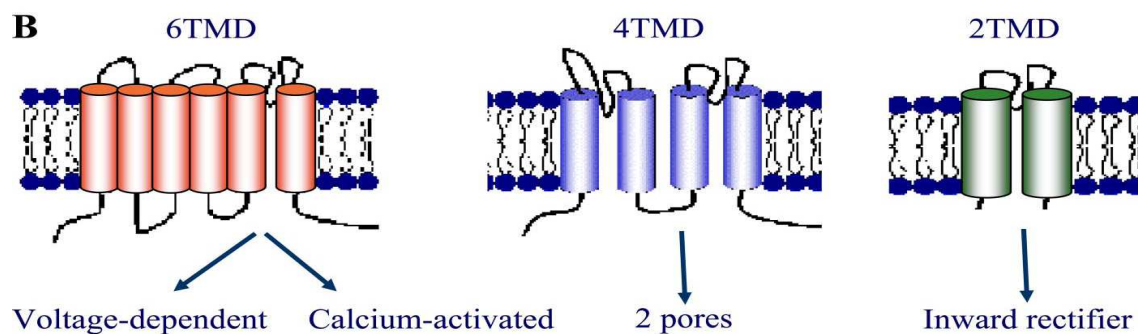
Слика 18 Полипептидни ланци селективног филтера

Као што је већ наглашено,  $K^+$  - канал проводи углавном јоне  $K^+$ , док не пропушта јоне  $Na^+$ , иако су они мањи. Та селективност  $K^+$  канала је вероватно заснована на већој дехидратационој енергији коју захтева јон  $Na^+$  у односу на  $K^+$ . Филтер калијумових канала је грађен тако да имитира структуру воде око јона калијума, али да при том не усвоји компактнију форму која постоји око јона натријума. Пречник селективног филтера  $K^+$  канала (најужи део канала) би требало да одговара пречнику јона Cs (3.3 ангстрема), јер је то највећи јон који може да прође кроз  $K^+$  канале. Први хидратациони омотач јона  $Na^+$  и  $K^+$  подразумева шест молекула воде. Пречници нехидратисаних јона  $Na^+$  и  $K^+$  су 1.96 односно 2.66 ангстрема, док је ефективни пречник молекула воде у хидратисаном јону већи од 2 ангстрема. Због тога, да би прошли кроз селективни филтер,  $K^+$  и  $Na^+$  јони морају уклонити 4 молекула воде из свог првог хидратационог омотача. Мањи  $Na^+$  јон захтева већу дехидратациону енергију од  $K^+$  јона, јер је његов нуклеус на мањем растојању од околних молекула воде, па је и његова интеракција са овим молекулима много јача него што је то случај код јона  $K^+$ . Због тога, јон  $Na^+$  теже пролази кроз  $K^+$  - канал од  $K^+$  јона и на томе се заснива селективност  $K^+$  канала да проводи само јоне  $K^+$ . Двовалентним катјонима је такође потребна већа енергија дехидратације у односу на  $K^+$  и зато и они теже пролазе кроз  $K^+$  канале. Такође, већи афинитет калијумовог јона у односу на натријум је омогућен и тачним уклапањем атома кисеоника око калијума. По „knock-on“ механизму, који су предложили Hodgkin & Keynes (1995), улазак једног јона са једне стране поре прати симултани излазак другог јона на супротној страни, чиме се омогућује брзо провођење. Присуство само једног јона би довело до снажне интеракције са карбонилним кисеоником и чврстог везивања за селективни филтер. Међутим, присуство више јона калијума доводи до

узајмног електростатичког одбијања дуж осе поре, дестабилизације јона, селекције јона и брзог провођења (Char – Chang Shieh i Michael Coghlan, 2000; Morais-Cabral i sar., 2001; Yellen, 2002; Roux, 2005).

Скоро сви кватернерни амонијум блокатори поре, као тетраметиламонијум (ТМА), тетраетиламонијум (ТЕА), тетрабутиламонијум (ТВА) и сродни алкил деривати, делују затварањем поре са интрацелуларне стране и спречавају проток  $K^+$  јона. Са екстрацелуларне стране поре, неки  $K^+$  канали су блокирани са ТЕА, а афинитет ове блокаде је појачан у присуству ароматичних аминокиселина које су у њиховој близини. Неки токсини (шкорпион токсин, агиотоксин), који су мали протеини, блокирају канал, везивањем за улаз поре на екстрацелуларној страни између четири субјединице. Остале познате компоненте које инхибирају  $K^+$  канале су  $Ba^{2+}$  (50  $\mu M$  за  $K_{ir}$  канале), глибенкламид (10  $\mu M$  за  $K_{ATP}$  канале) и ибериотоксин (100 nM за  $BK_{Ca}$  канале) (Roux, 2005). Бројни вазоконстриктори блокирају  $K^+$  канале, што доприноси деполаризацији мембране, углавном везивањем на неки мембрански рецептор, који затим, преко G-протеина, активира фосфолипазу, која ствара секундарне гласнике, диацилглицерол (DAG) и инозитол 1,4,5-трифосфат ( $IP_3$ ), који активирају једну од неколико изоформи протеин киназе C (PKC) (Standen & Quayle, 1998; Dixon i sar., 1994). Активација класичне PKC ( $\alpha$  и  $\beta$ ) захтева  $Ca^{2+}$ , диацилглицерол и фосфатидилсерин, у поређењу са PKC ( $\epsilon$ ) која не захтева  $Ca^{2+}$  (Ko i sar., 2008), (сл. 19).

Бројни вазодилататори, као калцитонин ген-зависан пептид (CGRP),  $\beta$ -адренергички агонисти, вазоактивни интестинални пептиди и аденозин, активирају аденилат циклазу, повећавајући интрацелуларни ниво cAMP-а, који затим активира cAMP-зависну протеин киназу (PKA). Неки други вазодилататори делују стимулацијом гванилатне циклазе, повећавањем интрацелуларног нивоа cGMP и активирају cGMP-зависну протеин киназу (PKG) (Standen & Quayle, 1998; Ko i sar., 2008). Синтетисани су бројни активатори/отварачи  $K^+$  канала, као што су: кромакалим, левкромакалим, никорандил, пинацидил, миноксидил, диазоксид и BRL-55834, који имају терапијски значај (Quayle i sar., 1997).

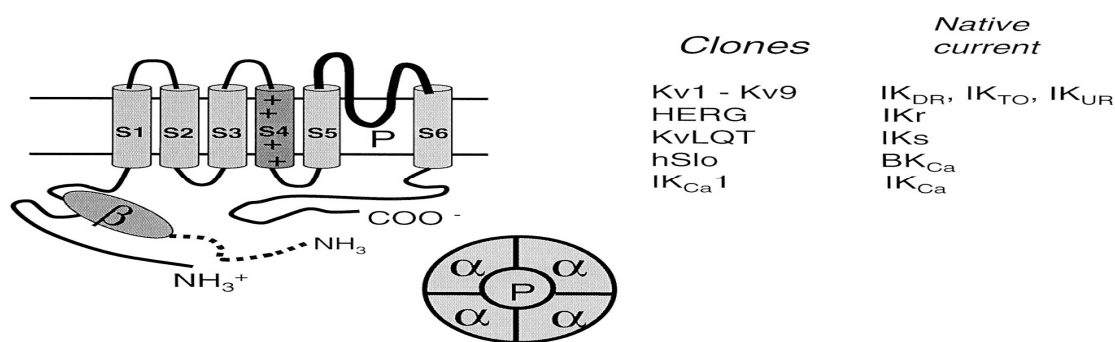


**Слика 19** Класификација  $K^+$  канала према три групе  $\alpha$  субјединица, група са 6 трансмембранских сегмената је подељена у две подгрупе: Волтажно-зависни  $K^+$  канали ( $K_v$ ) и  $Ca^{2+}$ -зависни  $K^+$  канали ( $K_{Ca}$ ). Друга група су двопорни  $K^+$  канали ( $K_{2P}$ ). Трећа група су Унутрашњи исправљач  $K^+$  канали ( $K_{ir}$ ). Трансмембрански домен (TMD).

$K^+$  канали су изграђени од четири субјединице. Хомотетрамерни  $K^+$  канали имају 4 идентичне субјединице, док хетеротетрамерни  $K^+$  канали имају различите субјединице. Сваку субјединицу граде трансмембрански хеликси, сегменти (S0-S6).  $\alpha$  субјединице граде пору канала. Описане су три групе  $\alpha$  субјединица: са 6 трансмембранских сегмената и једном пором, са четири трансмембранска сегмента и две поре и са 2 трансмембранска сегмента и једном пором (Wickenden, 1997.). Према овоме је извршена и класификација  $K^+$  канала у три групе. Језгро канала чине сегменти S5 и S6 и сегмент који их повезује, означен као H5. Волтажни сензор (позитивно наелектрисане аминокиселине) лоциран је на S4 (не постоји код канала који нису волтажно-зависни). У S4 се налази једина секвенца непромењена код свих волтажно-зависних канала. Она има на сваком трећем месту позитивно наелектрисан аргинин или лизин (Yellen, 2002).

Прва група (са 6 трансмембранских сегмената, S1-S6, и једним регионом поре) је подељена у две подгрупе: **1a) Волтажно-зависни  $K^+$  канали ( $K_v$ )** и **1b)  $Ca^{2+}$ -зависни  $K^+$  канали ( $K_{Ca}$ )**. Друга група су **двопорни  $K^+$  канали,  $K_{2P}$**  (са 2 трансмембранска сегмента, S1-S2, и једним регионом поре). Трећа група су **унутрашњи исправљач  $K^+$  канали,  $K_{ir}$**  (калијумски канали са 4 трансмембранска сегмента, S1-S4, и два региона поре). Постоји много подтипова и изоформи сваког од типова калијумских канала (Shieh i sar., 2000; Khan i sar., 2001), (сл. 19).

## 1A. ВОЛТАЖНО – ЗАВИСНИ КАЛИЈУМСКИ КАНАЛИ - $K_v$



Слика 20 Шематски приказ изгледа волтажно - зависног калијумског канала.

Убрзо након индентификације и клонирања првог гена волтажно-зависног калијумовог канала (shaker канал *Drosophila*) уследила је идентификација гена и других волтажно-лиганд-зависних канала у мувама, сисарима и другим организмима (Parazian i sar., 1987). Волтажно-зависни калијумови ( $K_v$ ) канали су специфични за јоне  $K^+$  и осетљиви су на волтажне промене, тј. отварају се и затварају услед конформационих промена изазваних променом мембранског потенцијала (сл. 20).  $K_v$  канали су највећа фамилија  $K^+$  канала, са око 40 чланова, груписаних у 12 подфамилија према секвенци аминокиселина (Gutman i sar., 2005).

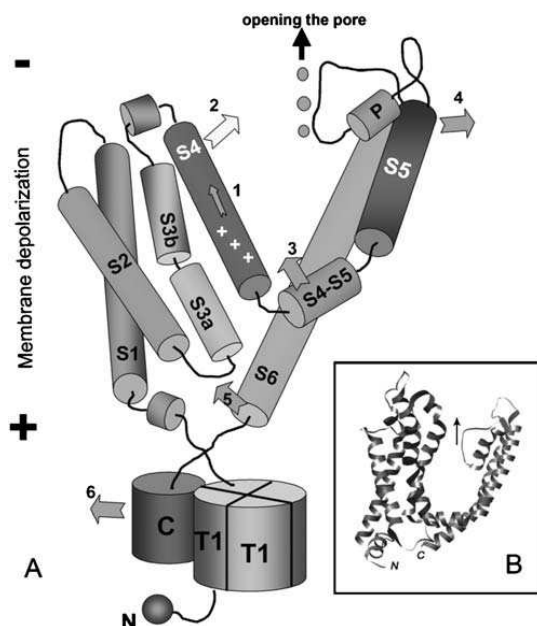
Најважнија функција  $K_v$  канала је регулација екситабилности нервног и срчаног ткива, али се могу наћи и у  $\beta$  ћелијама панкреаса (MacDonald i sar., 2002), скелетним и глатким мишићима, плаценти, плућима, јетри и бубрезима (Aaronson i sar., 2006; Appiah i sar., 2009). Мутације гена који су значајни за функцију  $K_v$  канала су одговорне за нека наследна оболења (Rajakulendran i sar., 2007), глувоћу, епилепсију (Etcheberria i sar., 2008), срчане аритмије (Keating & Sanguinetti, 2001), настанак рака, (Le Guennec i sar., 2007), или поремећаје унутар нервне мреже неурона (Lai & Jan, 2006).  $K_v$  канали имају улогу и у реполаризацији ћелијске мембране. Мала деполаризација васкуларних глатких мишићних ћелија доводи до уласка  $Ca^{2+}$  кроз L-тип  $Ca^{2+}$  канала и активације контрактилног апарата. Услед деполаризације, отварају се  $K_v$  канали,  $K^+$  излази и настаје реполаризација и повратак мембране на потенцијал мировања. Инактивација  $K_v$  канала настаје услед дуготрајне деполаризације и она је спорија у поређењу са активацијом  $K_v$  канала (сл. 21).

$K_v$  канали, заједно са  $K_{Ca}$  каналима, чине групу калијумових канала изграђених од  $\alpha$  субјединице са 6 или 7 трансмембранских сегмената (означених од S1 до S6), укључујући позитивно наелектрисан S4 сегмент, који одређује, код неких од ових канала, волтажну зависност. Сваки од  $K_v$  канала је грађен из четири субјединице које су хомологе, међусобно и са субјединицама  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  канала. Централна субјединица је  $\alpha 1$  субјединица, која гради пору

канала и одређује тип канала (сл. 20, 23, 24).  $\alpha 1$  субјединица има четири хомолога домена, I–IV, од којих се сваки састоји од 6 трансмембранских сегмената и P петље између 5. и 6. сегмента (Monsuez, 1997). Петље  $\alpha$  - субјединица окренуте су ка лумену поре и доприносе формирању  $K^+$  проводљиве поре (Shieh i sar., 2000). Домен S4 је главни део волтажног сензора, неопходног за активирање Kv канала (сл. 22). Механизму отварања/затварања такође доприноси међусобно електростатичко деловање негативних наелектрисања на доменима S2 и S3 (Seoh i sar., 1996).

Сви  $K_v$  канали су хомотетрамери (имају све четири субјединице идентичне), али могу градити и хетеротетрамере од две или више различитих типова  $\alpha$  субјединица у оквиру исте фамилије. Већи мембрански домен и мањи цитоплазматични домен су повезани танком везом. Према локализацији тетрамеризационог домена, структура  $K_v$  канала се може поделити на две групе: N-крај група и C-крај група. У  $K_v1-4$  каналима, N- крај домен има улогу у тетрамеризацији  $K_v\alpha$ - субјединице. Такође је одговоран за „N-тип“ инактивације (Marten & Hoshi, 1998). C- крај домен одређује тетрамеризацију  $K_v7$  канала (Wiener i sar., 2008) и  $K_v11$  канала (Cui i sar., 2001) и обезбеђује место везивања бројних лиганата (CaM, PIP и цикличних нуклеотида), који мењају функцију канала (Shamgar i sar., 2006). Структура мембранских домена је хомолога код свих  $K_v$  фамилија.

Након деполаризације мембране, позитивно наелектрисане аминокиселине S4 сегмента се померају ка екстрацелуларном матриксу (сл. 21 стрелица 1). S4 хеликс, сходно томе, се помера ка унутрашњости (сл. 21 стрелица 2) и повлачи N-крај S4-S5 везе (сл. 21 стрелица 3), изазивајући да се савије ка екстрацелуларној страни мембране у скоро хоризонталну позицију. Сегмент S6 се помера како би отворио пору (сл. 21 стрелица 5) (Yellen, 2002; Long i sar., 2005b; Long i sar., 2005a). Као последица, C-крај који је директно повезан са S6 сегментом може да се помери ка спољној страни (сл. 21 стрелица 6) (Kobrinisky i sar., 2006; Wray, 2009).



**Слика 21** Конформационе промене у  $K_V$  каналу након активације. А:  $K_V$  субјединица у затвореном стању. S1–S6 трансмембрански хеликси и P омча су приказани као цилиндри. S3 хеликс је подељен на S3a и S3b. Символ „+“ означава позитивне аминокиселине S4 сегмента. Стрелице (1–6) показују правац кретања након активације. В: кристална структура мембранског домена  $K_V1.2/2.1$  мономера у отвореном стању, стрелица означава ток јона кроз пору.

Међу  $K_V$  каналима  $K_V1-4$  су блиске подфамилије. Сви  $K_V1-4$  канали су тетрамери и имају 3 дефинисана домена у оквиру  $\alpha$  субјединице: VSD (волтажно сензитиван домен), PD (домен поре) и T1 (тетрамеризациони домен), интрацелуларни домен постављен пре првог трансмембранског сегмента, који је карактеристичан само за ове 4 подфамилије у односу на остале. Постоје, међутим, бројне разлике између ове четири групе. Тако на пример,  $K_V1-3$  имају бројне различите електрофизиолошке карактеристике и посредују брзе и споре инактивишуће излазне  $K^+$  струје (А-тип и унутрашњи исправљач редом) и уочена је експресија ових канала, осим у срцу и нервном ткиву, у плућима, епителијалним ћелијама алвеола, али и у глатким мишићима васкуларног, генитоуринарног и гастронестиналног система, као и у глатком мишићу утеруса. Насупрот томе,  $K_V4$  посредује конзервирани карактеристике и посредује само А-тип калијумове струје (Smith i sar., 2007; Covarrubias i sar., 2008; Pan i sar., 2008; Bradding & Wulff, 2009; Bocksteins i sar., 2009; Constantinople i sar., 2009; Miguel-Velado i sar., 2005, 2010).  $K_V4$  специфични блокатори су хетероподаксин, фриксотоксин.  $K_V7$  канали су присутни у мозгу, срцу, тироидној жлезди, панкреасу, унутрашњем уху, мишићима, стомаку и цревима. Они стварају функционално важне струје, чија редукција води LQT синдрому, дијабетесу, неонаталној епилепсији, неуромијотонији или глувоћи (Maljević i sar., 2010). Најновија истраживања говоре о присуству  $K_V7$  канала и у утерусу (McCallum i sar., 2009), а  $K_V10$  (eag) - eag канали су нормално присутни само у мозгу (Ludwig i sar., 2000). С обзиром на то, њихово присуство ван мозга може указати на постојање тумора (Bauer & Schwarz, 2001).

Као што је напоменуто, може се закључити да је најважнија функција  $K_V$  канала да остваре и одрже негативни мембрански потенцијал и тако створе равнотежу деполаришућем деловању  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  јона. Као одговор на деполаризацију, волтажно зависни  $K^+$  канали се активирају, односно канал постаје отворен. Након активације, већина волтажно зависних  $K^+$  канала може прећи у стабилно непроводно стање, односно инактивацију (Rasmusson i sar., 1998). Постоје три утврђена механизма којим се волтажно зависни  $K^+$  канали могу затворити: два подразумевају конформационо затварање проводне путање, а једно условно затварање поре аутоинхибиторним делом протеина канала.

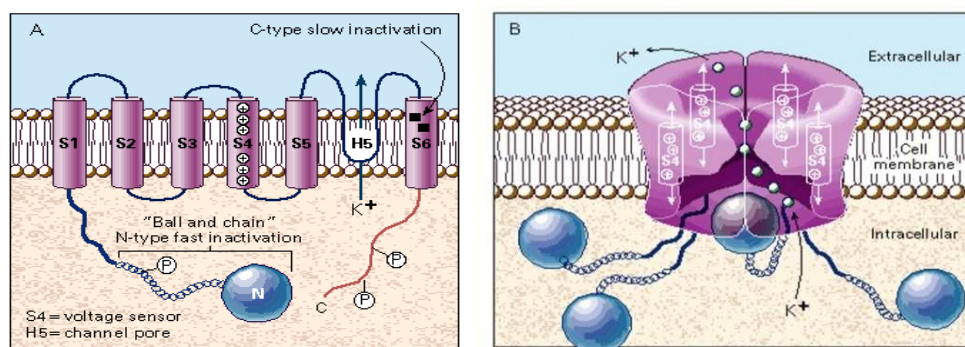
### **Касно исправљачки $K_V$ канали**

Касно исправљачки  $K_V$  канали детектовани су у глатким мишићима зида коронарне и пулмонарне артерије и вене порте куниха (Volk i sar., 1991; Okabe i sar., 1987; Beech i Bolton,



1989а) и у глатким мишићима трахеје пса (Muraki i sar., 1990). Ови канали се брзо отварају после деполаризације и играју битну улогу у њеној реверзији. Каџић и Gojković-Bukarica (1998) наводе да се ова струја састоји од две компоненте:  $I_{K_S}$  - струја која се споро активира и појачава стимулацијом симпатикуса и  $I_{K_R}$  - која се активира брзо и не мења се стимулацијом симпатикуса.

**Пролазно исправљачки ( $K_A$ ) канали** – активирају се после деполаризације, али се брзо инактивирају на почетку хиперполаризације. Пошто се брзо инактивирају после деполаризације, изгледа да немају значајну улогу у реверзији акционог потенцијала. Претпоставља се да они снижавају праг за настанак деполаризације и тако успоравају фреквенцију акционих потенцијала. Нађени су у глатким мишићима пулмонарне артерије (Okabe i sar., 1987, 1997; Hara i sar., 1980; Bolton, 1989).



Слика 22 Шематски приказ инактивације волтажно зависног  $K^+$  канала –  $K_v$

За  $K_v$  канале (сл. 22) карактеристична су три типа инактивације: S, N и C-тип (Liu i sar., 1996; Monsuez, 1997). **S-тип инактивације** представља заклапање интрацелуларног улаза (капије S6) и спречавање улаза са цитоплазматичне површине у водом испуњену шупљину у средини канала. Услед присуства S6 капије, блокатори  $K^+$  канала (везивањем за места у шупљини) могу ући само кад се канал отвори и неки блокатори могу бити заробљени у шупљини кад се S6 капија затвори. N-тип инактивације, који се описује као лопта-и-ланац модел, је брза инактивација, а дешава се када се мала група аминокиселина на  $NH_2$  крају веже за активирани канал и затвори интрацелуларни улаз канала. N-тип инактивације углавном следи након активације и укључује цитоплазматичну капију на аминокрају субјединице канала. Интрацелуларно везивање лекова мења брзину настанка N-типа инактивације, уз неосетљивост на екстрацелуларни ТЕА. S-тип инактивације је независан од елиминације N-краја (спора инактивација), спољни улаз канала се запуши током дуготрајне деполаризације, уз



конформационе промене четири субјединице које граде канал, чиме се затвара екстрацелуларни улаз канала. Брзина С-типа инактивације је волтажно-независна, док је опоравак волтажно-зависан. Карактеристике С-типа активације су успоравање механизма при порасту екстрацелуларног  $K^+$  и конкуренција са екстрацелуларним  $TEA^+$  у каналима који имају екстрацелуларно место везивања  $TEA^+$ .

## 1Б. КАЛЦИЈУМ-ЗАВИСНИ КАЛИЈУМСКИ КАНАЛИ

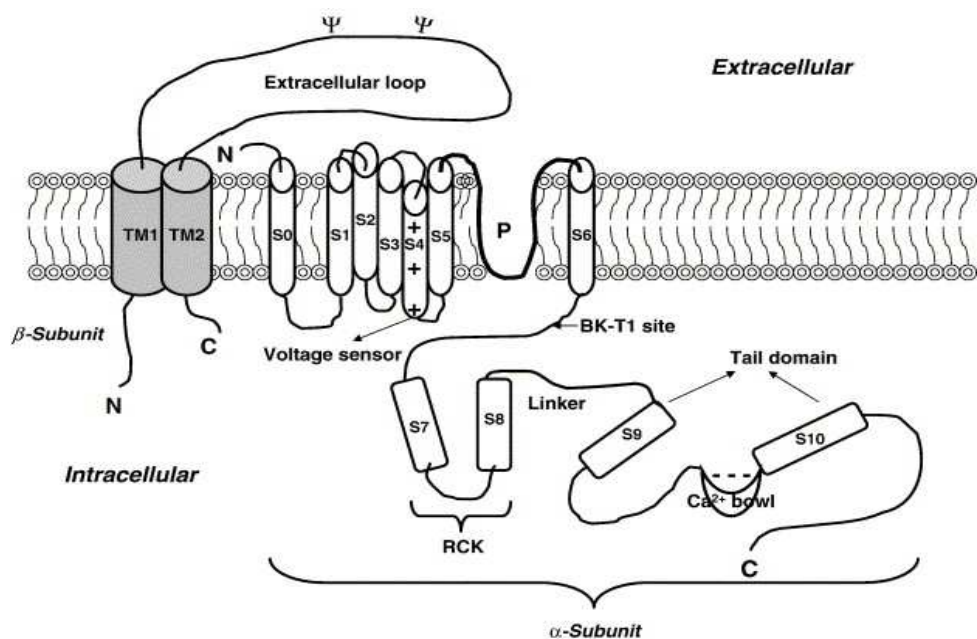
Улазак калцијума ( $Ca^{2+}$ ) у ћелију изазива каскаду догађаја, као што је ослобађање калцијума из интрацелуларних депоа, активација секундарних гласника, отварање јонских канала. Један од тих догађаја је и отварање калијумових ( $K^+$ ) канала, услед пораста интрацелуларног калцијума (Ghatta i sar., 2006).

Један од боље проучених типова ове класе канала у глатком мишићу, посебно у миомеријуму, је  $Ca^{2+}$  зависни калијумски канал ( $K_{Ca}$ ). За овај тип волтажно - зависних калијумских канала карактеристично је да је осим волтажне зависности, тј. деполаризације, за њихово отварање неопходна и повећана концентрација  $Ca^{2+}$  јона у цитоплазми. Инфлукс калцијума ( $Ca^{2+}$ ) у ћелију и пораст интрацелуларног калцијума изазива каскадну реакцију дешавања, као што је ослобађање калцијума из интрацелуларних депоа, активација секундарних гласника, отварање јонских канала, укључујући и отварање калијумових канала типа **Калцијум ( $Ca^{2+}$ )- зависних калијумових ( $K^+$ ) канала** (Shieh i sar., 2000; Ghatta i sar., 2006).

Постоје три групе  $Ca^{2+}$ - зависних калијумових канала, груписаних према њиховој проводљивости: **добро-проводни**, 100–300pS, ( **$BK_{Ca}$** ), **интермедијарно-проводни**, 25–100pS, ( **$IK_{Ca}$** ) и слабо-проводни, 2–25pS, ( **$SK_{Ca}$** ), калцијум-зависни калијумови канали (Blatz & Magleby, 1986; Logsdon i sar., 1997; Zografos i sar., 1992).

### *а) Добро-проводни калцијум-зависни калијумови канали ( $BK_{Ca}$ )*

**Добро-проводни калцијум-зависни калијумови канали ( $BK_{Ca}$ )** су познати и као велико-проводни ВК. SLO и MaNiK канали су прво нађени у глатким мишићним ћелијама (кључна улога у контрактилности), а касније у мозгу, панкреасу, али и у глатким мишићима зида бешике, трахеје, гастроинтестиналног тракта и крвних судова.  $BK_{Ca}$  канали, које активира/отвара повећање цитосолног  $Ca^{2+}$  и деполаризација ћелијске мембране, могу се отворити и у одсуству калцијума (Ghatta i sar., 2006; Pallotta, 1985; Carl i Sanders, 1989; Kume i sar., 1989).



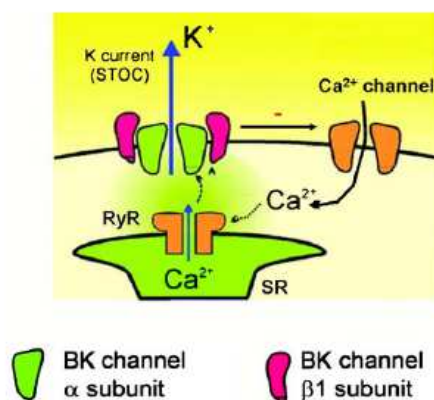
Слика 23 Добро-проводни калцијум зависни калијумов канал (BK): структура  $\alpha$  и  $\beta$  субјединице.

BK<sub>Ca</sub> канали су (сл. 23) изграђени из  $\alpha$ -субјединице, која гради пору и регулаторне  $\beta$ -субјединице. Сви канали су тетрамери, изграђени из 4  $\alpha$  субјединице, саме или удружене са  $\beta$  субјединицама (Knaus i sar., 1994; McManus i sar., 1995; Toro i sar., 1998). Функционалан канал се формира групацијом и тетрамеризацијом одговарајућих мономера помоћу асоцијационих домена (AD). Овај домен код BK канала се назива BK-T1 и налази се близу поре, између S6 сегмента и C-терминалног модулаторног домена (Quirk & Reinhart, 2001), (сл. 23). Настале варијанте (изоформе mK44, STREX, SV1) се разликују у волтажној и калцијумској осетљивости, хормонској осетљивости, фосфорилацији и транспортовању (Brainard i sar., 2007).

Молекуларно испитивање BK<sub>Ca</sub> канала показало је да је базична структура каналског протеина хомологна са протеинима S1-S6 трансмембранских сегмената (Atkinson i sar., 1991; Adelman i sar., 1992). Smatra se da је BK<sub>Ca</sub> - волтажно - зависни канал коме је додат део са четири нове субјединице S7-S10 (Butler i sar., 1993; Tseng-Crank i sar., 1994). Wei i saradnici (1994) су описали канал као структуру чији средишњи регион захвата домене од S1 до S8, репни регион S9 и S10, а повезани су „лако чуваним линкером“ смештеним између S8 и S9. Неки модели BK<sub>Ca</sub> структуре укључују и нови екстрацелуларни трансмембрански домен S0 (Wallner i sar., 1996; Meera i sar., 1997), смештен на аминокрају, за који се мисли да игра важну улогу у регулацији  $\beta$  субјединица. Претпоставља се да су волтажна зависност, отвореност канала и проводљивост, функција региона S1-S6 (Wei i sar., 1994; Tseng-Crank i sar., 1994; Muraki i sar., 1990), док се  $Ca^{2+}$  осетљивост приписује  $\beta$  субјединицама.

BK отварачи, повећањем ефлуksа калијума и хиперполаризацијом, стабилизују ћелију, што као крајњи ефект има релаксацију глатког мишића. Излаз  $K^+$  услед активације BK канала,

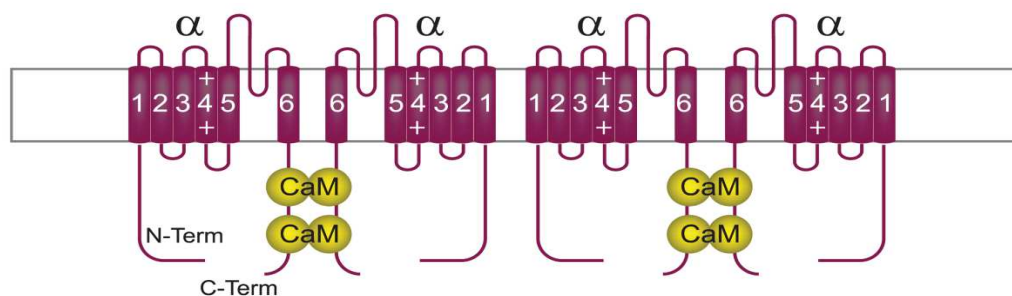
може антагонизовати деполаризацију, односно вазоконстрикцију васкуларног глатког мишића (Tanaka i sar., 2004), због чега су активатори ових канала потенцијални лекови код хипертензије, ангине пекторис, уринарне инкотиненције, или у бројним неуролошким обољењима. С обзиром да их има мало у срцу у поређењу са  $K_{ATP}$  каналима и израженим ослобађањем  $K^+$ , као и касним отварањем канала, њиховом употребом могу се избећи нежељени кардијални ефекти, као што су хипотензија и тахикардија, који редовно прате отварање  $K_{ATP}$  канала. Као отварачи ВК канала који још нису регистровани као лекови (због мале селективности) испитују се: деривати бензимидазолна (NS004 и NS1619), биарил амини (мефенамична и флуфенамична киселина), биарилуреа (NS1609), пиридил амини, дихидрозоиасапонин и флавоноиди. Међутим, изнети су подаци да ендогени NO и NO донори могу да релаксирају крвне судове активацијом ВК канала (Ко i sar., 2008). Од ВК<sub>Ca</sub> блокатора користе се Ибериотоксин(ИbTx), лимбатоксин(LbTx), карибдотоксин (ChTx) и кватернерна амонијумска једињења - тетраетиламонијум (ТЕА) и тетрабутиламонијум (ТВА) (Li & Aldrich, 2004). ИbTx и LbTx су значајно селективни за ВК канале, док остали делују само затварајући екстрацелуларну пору. Кватернерна амонијумска једињења, иако нису селективна за ВК канале, супримирају канал, смештајући се у његовој унутрашњој пори, као и убрзавањем деактивације током реполаризације. Откривено је да неки лекови, као верапамил, кетамин, клотримазол, пенитрем А, паспалинин, али и фунгални токсини (паксиллин), могу да делују као ВК блокатори. VmP909 је први селективни блокатор  $\alpha$  субјединице ВК канала сисара (Ко i sar., 2008). Код васкуларних глатких мишића ВК канали се отварају при локалном порасту интрацелуларног калцијума из саркоплазматског ретикулума, преко рианодинских рецептора (RYR) који се налазе близу ВК канала, чиме се ослобађа калијум, стварајући спонтане пролазне излазне струје (STOC) које мењају потенцијал мембране у више негативан, уз затварање волтажно зависних калцијумских канала и релаксацију (сл. 24) (Jaggar i sar., 2000; Ghatta i sar., 2006).



Слика 24 Локално ослобађање  $Ca^{2+}$  ствара STOC преко ВК канала, што подстиче релаксацију глатког мишића.

**б) Слабо-проводни калцијум-зависни калијумови канали SK<sub>Ca</sub>**

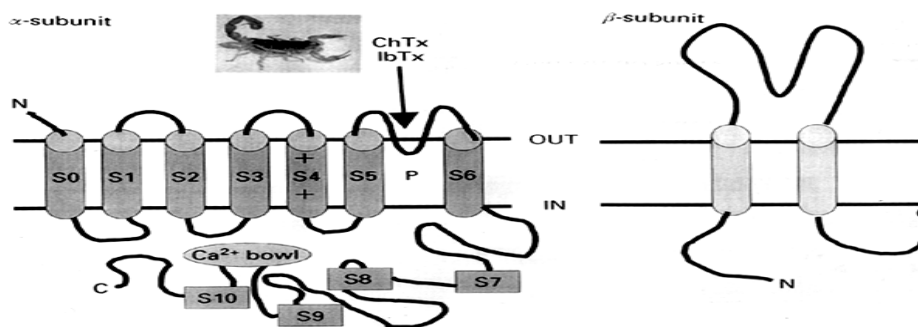
Слабо-проводни калцијум-зависни калијумови канали (SK<sub>Ca</sub>), који имају важну улогу у регулисању фреквенције акционог потенцијала, активирају се само порастом концентрације интрацелуларног Ca<sup>2+</sup> (али нису волтажно-зависни) и у тренутку када је мембрански потенцијал скоро једнак потенцијалу мировања (McManus, 1991) стварају хиперполаришућу струју у ексцитабилним ћелијама (након акционог потенцијала), која на крају води релаксацији глатког мишића. Разноврност SK канала је последица кодирања бројним генима и коришћења различитих старт кодона у оквиру сваког гена. IK<sub>Ca</sub> подтип је пронађен у глатким мишићима зида артериола панкреаса пацова (Stuenkel, 1989) и јејунума кунића (Bolton i sar., 1986). У односу на BK<sub>Ca</sub>, SK<sub>Ca</sub> и IK<sub>Ca</sub> су врло мало истраживани у мишићном ткиву утеруса (Khan i sar., 2001; Brainard i sar., 2007).



**Слика 25** Слабо-проводни калцијум-зависни калијумов канал (SK)

SK канали су, као и други калијумски канали, саграђени из четири хомолога домена, а сваки од њих из шест трансмембранских сегмената и P омче између 5. и 6. сегмента (сл. 25). Четири субјединице канала граде парове, од којих сваки везује два молекула калмодулина. SK канали не везују калцијум директно, већ га препознају помоћу калмодулина. Током деполаризације, волтажно-зависни калцијумови канали и NMDAR посредују улазак калцијума, који се везује за CaM. Када се калцијум веже за калмодулин, долази до конформационе промене и отварања канала. Калмодулин-везујући домен (CaMBD) се налази поред S6. Он је мономер, али у присуству калцијума гради димер. Поред отварања канала, CaM има улогу и у преносу SK канала до плазма мембране. SK канали граде функционалне јединице са бројним Ca<sup>2+</sup>-каналима, укључујући L-тип канале и NMDAR. SK канали се могу активирати и уласком Ca<sup>2+</sup> кроз P-, N- и T-тип Ca<sup>2+</sup> канала. Глибенкламид, Ba<sup>2+</sup> или апамин блокирају SK канале. Блокирање апамином (100pM–10nM) их разликује од осталих K<sub>Ca</sub> канала. IK<sub>Ca</sub>1 се блокира ChTx и клотримазолом, али не IbTx, апамином или кетокконазолом (Xia i sar., 1998; Schumacher i sar., 2001; Nelson & Quayle, 1995; Yellen, 2002; Ko i sar., 2008)

## 2. УЛАЗНО ИСПРАВЉАЧКИ КАЛИЈУМСКИ ( $K^+$ ) КАНАЛИ- $K_{ir}$



Слика 26 Шематски приказ изгледа улазно – исправљачког калијумског канала ( $K_{ir}$ )

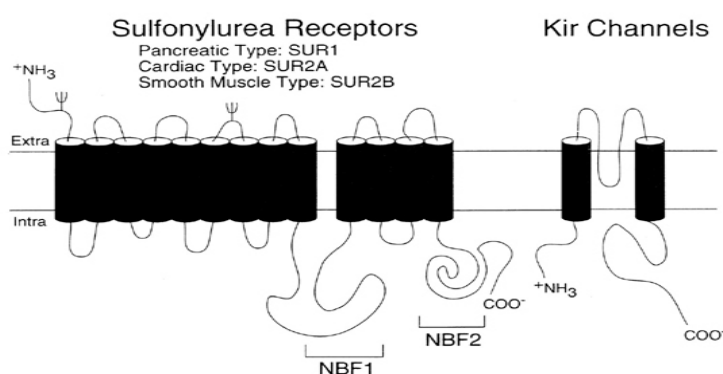
Улазни исправљачки калијумови канали („Inward rectifying channels -  $K_{ir}$ “) су добили назив по томе што усмеравају  $K^+$  струју у правцу унутрашњости ћелије, што омогућује инфлукс, али не и ефлукс калијума у ћелију. Ови канали се не активирају деполаризацијом ћелијске мембране као  $K_v$ , већ у току максималне хиперполаризације, омогућавањем повратка  $K^+$  јона у ћелију, играјући тиме значајну улогу у постизању потенцијала мировања. Ово тзв. улазно исправљање приписује се „gating“ механизму, који уз помоћ интрацелуларног  $Mg^{2+}$  и везивања ендогених полиамина са високим афинитетом за канал (запуше пору) онемогућавају пролаз јонима  $K^+$  из цитоплазме у канал поре. Они стога немају волтажни S4 сегмент. Током једнаког, али супротног електрохемијског потенцијала, пропушта се више струје ка унутрашњости ћелије. У ћелијама са потенцијалом мировања  $-60mV$ , ови канали ће бити неактивни кад је мембрански потенцијал већи од  $-40mV$  (Lu i MacKinnon, 1994; Wible i sar., 1994; Dai i sar., 2009).

$K_{ir}$  канали су обично изграђени од хомотетрамernih јединица (немају волтажни S4 сегмент), осим  $K_{ir}$   $\alpha$  субјединице, која има само два трансмембранска сегмента и P омчу (сл. 26). Постојање  $\beta$  субјединица није утврђено. Ова фамилија садржи 15 чланова, подељених у 7 субфамилија ( $K_{ir1}$ - $K_{ir7}$ ).  **$K_{ir6}$  субфамилија је позната и као АТР-зависни  $K^+$  канали ( $K_{ATP}$ ).** На  $K_{ir}$  канале који су значајни за пејсмејкерску активност срца и ослобађање инсулина утичу АТР,  $PIP_2$ ,  $\beta\gamma$  субјединица G-протеина (Clement i sar., 1997; Inagaki i sar., 1997). Канали који припадају овој класи су комплексни и поред четири унутрашња исправљача који доприносе провођењу јона кроз пору, имају и четири регулаторне јединице - сулфонилуреа рецепторе, SUR. Током једнаког, али супротног електрохемијског потенцијала,  $K_{ir}$  пропуштају више струје ка унутрашњости ћелије и неактивни су кад је мембрански потенцијал већи од  $-40mV$  (Dai i sar., 2009).

$K_{ir}$  канали, чија улога зависи од локализације, налазе се у макрофагима, ћелијама срца и бубрега, леукоцитима, нервним и ендотелним ћелијама. Тако на пример, у миоцитима се

затварају током деполаризације и не помажу реполаризацију, већ утичу на пролонгирање акционог потенцијала. С друге стране, у ендотелу,  $K_{ir}$  канали су укључени у регулацију активности eNOS, а у бубрезима избацују вишак  $K^+$  у тубуле (Kubo i sar., 2005). Активација  $K_{ir}$  канала у глатким мишићима крвних судова малог дијаметра, с једне стране, вероватно доприноси њиховом мировању, а с друге стране, при увећању концентрације екстрацелуларног  $K^+$  (до 10–15 mM) доводи до вазодилатације (Ko i sar., 2008).  $Ba^{2+}$  и Cs такође инхибирају  $K_{ir}$  струје, а  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  делимично (Quayle i sar., 1993; Robertson i sar., 1996a; Quayle i sar., 1997). Monsuez (1997) у класу  $K_{ir}$  канала убраја и  $K^+$  канале који се активирају посредством G протеина ( $K_{irACh}$ ).  $K_{ACh}$  канали у срцу су изграђени из  $K_{ir3.1}$  и  $3.4$ . Парасимпатичко ослобађање ACh води активацији мускаринских  $M_2$  рецептора  $G_i$  и коначно, преко  $G\beta\gamma$  ослобођеног са  $G_i$ , активацији  $K_{ACh}$ . Активација ових канала смањује екситабилност срца и тиме његов ритам рада (Dai i sar., 2009). Слична  $I_{KACh}$  струја и GIRK протеин нађени су и у мозгу, али не у ткиву миоетријума (Ackerman i Clapham, 1997; Shen i Kurachi, 1995; Pelleg i Belardinelli, 1993).

### За. Калијумски канали који се активирају посредством АТФ ( $K_{ATP}$ )



Слика 27 Шематски приказ изгледа АТФ- зависног калијумског канала

Калијумски канали (први пут описани код кардиомиоцита) који се активирају посредством АТФ (због чега су названи АТФ- зависни  $K^+$  канали,  $K_{ATP}$ ) су затворени у присуству

физиолошких концентрација АТР-а у ћелији, а отварају се када се смањи концентрација интрацелуларног АТР-а (Noma, 1983). Они су од пресудне важности у одржавању равнотеже ћелијског метаболизма са ексциtabilношћу, као што је то код  $\beta$  ћелија панкреаса, где се повезује ниво глукозе у плазми са лучењем инсулина (сл. 27). Постоји више подтипова (од 1 до 5)  $K_{ATP}$  канала, који су  $Ca^{2+}$  и волтажно независни, а и њихова улога у ткиву глатких мишића је мање јасна (Ashcroft i Ashcroft, 1990). Подтип 1  $K_{ATP}$  је присутан код различитих глатких мишића зида мезентеричне артерије кунџа (Standen i sar., 1989), аорте пса (Kovasc i Nelson, 1991), церебралне артерије мачке (Bonnet i sar., 1991), вене порте кунџа и пацова (Кажока i sar., 1991; Noack i sar., 1992),  $\beta$  ћелијама ендокриног панкреаса (Cook i Hales, 1984) и др.  $K_{ATP}$  канал се састоји од две јединице: унутрашњег исправљача и сулфониуреа рецептора, који је клониран 1995. године (Aguilar-Bryan i sar., 1995). Изгледа да  $K_{ATP}$  канале у срцу, панкреасу, скелетним мишићима кодира Kir 6.2 ген и SUR1, SUR2A или SUR2B ген, а да су  $K_{ATP}$  канали глатких мишића производ Kir 6.1 гена (Aguilar-Bryan i sar., 1998). Конкретно, за  $K_{ATP}$  канале изражене у ткиву утеруса је потврђено, детекцијом mRNA, да су комплекс производа Kir 6.1 и SUR2B гена (Chien i sar., 1999).

Орални антидијабетици, као што је глибенкламид, везујући се за сулфониуреа рецептор (Сл. 28), доводе до блокирања/инактивације  $K_{ATP}$  канала (Jahangir i Terzić, 2005) и стимулисања лучења инсулина, због чега смо ми, али и други аутори, глибенкламид користили у нашим истраживањима да блокирамо релаксантно деловање отварача калијумских канала – пинацидила на различите типове активације изолованог утеруса пацова (Novaković i sar., 2007; Morrison, 1993; Cheuk, 1993 и Khan i sar., 1993, 1998, 2000, 2001). Толбутамид нема утицаја на релаксацију миоетријума постигнуту отварачима калијумских канала (Morrison i sar., 1993). Глибенкламид је такође стандардна супстанца за испитивање ефекта блокирања  $K_{ATP}$  канала у глатким мишићима артерија ( $LC_{50}$ : 20 - 200nM). Толбутамид се такође користи, али је мање ефикасан ( $LC_{50}$ : 350 $\mu$ M) (Beech i sar., 1993; Nelson & Quayle, 1995; Quayle i sar., 1995). Електрофизиолошки докази о присуству  $K_{ATP}$  канала у мишићном ткиву утеруса су врло оскудни. Namada sa saradnicima је објавио 1994. године налазе о глибенкламид - осетљивом калијумском каналу у глаткој мускулатури гравидног хуманог утеруса. Насупрот, Khan i saradnici (1998) наводе да употребом „patch-clamp“ технике нису издвојили појединачне канале који су били осетљиви на глибенкламид или дирекну апликацију АТР-а код ћелија миоетријума гравидног хуманог утеруса. Изгледа да је тешко ускладити глибенкламид - осетљиву релаксацију индуковану отварачима калијумских канала, као и налазе mRNA за гене који кодирају саставне делове канала - Kir 6.1 и SUR2B, са недостатком електрофизиолошких доказа о присуству ових канала у миоетријуму.

АТР-зависни  $K^+$  канали ( $K_{ATP}$ ) су  $K_{ir6}$  канали. Постоје две изоформе  $K_{ir6}$  канала,  $K_{ir6.1}$  и  $K_{ir6.2}$ . Они су регулисани АТР : АДФ односом, при чему АТР делује инхибиторно, а АДФ стимулаторно.  $K_{ATP}$  су октамери, изграђени из четири  $\alpha$ -субјединице  $K_{ir6.1}$  и  $K_{ir6.2}$  канала, које формирају пору канала и четири регулаторне  $\beta$ -субјединице (сулфонилуреа рецептори SUR), који припадају протеинској фамилији АТР-везујућих касета (ABC) (сл. 28, 29).  $K_{ir}$  протеин је изграђен из два трансмембранска сегмента, спољњи М1 и унутрашњи М2, Р омче и N- и С- краја, смештених интрацелуларно. SUR протеин је изграђен из два ABC сегмента (која се такође зову нуклеотид-везујуће скупине, NBF1 и NBF2) и два трансмембранска сегмента (TM1 и TM2). SUR имају и додатни пети трансмембрански сегмент, TM0, који је повезан са TM1 преко линкера L0. Активациони ефект АДФ (у форми  $Mg^{2+}$ -везујућег АДФ, MgADP) на  $K_{ATP}$  канале је последица везивања MgADP за ABC сегменте, чиме настају конформационе промене SUR које воде отварању канала (Teramoto, 2006; Shyng & Nichols, 1997), (сл. 28)

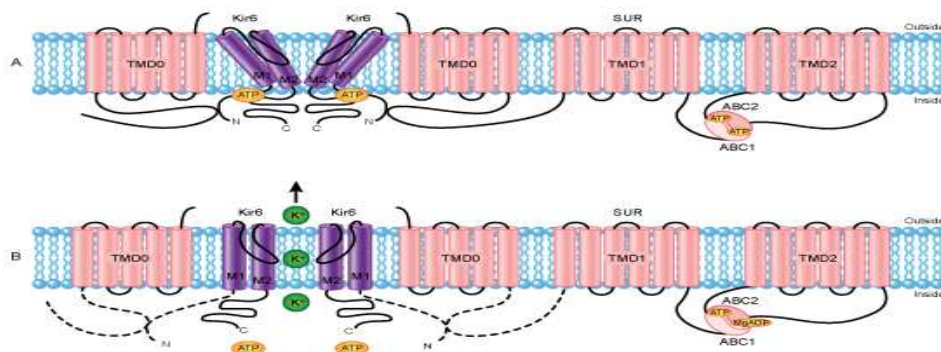
$K_{ATP}$  канали се могу поделити, на основу локализације унутар ћелије, на сарколемалне („sarc $K_{ATP}$ “), митохондријалне („mito $K_{ATP}$ “) или нуклеарне („nuc $K_{ATP}$ “). Разноврсност  $K_{ATP}$  канала између врста и ткива је увећана присуством бројних изоформи SUR (SUR1, SUR2A и SUR2B). Различитим комбиновањем  $K_{ir}$  и SUR субјединица добија се ткивно-специфични  $K_{ATP}$  канал.  $K_{ATP}$  канали васкуларних глатких мишића обухватају две групе, на основу проводљивости: мало/средње-проводни и велико-проводни (Quayle i sar., 1997).

$K_{ATP}$  учествују у ослобађању инсулина, пролактина и хормона раста. У срцу, ови канали су обично затворени, али се отварају кад је снижен ниво АТР-а, нпр. током исхемије и хипоксије, што доводи до значајног скраћења акционог потенцијала. Као последица, смањује се сила контракције и трошење енергије. У панкреасу,  $K_{ATP}$  канали у  $\beta$ -ћелијама су обично отворени, али кад ниво АТР-а значајно порасте (као одговор на висок ниво глукозе или аминокиселина) они се затварају. То доводи до деполаризације мембране, отварања  $Ca^{2+}$ -канала, а тиме и ослобађања инсулина (Suzuki i sar., 2002; Miki i sar., 1998). Поремећаји у овом путу доводе до дијабетеса типа 2 или хиперинсулинемије. У мозгу, хипогликемија или локална хипоксија доводе до отварања неуронских  $K_{ATP}$  канала. При оксидативном стресу забележена је такође појачана активност  $K_{ATP}$  канала. Активација  $K_{ATP}$  канала је присутна у бројним патофизиолошким одговорима, укључујући системску артеријалну дилатацију током хипоксије, реактивну хиперимију у коронарној и церебралној циркулацији и вазодилатацију изазвану ацидозом и ендотоксичним шоком (Kinoshita & Katusic, 1997; Brayden, 2002; Goldstein i sar., 2001, 2005).

$K_{ATP}$  канали врше регулацију тонуса глатких мишића, утичући на концентрацију калцијума унутар мишићне ћелије. Отварањем  $K^+$  канала настаје хиперполаризација мембране



услед излаза калијума, због чега се затварају волтажно-зависни  $\text{Ca}^{2+}$  канали, смањује улаз  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелију и настаје релаксација.  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канале у глатким мишићима, као што смо напоменули, могу да блокирају лекови из групе оралних антидијабетика типа сулфонилурее. 5-хидроксидеканоат и U-37883A су селективни блокатори/инхибитори неваскуларних  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала, са  $\text{LC}_{50}$  концентрацијама од 0.26  $\mu\text{M}$  односно 0.16  $\mu\text{M}$ .  $\text{Ba}^{2+}$  такође испољава особине инхибитора  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала у глатким мишићима, са  $\text{LC}_{50}$  од 100  $\mu\text{M}$ . С друге стране,  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канали се у глатким и скелетним мишићима не блокирају ибериотоксином и мање су осетљиви на ТЕА ( $\text{LC}_{50}$ , 7mM). Блокада  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала са ангиотензином, ендотелином, вазопресином, норадреналином, хистамином, серотонином и неуропептидом Y изазива мембранску деполаризацију и вазоконстрикцију различитих васкуларних глатких мишића преко активације РКС (примарно  $\text{Ca}^{2+}$ -независне РКС $\epsilon$ ), што може довести до поремећаја коронарне и церебралне ауторегулације (Nelson & Quayle, 1995; Narishige i sar., 1993; Hong i sar., 1994; Quayle i sar., 1995, 1997; Teramoto, 2006).



**Слика 28** Структура  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала и конформационе промене у затвореном (A) и отвореном стању (B). A: Интеракција  $\text{Kir6}$  и  $\text{SUR}$  протеина када је канал затворен.  $\text{ATP}$  инхибира  $\text{Kir6}$  везујући се за аминокиселине N- и C-краја. Везивањем  $\text{ATP}$  се спајају два  $\text{ABC}$  сегмента у димер. B: Хидролиза  $\text{ATP}$  и последично везивање  $\text{MgADP}$  за  $\text{ABC}$  изазива конформациону промену  $\text{SUR}$  и отварање канала.

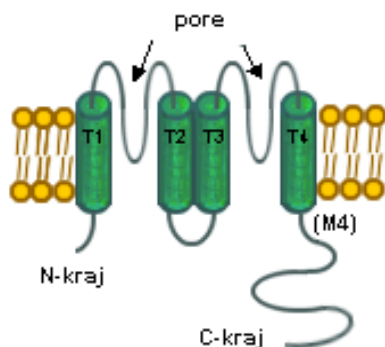
### 36. $\text{K}^+$ КАНАЛИ СА ЧЕТИРИ ТРАНСМЕМБРАНСКА ДОМЕНА И ДВЕ ПОРЕ (Двопорни калијумски канали)

Двопорни калијумови канали ( $\text{K}_{2\text{P}}$ ), који се разликују од свих осталих  $\text{K}^+$  канала по томе што имају уместо једне две поре, нису нађени у глатким мишићима утеруса (Ketchum i sar., 1995; Lesage i sar., 1996a).  $\text{K}_{2\text{P}}$  канали су димери субјединица изграђених од кратког интрацелуларног N-краја, четири трансмембранска сегмента (ТМ) и регулаторног C-краја. Веза између ТМ1 и ТМ2 гради прву пору и између ТМ3 и ТМ4 другу пору, док је веза између ТМ2 и ТМ3 обично кратка (сл. 29). Како би настао функционалан димер,  $\text{K}_{2\text{P}}$  субјединице интерагују преко ТМ1-ТМ2 везе и стварају дисулфидне везе (Besana i sar., 2005).  $\text{K}_{2\text{P}}$  фамилија има 15 чланова, груписаних у 6 подфамилија (Goldstein i sar., 2005)

Активност  $\text{K}_{2\text{P}}$  канала (сл. 29) доприноси значајно позадинским ( $\text{K}_{2\text{P}}$  познати као „leak“ канали) струјама  $\text{K}^+$ , које граде потенцијал мировања. Позадинске струје чине две компоненте:

једна са јаким исправљач својствима (настала од чланова  $K_{ir}$  канала) и друга која представља прави позадински проток  $K^+$ . Ове  $K^+$  струје одликује одсуство волтажне зависности, неинактивација, временска стабилност и проток (Goldstein i sar., 2001; Sabbadini & Yost, 2009).

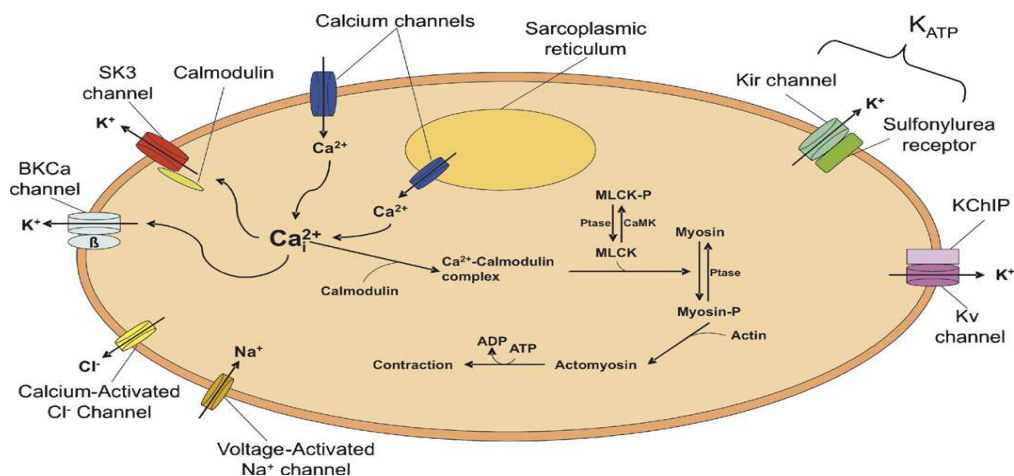
$K_{2P}$  канали се од неких који личе на њих по позадинским струјама разликују по неосетљивости на класичне блокаторе  $K^+$  канала (TEA и 4-AP), уз постојање релативно мале временске и волтажне зависности активације.  $K_{2P}$  канали, који такође доприносе регулацији акционог потенцијала у екситабилним ћелијама, имају улогу у настанку седације при анестезији, одржавању нормалног срчаног ритма и учењу. Активност  $K_{2P}$  такође подлеже утицају рН, температуре, истезања мембране, неуротрансмитера који делују преко G рецепторних протеина (GPCR), испарљивих анестетика, стимулатора респирације и масних киселина и њихових метаболита (Gruss i sar., 2004; Besana i sar., 2004; Sabbadini & Yost, 2009).



**Слика 29** Субјединица  $K_{2P}$  канала: трансмембрански сегменти (T1-T4); N- и C- крај (интрацелуларни); екстрацелуларне везе TМ1-TМ2 и TМ3-TМ4 граде поре; M4 регион присутан код TREK-1 канала.

### ***Карактеристике калијумских канала у утерусу***

У оквиру ове докторске тезе већ смо навели да експресија калијумских канала зависи од гестационог статуса јединке, хормона и од врсте, као и да ефлукс калијума из миометријалних ћелија представља примарну јонску струју одговорну за одржање потенцијала мировања и базалног тонуса утеруса (Brainard i sar., 2007). Универзалност постојања калијумских канала у свим мишићима, укључујући и глатке мишиће у органима и ткивима (горе у тексту детаљно обрађено), ипак не искључује потребу да се због њихове важности у контроли миометријалне активности, како негравидног, тако и гравидног утеруса животиња и човека, обраде у посебном поглављу ове тезе (сл. 30).



**Слика 30** Јонски канали глатке мишићне ћелије миометријума укључени у регулацију мембранског потенцијала и екситабилност ћелије. Протеин фосфатаза (*Ptase*), миозин киназа лаког ланца (*MLCK*), фосфорилисана миозин киназа лаког ланца (*MLCK-P*), калцијум калмодулин-зависна протеин киназа (*CaMK*), интерагујући протеин  $K_V$  канала (*KCHIP*).

### $K_V$

Иако је структура  $K_V$  канала доста изучавана, још нема довољно података о улози ових канала у ткиву утеруса. До сада су описане три  $K^+$  струје у миометријалним ћелијама хуманог негравидног утеруса: први тип је брзо активирајућа  $K^+$  струја са устаљеном активацијом (активира се позитивнијим потенцијалом од  $-70mV$ ); други тип излазне струје се активира потенцијалом позитивнијим од  $-40mV$  (спор наступ активације) и трећи тип  $K^+$  струје са краткотрајном активацијом и инактивацијом (Erulkar i sar., 1993; Khan i sar., 2001).

### $BK_{Ca}$

Овај подтип је добро проучен и подједнако је заступљен, како у глаткој мускулатури негравидног утеруса (Erulkar i sar., 1993; Perez i sar., 1993; Tritthart i sar., 1991), тако и у гравидном утерусу и има истакнуту улогу у одржању неконтрактилног стања мировања током гравидитета (Anwer i sar., 1993; Khan i sar., 1993).  $BK_{Ca}$  канали показују велику проводљивост од око  $200pS$  и изузетно су осетљиви на  $Ca^{2+}$ , чак и у наномоларним концентрацијама. Стање отворености  $BK_{Ca}$  канала расте са деполаризацијом која, као што је већ речено, доприноси повећању интрацелуларног  $Ca^{2+}$ , што опет доводи до даљег повећања каналске активности. Селективни блокатори ових канала су тетраетиламонијум, 4-аминопиридин, баријум, паксиллин, токсин шкорпија и др. Учешће  $BK_{Ca}$  канала у целокупном протоку  $K^+$  највише зависи од периода гестације (Brainard i sar., 2007).  $BK_{Ca}$  имају израженији релаксациони ефект средином у односу на касну фазу гравидитета, али њихова инхибиција нема утицаја на јачину контракција (Khan i sar., 2001; Mironneau i sar., 2002). Код негравидних пацова и мишева,  $BK_{Ca}$  канали чине око 35% укупне реполаризујуће струје калијума, док у касној гестацији долази до губитка  $BK_{Ca}$

струја и пораста улоге других канала у мировању утеруса.  $VK_{Ca}$  канали изазивају релаксацију утеруса активацијом аденилатне циклазе, која је присутна у средини гестације, али не у касној гестацији и порођају. У хуманом утерусу, експресија  $VK_{Ca}$  канала је увећана у касном гравидитету, а смањена током превременог или нормалног порођаја, што указује на значај ових канала у индукцији порођајних контракција. Азот-оксид такође јаче релаксира утерус пацова средином него пред крај гравидитета, посредством  $VK_{Ca}$  канала (Brainard i sar., 2007). Асоцијација  $VK_{Ca}$  канала са мембранским и интрацелуларним протеинима добија све већи значај као механизам регулације релаксације утеруса. Агонисти бета<sub>2</sub>-рецептора, који се углавном користе за спречавање превременог порођаја или побачаја, граде у миометријуму комплекс са  $VK_{Ca}$  каналима, услед чега се они отварају, уз настанак релаксације утеруса. Током релаксације глатких мишића и утеруса долази до ефлука јона калцијума из ћелије преко  $Ca^{2+}$ -зависне АТР-азе (PMCA, 70%) и  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  измењивача (Shmigol i sar., 1998, 1999). Важан утицај на сигнализацију ткива утеруса имају липидни рафтови, који модификовањем нивоа холестерола мењају флуидност мембране мишићних ћелија. Смањење заступљености холестерола повећава индуковану и спонтану ритмичку активност утеруса због тога што су уз рафтове смештени  $VK$  канали (њихов пораст релаксира утерус). Такође и утицај естрогена и окситоцина зависи од заступљености липидних рафтова и густине кавеола (Smith et al., 2005; Noble i sar., 2006).

### $K_{ATP}$

$K_{ir6}$  фамилија улазних исправљач калијумових канала гради  $K_{ATP}$  канале са сулфонилуреа рецепторима (SUR), који одређују АТР осетљивост канала, фармаколошке карактеристике и проводљивост. Експресија најзаступљеније миометријалне изоформе  $K_{ir6.1}/SUR2B$  је смањена при крају трудноће, што олакшава порођајне контракције (Curley i sar., 2002). Овај канал је инхибиран интрацелуларним АТР, а стимулисан MgADP. У хуманом утерусу,  $K_{ir6.1}/SUR2B$  канали су јаче експримирани у негравидном миометријуму у односу на крај гестације. Насупрот хуманом утерусу,  $K_{ATP}$  није смањен током порођаја код пацова.(Curley i sar., 2002).

### $K_{2P}$

Двопорни калијумови канали ( $K_{2P}$ ) су улазни исправљач  $K^{+}$  канали осетљиви на рН, хипоксију и истезање, а током гестације изоформе 1, 4 и 5 TASK канала и изоформа 1 TREK канала су нађене у хуманом миометријуму. Од осталих канала у миометријуму су пронађени хлоридни ( $Cl^{-}$ ), натријумови ( $Na^{+}$ ), неспецифични катјонски и калцијумови ( $Ca^{2+}$ ) канали.

Волтажно-зависни  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  канали доприносе спонтаним контракцијама утеруса и стога одржању порођајних контракција (Brainard i sar., 2007).

### ***Експресија $\text{K}^+$ канала за време еструса пацова***

Описана су три типа калијумових канала у миометријалним ћелијама пацова, чија експресија зависи од фазе циклуса, диеструса или еструса. Канали са највећим протоком су доминирали у еструсу. Брз проток калијума у еструсу (умерен у диеструсу), спречавањем достигања прага акционог потенцијала, доводи до смањене ексцитабилности утеруса. Ово се поклапа са постојањем мале спонтане активности и slabим простирањем ексцитабилности у утерусу током проеструса и еструса. Изражене хормонске промене током трудноће, такође прате промене у експресији калијумових канала. Естроген је повезан са падом експресије  $\text{K}_v4.3$  канала пре порођаја, а прогестерон је повезан са падом миометријалног  $\text{Ca}^{2+}$  као и увећаним cAMP, док код негравидног утеруса, прогестерон може увећати проток  $\text{Ca}^{2+}$  (Toro i sar., 1990; Wray & Noble, 2008).

### ***Садашње и потенцијалне индикације отварача/ОКК и блокатора/ВКК калијумских канала***

Са детаљнијим упознавањем  $\text{K}^+$  канала уследио је велики фармацеутски и научни интерес за откривањем и развојем што селективнијих модулатора  $\text{K}^+$  канала, али и потреба за реevaluацијом механизма деловања неких лекова и супстанци који до сада није довођен у везу са њиховим утицајем на  $\text{K}^+$  канале или на пропустљивост ћелијске мембране за  $\text{K}^+$  јоне. Због тога се неки „стари вазодилататори“ и доноси NO интензивно испитују као могући модулатори  $\text{K}^+$  канала који би се користили у лечењу неуролошких и кардиоваскуларних болести, дијабетеса, сепсе и др. (Shieh i sar., 2000; Sanborn, 2007). У табелама 1. и 2. дати су модулатори  $\text{K}^+$  канала, подељени на основу ефеката које имају на  $\text{K}^+$  канале, на две групе: а) блокаторе калијумских канала – ВКК и б) отвараче калијумских канала - ОКК. У овим табелама су представљене и болести и поремећаји у чијој терапији се користе ове супстанце:

**Табела 1 ОКК** – Фамилија калијумских канала, терапијске индикације и једињења која делују као отварачи калијумских канала (Shieh i sar., 2000).

Породица канала	Терапијске индикације	Једињења
KCNQ2/KCNQ3	Епилепсија	Ретигабин (GABA <sub>A</sub> агонист)
BK <sub>Ca</sub>	Церебрална исхемија	BMS-204352, NS 004 (инхибира и друге K <sup>+</sup> канале)
	Коронарни поремећаји	NS 1608, NS1619 (инхибитор Ca <sup>2+</sup> канала)
K <sub>ATP</sub>	Антипсихотик, Уринарна инконтиненција, Полиурија	NS
	Хипертензија	Пинацидил
	Исхемијска болест срца	Диазоксид
	Срчана инсуфицијенција	Никорандил
	Астма	Априкалим (RP 52891), Бимакалим (EMD52692), Целикалим
	Исхемија миокарда	Кромакалим, Емакалим, NIP121, RO 316930, RWJ 29009, SDZ PCO 400, Римакалим (HOE234), Симакалим (EMD 57283), YM-099, YM-934, BMS180448, U 89232 (BMS 189365) (Мито K <sub>ATP</sub> ?)
	Алопеција	P1075, Миноксидил
	Уринарна инконтиненција	ZM244085, ZD6169, WAY133537, WAY151616, ZD0947
Еректилна дисфункција	PNU83757	

### Отварачи калијумских канала

**Отварачи калијумских (K<sup>+</sup>) канала (ОКК)**, иако су хемијски хетерогена група једињења (Coghlan i sar., 2001), имају заједничку особину да проузрокују релаксацију глатке мускулатуре активацијом K<sub>ATP</sub> (Novaković i sar., 2007; Jahangir i Terzić, 2005) и K<sub>Ca</sub> канала (Khan i sar., 1998). ОКК су пре свега развијени да везивањем за K<sub>ATP</sub> канале проузрокују хиперполаризацију глатке мишићне ћелије, а тиме и њену релаксацију, односно да делују као спона између метаболичког стања ћелије и побуђености ћелије. Због тога, неки K<sub>ATP</sub> канале сматрају ендогеним медијаторима за одржавање хомеостазе ћелијских извора са потребама у циљу бољег адаптивног одговора на стресне факторе (Coghlan i sar., 2001; Mannhold, 2004; Minami i sar., 2004; Cole i Clement-Chomienne, 2003). Поред тога што се налазе у крвним судовима где регулишу васкуларни тонус, K<sub>ATP</sub> канали су присутни и у срцу, панкреасу, мозгу, бронхиолама, скелетним мишићима и другим органима и ткивима. Захваљујући широкој распрострањености и функцији K<sub>ATP</sub> канала у организму, отварачи K<sup>+</sup> канала представљају групу веома пожељних лекова као потенцијалних цитопротективних агенаса. Од отварача

калијумових канала се највише очекују повољни ефекти у кардиопротекцији, у лечењу хипертензије, бронхоспазма, епилепсије, алопеције, спазма мокраћне бешике, дијабетеса 2 (ради цитозаштите Langerhansovih острваца). Отварачи  $K^+$  канала се према хемијској структури деле у више класа (табела 1), па тако постоје **СИНТЕТСКИ ОКК: бензопирани** (левкромакалим, бимакалим и емакалим), **бензотиадиазин** (диазоксид), **цијаногванидини** (пинацидил), **циклобутендиони** (WAY-151616), **никотинамиди** (никорандил, KPN 2391), **пиридини** (никорандил, активатор ензима гванилатне циклазе), **пириимидини** (миноксидил), **терцијарни карбоноли** (ZD-6169), **тиоформаиди** (априкалим, прво синтетисан као инхибитор  $K^+/H^+$ -АТФ-азе), **деривати дихидропиридина** (ZM-244085), **бутеноична киселина** (ER 001533), **једињења слична DHP структурама** (ZM-244085) и **друга једињења** (BMS 182264, BMS 180448) и **ЕНДОГЕНИ ОКК: аденозин** (преко  $A_1$  у срцу или преко  $A_2$  рецептора у коронарним артеријама отвара АТФ зависне калијумове канале), **CGRP** (проузрокују релаксацију мезентеричне артерије кунџа преко  $K_{ATP}$  канала) и **EDHF**, који отвара калијумове канале (Jahangir i Terzic, 2005).

**Табела 2 ВКК** – Фамилија калијумских канала, терапијске индикације и једињења која делују као блокатори калијумских канала (Shieh i sar., 2000).

Породица канала	Терапијске индикације	Једињења
<b>Kv1.3</b>	Имуносупресија	CP308408; UK 78,282
<b>Kv1.5</b>	Атријална фибрилација	4- аминопиридин
<b>Kv (други)</b>	Мултипла склероза (регенерација аксона)	ВПА 0388
<b>hERG/Ikr</b>	Епилепсија, Ишемија, Атријална фибрилација/фластер	Дофетилид, Ибутилид (повећава $Na^+$ струју), Алмокалант, E4031
<b>KvLQT1-minK/IK<sub>s</sub></b>	Аритмија	МК 499, Сематилид,, D-соталол, Кроманол, 293В
<b>IKr i Iks</b>	Аритмија	HMR1556, E-047/1, L768673
<b>I<sub>TO</sub></b>	Ангина пекторис	Амбасилид (LU 47710), Азимилид /NE 10064 (блокатор L-тип $Ca^{2+}$ канала)
	Аритмија	Тедисамил (блокатор $Na^+$ канала)
<b>KCNQ3/KCNQ4</b>	Аритмија	Клофилијум
<b>K<sub>ATP</sub></b>	Алсхајмерова болест, Вентрикуларна аритмија, Инсуфицијенција срца, Застој срца	DMP543, HMR 1098, HMR 1883
	Дијабетес тип II	Толбутамид, Хлорпропамид, Глибенкламид, Глипизид, Натеглинид

## Блокатори калијумских канала

Способност блокаде калијумских канала имају супстанце које такође имају хемијски разноврсну структуру, укључујући **неорганске катјоне** ( $Ba^{2+}$ ,  $Cs^{+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), **кватернерна амонијумова једињења** (тетраетил-амонијум, тетрабутил-амонијум, тетраметил-амонијум), **аминопиридине** (4-аминопиридин /4-AP), **деривате сулфонил урее** (глибенкламид и толбутамид), **антиаритмике класе III** (амиодарон, бретилијум, бетанидин, клофилиум, соталол, ибутилид, дофетилид), па чак и **неке природне токсине** (апамин, лиуротоксин, карибдотоксин и ибериотоксин). Осим по хемијској структури и јачини деловања, ВКК се међусобно разликују и по специфичности за различите типове/субтипове  $K^{+}$  канала. Антиаритмици класе III у свом механизму деловања укључују и блокаду  $K_{ir}$  канала у срцу, што доводи до продужења акционог потенцијала и фазе реполаризације (Kažić i Ostojić, 2009; Kažić i sar., 2009).

Познато је да **неоргански катјони** поседују способност блокаде  $K^{+}$  канала. Тако на пример, јон  $Ba^{2+}$  у микроларним концентрацијама селективно блокира  $K_{ir}$  канале, док у милимоларним концентрацијама, осим  $K_{ir}$ , блокира и  $K_{ATP}$  канале. Глибенкламид и толбутамид, као **деривати сулфонил урее**, осим што блокирају  $K_{ATP}$  канале у  $\beta$ - ћелијама Langerhansovih острваца панкреаса, селективно инхибирају  $K_{ATP}$  канале у глатким мишићима крвних судова, срца и утеруса. Тетраетил-амонијум (ТЕА), најважније једињење из групе **QA**, је неселективни блокатор  $SK_{Ca}$ , који у нешто вишим концентрацијама блокира  $K_{ATP}$  канале. **Аминопиридини**, који су селективнији и јачи од QA, а чији је типичан представник 4-аминопиридин/4-AP, првенствено блокирају  $K_v$  канале, док у у вишим и  $K_{ATP}$  канале. **Класа III антиаритмика** (амиодарон, бретилијум, бетанидин, клофилиум, соталол, ибутилид, дофетилид) стабилизују ћелијску мембрану, али делом блокирају касно исправљачке калијумове канале у срцу, а последица тога је продужење акционог потенцијала и успоравање реполаризације. Међутим, осим блокаде калијумових канала, неки од њих блокирају и  $\beta$  рецепторе (*соталол*), као и адренорецепторе (*амиодарон*). **Природни токсини** из отрова пчела, шкорпиона, змија и алкалоида биљака (апамин, лиуротоксин, карибдотоксин и ибериотоксин) су најјачи и најселективнији блокатори  $K^{+}$  канала. *Апамин*, пептид добијен из отрова пчеле, најселективнији је блокатор, нарочито  $SK_{Ca}$ , у нано и микроларним концентрацијама. Изгледа да нема ефеката на друге типове калијумових канала. *Лиуротоксин* је пептид сличан апамину, добијен је из израелског шкорпиона, везује се за  $SK_{Ca}$ , али 5–20 пута слабије од апамина. *Карибдотоксин* (CTX) је такође пептид добијен из израелског шкорпиона, блокира  $SK_{Ca}$ , везујући се за спољашњу страну мембране. *Ноксиустоксин* је пептид добијен из шкорпиона,



сличан СТХ-у. *Дендротоксин* се добија из отрова зелене и црне мамбе, блокира волтажно зависне калијумове канале у неуронима. *Ибериотоксин*, пептид изолован из отрова шкорпиона, блокира и калцијум зависне и АТР зависне калијумове канале. У високим концентрацијама, инхибира и инфлукс и ефлукс волтажно зависне калцијумове струје, калцијум зависне калијумове струје и волтажно зависне калијумове струје (Kažić i Ostojić, 2009; Kažić i sar., 2009).

## РАДНА ХИПОТЕЗА:

Пинацидил, отварач  $K^+$  канала (ОКК), доводи до релаксације глатке мускулатуре утеруса пацова, без обзира на начин активације и тип контракција, модификујући функцију  $K^+$  канала. У овај процес релаксације укључени су  $K_{АТР}$  канали. Пентоксифилин у свом механизму деловања укључује отварање калијумских канала и/или сигналне путеве NO.

*Радну хипотезу заснивамо на претпоставкама да:*

- Лекови из групе модулятора  $K^+$  канала се примењују у лечењу кардиоваскуларних оболења и дијабетеса;
- Са детаљним упознавањем  $K^+$  канала јавио се и огроман фармацеутски интерес који је утицао на откривање и развој селективних модулятора  $K^+$  канала, као и ре-евалуација постојећег избора лекова и супстанци;
- Испитивање утицаја модулятора калијумских канала, али и неких познатих вазодилататора (попут пентоксифилина, натријум-нитропрусида, протамина) који у свом механизму укључују калијумске канале и/или азот-моноксид (NO) на ткиво утеруса је значајно, како за испитивање физиологије и патофизиологије утеруса, тако и за проналажење нових терапијских концепата у лечењу поремећаја контрактилности утеруса, али и васкуларне дисфункције.

## ЦИЉ:

За проверу ове хипотезе постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Утврдити утицај АТР-сензитивног отварача калијумских канала (пинацидила) и пентоксифилина на различите типове активације изолованог утеруса пацова (електрична стимулација, ацетилхолин, окситоцин), као и утицај на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова;
2. Утврдити да ли постоји селективност и разлика у афинитету отварача калијумских канала и пентоксифилина за различите типове активације глатког мишића утеруса;
3. Испитати ефекат глибенкламида, селективног блокатора  $K_{АТР}$  канала, на контрактилност глатке мускулатуре утеруса индуковане електричном стимулацијом и окситоцином, као и утицај на спонтану ритмичку активност;
4. Испитати да ли постоји антагонизам између пинацидила и пентоксифилина и блокатора калијумских канала (глибенкламида);

5. Испитати да ли постоји антагонизам између пинацидила и пентоксифилина и других блокатора калијумских канала, тетраетиламонијум (ТЕА) и 4-аминопиридин (4-АР), ради утврђивања врсте калијумских канала који учествују у механизму релаксантног дејства пинацидила и пентоксифилина;
6. Утврдити да ли је релаксација изазвана пинацидилом код свих наведених типова активације изолованог утеруса пацова временски зависна, односно да ли се испољава толеранција;
7. Испитати утицај температуре у медијуму са изолованим утерусом на релаксантни ефект пинацидила и пентоксифилина;
8. Испитати да ли донор NO (натријум-нитропрусид) и пентоксифилин проузрокују релаксацију глатког мишића утеруса активирањем калијумских канала или укључивањем сигналних путева NO;
9. Утврдити утицај пинацидила и пентоксифилина на контрактилност изолованог утеруса пацова у присуству њихових инхибитора/симулатора: метиленског плавила (инхибитор солубилне форме гванилатне циклазе), L(+)-аргинина (прекурсор у синтези NO), индометацина, протамин- сулфата, као и у условима блокаде синтезе NO са L-NAME;
10. Урадити контролне експерименте за све серије експеримената без присуства агониста и антагониста и контролу утицаја растварача на утерусни мишић.

## **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА**

## Експериментални модел систем

Истраживања чији су резултати приказани у овом раду спроведана су у сагласности са смерницама „Добре лабораторијске праксе“ и уз поштовање „Етичких принципа научно – истраживачког рада на експерименталним животињама“, које је прописао Етички комитет Медицинског факултета у Фочи, Универзитет Источно Сарајево (Акт In Br.- 01–235 од 22.06. 2006. године).

С обзиром да активност утеруса варира драстично у зависности од тренутних функционалних потреба јединке, утерус је, поред велике физиолошке улоге и изузетно значајан модел за фармаколошка испитивања (12–15). У испитивањима је коришћен изоловани утерус непарених женки пацова соја Wistar, телесне масе од 180 до 220 грама. Животиње су држане у стандардним лабораторијским условима (4–8 животиња у кавезу, при собној температури, дневно-ноћном ритму осветљења, уз појење и храну *ad libitum*). Животиње које смо користили за експерименте морале су бити у истој фази сексуалног циклуса. Животиње су третиране синтетичком формом естрогена, стилбестролом (1 mg/kg интрамускуларно), 24 часа пре жртвовања, како би им се синхронизовао еструсни циклус, или су биле у истом хормоналном статусу, еструсу (Milovanović i sar., 1988).

Све женке су биле у еструсу, што је утврђивано свакодневним посматрањем вагиналног бриса. Размаз се боји хематоксилином и прегледа под микроскопом. *Проеструс* траје 12–14 сати. У брису се виде овалне епителне ћелије са једром и нема леукоцита. У овој фази почиње сазревање јајних ћелија. *Еструс (овулација - „heat“)* траје 24–27 сати. Брис се одликује врло упечатљивим корнификованим ћелијама без једра. Такође, леукоцита нема. *Метеструс или постеструс* траје 7–8 сати. Корнификоване ћелије се губе, појављују се ћелије са једром, као и леукоцити. *Диеструс* траје 55–57 сати. Корнификоване ћелије су ишчезле, има пуно леукоцита и слузи у виду тракица. (Montes and Luque, 1988).

Све животиње су жртвоване на исти начин и без употребе средстава за омамљивање или усмрћивање. Сви прописи за коришћење пацова су одобрени од стране локалног етичког комитета за експерименте на животињама, који строго прати међународне прописе.

## Фармаколошке методе

Абдомен пацова се отвара у облику слова V и исецају се оба рога утеруса, пажљиво одвојени од околног ткива. Након изоловања, један рог утеруса се поставља у купатило за изоловане органе (Ugo Basile), волумена 30 ml, које је испуњено De Jalon-овим раствором (mmol/l: NaCl 154, KCl 5.63, CaCl<sub>2</sub> 0.54, NaHCO<sub>3</sub> 5.9, глукоза 2.77), на температури од 30°C или

37°C. Овај раствор је аерисан мешавином сачињеном од 95% кисеоника и 5% угљендиоксида. Препарат се смешта на следећи начин: једним крајем се уз помоћ омче од конца закачи за стаклену кукицу која се налази на дну купатила и уједно служи за увођење гасова у хранљиви раствор, а другим, такође уз помоћ конца, се веже за трансдјусер. Трансдјусер региструје изометријске контракције и преноси их на писач.

Инкубација изолованог утеруса траје најмање 30 мин. Контракције изолованог утеруса пацова су регистроване помоћу трансдјусера „Ugo Basile“ и пренесене на писач. Претходно оптерећење препарата је било око 1 g.

Постепено препарати су истезани до оптималне тачке затезања од 1 g (Hughes i Hollingsworth, 1995). Пре почетка експеримената препарати су инкубирани 45 минута у физиолошком раствору. Коришћен је по један препарат за сваки експеримент. Контракције су белажене на писачу који је повезан са трансдјусером.

Ради проучавања утицаја отварача калијумских канала (ОКК) и њихове интеракције са донорима NO на контрактилност глатког мишића утеруса пацова, користили смо растуће концентрације пинацидила ( $10^{-8}$  до  $10^{-4}$ М или 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M и 100  $\mu$ M), пентоксифилина ( $10^{-6}$  до  $10^{-4}$ М или 4.2 mM, 12,8 mM, 29,9 mM, 64,1 mM, 106,9 mM и 192,3 mM) и протамина, како код спонтаних контракција глатког мишића утеруса, тако и код контракција индукованих електричном стимулацијом, ацетилхолином, окситоцином и калцијумом. Током извођења различитих типова активације изолованог утеруса пацова испитиван је механизам релаксантног ефекта различитих вазодилататора, са или без присуства њихових потенцијалних инхибитора/синергиста (Пропранолол, L-аргинин, Метиленско плаво, L-NAME, Тетраетиламонијум (ТЕА), Глибенкламид и 4-аминопиридин (4-AP), Индометацин, Протамин-сулфат и L-NAME).

Наведене растуће концентрације пентоксифилина, пинацидила и протамина су додаване кумулативно након што би контракције постале устаљене (30 - 60 минута), остављајући довољно времена да би претходно примењена концентрација показала свој ефект. У статистичку обраду добијених података ушли су резултати експеримената који су показивали сличан ефекат у понављаним експериментима. Релаксантни ефекат пинацидила, али и других испитиваних супстанција (пентоксифилин и протамин) изражаван је као проценат релаксације у односу на величину амплитуда контракција непосредно пре њиховог додавања. За све ефекте конструисане су кумулативне концентрацијски - зависне криве за пинацидил, пентоксифилин и протамин- сулфат.

У циљу разјашњења механизма деловања пентоксифилина, пинацидила и протамин-сулфата, испитали смо и њихове ефекте у присуству 0,3  $\mu$ mol/L L-аргинина (прекурсора синтезе азот-моноксида - NO), 10  $\mu$ g метиленског плавила  $0,9 \times 10^{-6}$  mol/L (блокатора гванилатне

циклазе), глибенкламида /GLB  $10^{-5}$  mol/L (селективног блокатора  $K_{ATP}$  канала), 4AP  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  и  $3 \times 10^{-3}$  mol/L (селективни блокатор волтажно зависних  $K^+$  канала), ТЕА  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  и  $3 \times 10^{-3}$  mol/L (неспецифични блокатор  $ВК_{Ca}$  и волтажно зависних  $Ca^{2+}$  канала). Потенцијални блокатори или стимулатори су додавани у купатилце за изоловане органе 30 минута пре додавање почетне концентрације пинацидила односно пентоксифилина.

*Експерименти су спровођени у посебним серијама, у зависности од начина на који су изазване контракције. Контракције на изолованом утерусу проузроковане су калцијумом ( $Ca^{2+}$ ), електричном пољном стимулацијом, KCl, ацетилхолином и окситоцином. Посебну серију експеримената чинили су препарати који су показивали спонтану ритмичку активност. За разматрање релаксантног утицаја пинацидила на контрактилност побуђену хормонским путем, користили смо окситоцин у концентрацији од 0.2 nM, или изражено у интернационалним јединицама 0.0001 IU. Протокол за серије експеримената где су контракције глатког мишића утеруса изазване  $Ca^{2+}$  био је исти. У једној серији експеримената, после периода инкубације, у купатило за изоловане органе додат је  $Ca^{2+}$  (6mM). Након успостављања стабилних и уједначених контракција у периоду од 30–60 минута, даван је пинацидил, протамин, односно пентоксифилин, на начин који је већ описан за препарате који су показивали спонтану ритмичку активност или друге типове активације.*

Протокол за серију експеримената са препаратима који су показивали спонтану ритмичку активност био је следећи: када би контракције постале устаљене (30 - 60 минута), додаван је пинацидил у концентрацијама од 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M и 100  $\mu$ M у кумулативном маниру, односно веће концентрације су даване тек пошто је ефекат претходне дозе постигао плато, или 10 минута након изостанка одговора. Пинацидил спада у групу отварача калијумских канала и сходно томе може да релаксира глатку мускулатуру ослобађајући  $K^+$  јонску струју из ћелије, односно доводећи до ефлукса  $K^+$  јона. Пинацидил је већ познат као релаксатор глатке мускулатуре крвних судова и регистрован је као антихипертензивни лек *Pindak*, Leo Pharmaceutical Products, Данска. Имајући то у виду, желели смо да проучимо његову улогу у релаксацији утеруса и да утврдимо да ли  $K_{ATP}$  канали учествују у тој релаксацији, користећи селективне антагонисте  $K_{ATP}$  канала, глибенкамид, 4-аминопиридин, тетраетиламонијум.

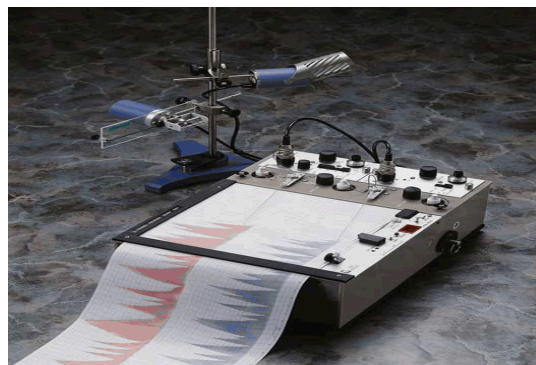
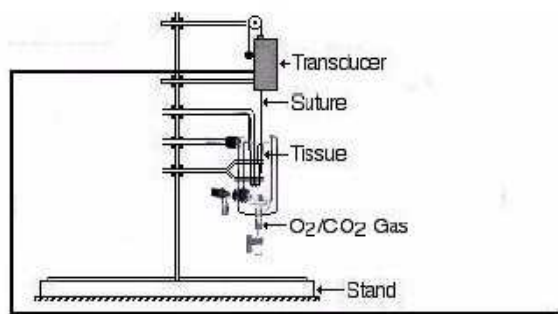
За експерименте у којима је коришћена **електрична стимулација односно електрична пољна стимулација (EPS)**, сегменти утеруса фиксирани су између две паралелно постављене електроде, начињене од паладора (паладијим 30% и сребро 70%). Изометријске контракције провоциране су струјом следећих параметара: фреквенца 50 Hz, време трајања једног импулса 0.3 ms, излазни напон 80 V, време стимулације 3 s. Након успостављања стабилних и уједначених контракција (30 - 60 минута), кумулативно је даван пинацидил, пентоксифилин или

протамин. Да бисмо потврдили претпоставку да су контракције изазване електричном стимулацијом неурогене природе, односно да су изазване ослобођеним неуротрансмитером, у посебним серијама експеримената додаван је у раствор тетродотоксин - ТТХ ( $1\mu\text{M}$ ) 20 минута пре примене стимулације. ТТХ је блокатор натријумских канала на нервним завршецима, његовом применом спречава се ослобађање неуротрансмитера и изостаје контракција глатког мишића. По истом протоколу употребљен је и атропин ( $1\mu\text{M}$ ) – антагонист ацетилхолина. Његово везивање за мускаринске рецепторе на глатком мишићу спречава везивање ацетилхолина и доводи до изостанка контракције по примењеној електричној стимулацији.

Посебну групу чинили су експерименти у којима су **ацетилхолином ( $1\mu\text{g}$ ) индуковане појединачне фазне контракције**. Ако изоловани утерус пацова после периода инкубације од 30 минута није показивао знаке спонтане ритмичке активности, додаван је ацетилхолин, којим је изазивана фазна, појединачна контракција. После неколико (углавном три) уједначених контролних контракција, аплицирана је најмања концентрација пинацидила и у његовом присуству додаван је поново ацетилхолин. По завршеној контракцији, следило је испирање. Овај протокол је понављан за сваку концентрацију пинацидила ( $10 - 100\mu\text{M}$ ). У овој серији експеримената нису коришћени блокатори калијумских канала (ВКК). Изометријске контракције препарата су регистроване коришћењем изометријског трансдјусера „К 30, Hugo Sachs“ на двоканалном писачу „Ugo Basile“. Као извор електричних стимулуса коришћен је стимулатор „Grass S44“. Блокатори калијумских канала (GLB, 4AP и TEA), у највећим примењеним концентрацијама, нису мењали тонус, нити утицали на SRK или на контракције изазване електричном стимулацијом (EPS), окситоцином или KCl.







**Слика 1** **А.** Изглед отвореног абдомена женке пацова и 2 рога утеруса пре изоловања; **В.** Купатило за изоловане органе Ugo Basile; **С.** Купатилце за изоловане органе (може се уочити цев која обезбеђује доток ваздуха, као и држач ткива у виду закривљене стаклене цевчице); **Д.** Двоканални писач Ugo Basile

### Супстанце и раствори

У експериментима су коришћене следеће супстанце: пентоксифин, калцијум-хлорид, L- аргинин, глибенкламид, метиленско плавило (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*), пинацидил-монохидрат (Leo Pharmaceuticals), ацетилхолин, 4-аминопиридинијум, тетраетиламонијум. Основни раствори супстанци припремани су сваког дана. Глибенкламид је растваран у пропиленгликолу, а калцијум-хлорид и пинацидил у дестилованој води (уз додавање једне капи 0.01 N HCl). Све остале супстанце су такође растваране у дестилованој води. Ниједан од коришћених растварача није мењао тонус утеруса. Све супстанце су у запремини од 100  $\mu$ l убризгаване директно у купатилце за изоловане органе, чија је запремина износила 10 ml. Примењене концентрације су изражаване као моларне концентрације (M) супстанце у раствору којим је било испуњено купатило.

### Статистичка обрада података

За све ефекте експеримената у којима се примењују отварачи калијумских канала, протамин и пентоксифин, са или без присуства потенцијалних инхибитора/синергиста, урађене су концентрацијски-зависне криве. Статистичка обрада резултата подразумевала је појединачно израчунавање вредности процента инхибиције, добијених коришћењем наведених супстанци у односу на контролну вредност. Било је потребно израчунати податке за сваку примењену дозу лека и сваки експеримент. Потом су израчунате средње вредности процената и одређене су стандардна девијација и стандардна грешка. Добијене вредности процената инхибиције и стандарних грешака коришћене су при стварању графичког приказа резултата. Статистичка обрада резултата је урађена сагласно протоколима описаним код Hinkle-a i saradnika (1997) и Manley-a (1986). Сви резултати су изражавани као средња вредност  $\pm$  SD

процента релаксације у односу на контролу. Трендови и разлике између екперименталних група су процењиване помоћу вишефакторске анализе варијансе (ANOVA), са значајношћу  $p < 0.05$  као граничном и *post hoc* тестовима који су детаљније описивали врсту разлике добијену анализом варијансе. Дозна зависност третмана је статистички испитивана употребом различитих фитованих кривих које најбоље описују карактер дозне зависности. У зависности од врсте фитовања, примењиване су одговарајуће статистичке методе њиховог поређења.

# Резултати

# I РЕЗУЛТАТИ

## ПЕНТОКСИФИЛИН

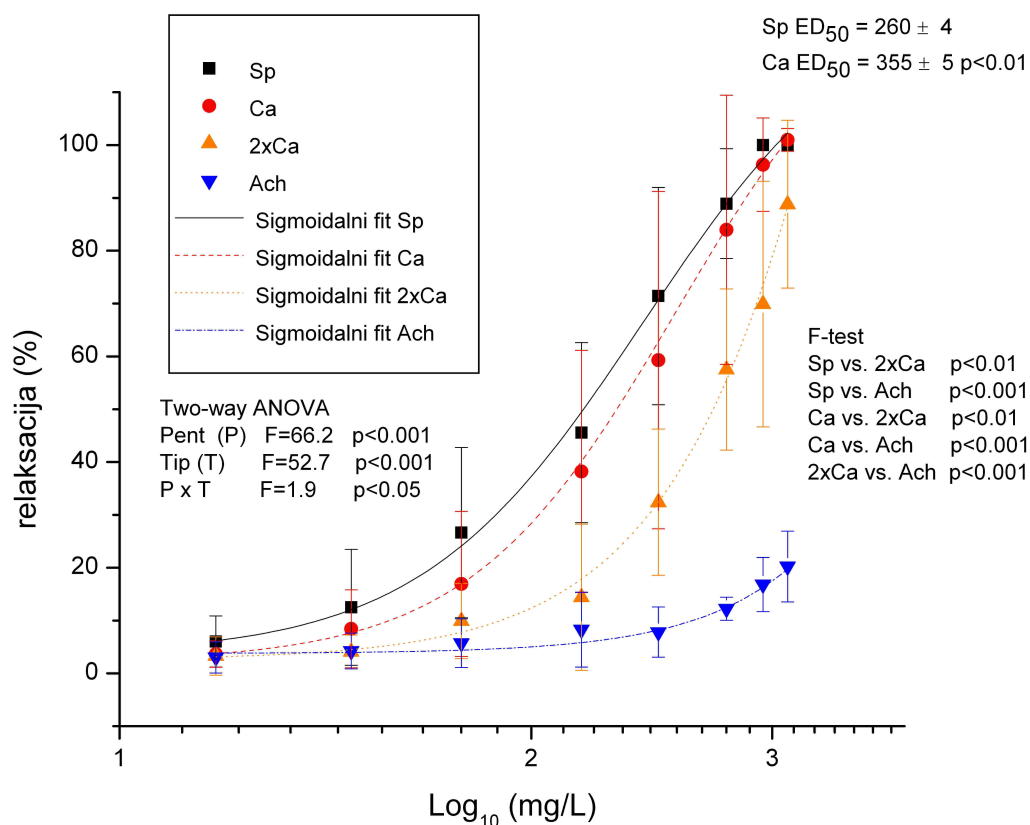
### *1. Утицај раличитих типова активације утеруса на релаксантни ефекат пентоксифилина*

У нашим експериментима испитивали смо релаксантни ефект пентоксифилина на контракције изолованог утеруса пацова које одликује фазна активност (брза контракција и брза релаксација), која се побуђује електричном стимулацијом (ES), или на активност изазвану различитим концентрацијама калцијум-хлорида (0.018 и 0.36 mM) односно једноструком или двоструком количином калцијума ( $\text{Ca}^{2+}$ ) у медијуму, дејством са неуротрансмитерима-ацетилхолином (егзогено додатим ацетилхолином /ACh), или на спонтане ритмичке контракције глатког мишића утеруса, које су карактеристичне за почетак порођаја. Познато је да се споре и продужене контракције без релаксације (у трудноћи су непожељне јер могу довести до смрти фетуса, а могу имати патолошки значај и за негравидни утерус) могу побудити раствором KCl (овај тип експеримента је описан у поглављу о пинацидилу). Можда је исправније рећи да смо испитивали како различити типови активације утичу на релаксантни ефект пентоксифилина, због чега смо тако и насловили прву серију експеримената у овој докторској тези.

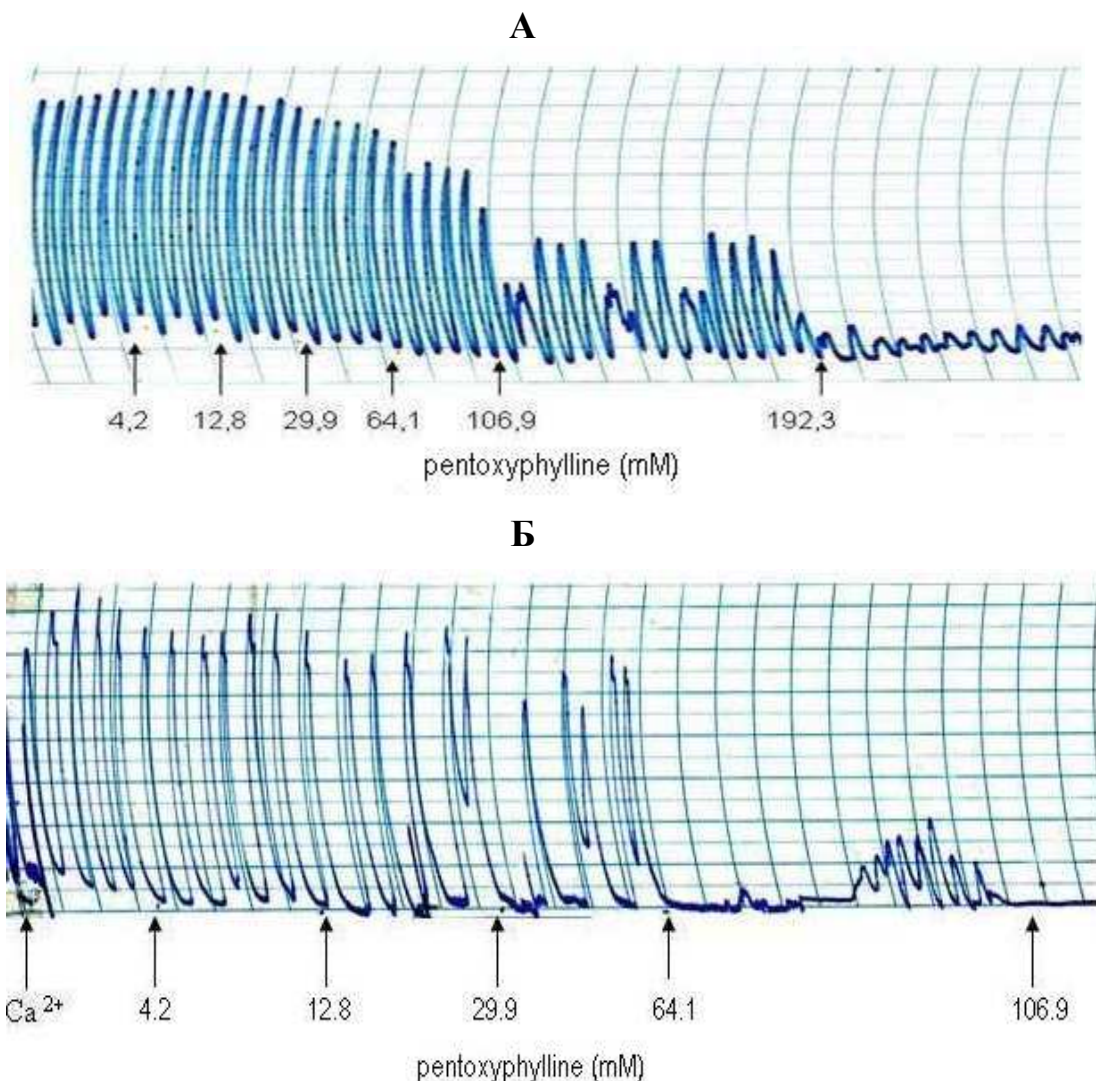
Пентоксифилин је концентрацијски зависно релаксирао спонтане ритмичке контракције, фазну активност/контрактилност изазвану различитим концентрацијама калцијум-хлорида /  $\text{Ca}^{2+}$  (0.018 и 0.36 mM), као и контракције изолованог глатког мишића утеруса проузроковане са ацетилхолином (ACh) (ANOVA, статистички значајан ефекат концентрације пентоксифилина,  $p < 0.001$ ; (сл. 1, 2 АВ), али степен релаксације зависи од типа активације (ANOVA, ефекат типа активације,  $p < 0.001$  и интеракција  $P \times T$   $p < 0.05$ ). Најснажнији релаксантни ефекат пентоксифилин показује на спонтано активним утерусима (најмања  $ED_{50}$ ), док је веома слаб на утерусима стимулираним ACh. Релаксантни ефекат је јасно изражен и код  $\text{Ca}^{2+}$ - стимулираних утеруса, са потпуном релаксацијом при највишим употребљеним концентрацијама код утеруса стимулираних једнократном дозом  $\text{Ca}^{2+}$ . Стимулација двоструком активационом дозом калцијума смањује релаксантни ефекат пентоксифилина и при највишим употребљеним концентрацијама не долази до потпуне релаксације. У односу на спонтано активне утерусе, релаксантни ефекат пентоксифилина је слабији код  $\text{Ca}^{2+}$ - стимулираних утеруса, што се огледа и у статистички значајно већој  $ED_{50}$  код овог типа активних утеруса. Криве релаксације за спонтано и  $\text{Ca}^{2+}$ - активирани утерусе се статистички значајно моделирају према сигмоидалном моделу ( $\text{Chi}^2/\text{DoF} < 0.05$ ), док за утерусе активирани двоструким калцијумом сигмоидални

модел није значајан услед недостатка дозе која би изазвала максимални релаксантни ефекат. За Асh-стимулисане утерусе употребљене дозе су исувише мале да би изазвале значајну концентрацијски зависну релаксацију, те се не могу моделовати на сигмоидални начин. Поређењем кривих F-тестом се показује да су криве за спонтано активне и  $\text{Ca}^{2+}$  стимулисане активне утерусе сличне по нагибу и статистички значајно различите у односу на друге две.

У нашим првим експериментима (у оквиру ове серије експеримената) најпре смо пошли од испитивања дејства растућих концентрација пентоксифилина (0,015; 0,03; 0,06; 0,15; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mg/ml) на спонтану ритмичку активност утеруса, као и на активност изазвану различитим концентрација калцијум-хлорида (0.018 и 0.36 mM). Ми смо показали (као што је наведено у збирном опису прве серије експеримената) да пентоксифин, најснажнији инхибиторни ефекат испољава на спонтану ритмичку активност, као и на контракције изазване са 0.018 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (сл. 1, 2 АВ). Знатно слабији релаксантни ефект, пентоксифин је испољио на контракције са вишом концентрацијом  $\text{Ca}^{2+}$  (0.36 mM). Наиме, спонтана ритмичка активност и активност изазвана калцијум-хлоридом, мењали су се под дејством пентоксифилина у различитом степену. Исте примењене концентрације пентоксифилина су снажније инхибисале спонтану ритмичку активност утеруса. Међутим, максимална инхибиција спонтане ритмичке активности и активности изазване нижом концентрацијом калцијум-хлорида (0.018 mM) додатом у медиј је постигнута са истим максималним концентрацијама пентоксифилина. С друге стране, минималну инхибицију и то тек након примене максималних концентрација (12–18 %), пентоксифин је испољио на контракције изолованог утеруса пацова изазване ацетилхолином, што упућује на одсуство антимукаринског ефекта, односно на механизме који играју улогу у овом типу активације. Вероватно да пентоксифин испољава слабији ефект на контракције које више зависе од интрацелуларног калцијума.



**Слика 1** Релаксанти ефекат пентоксифилина на различито стимулисану активност утеруса односно на различите типове активације. Црна крива указује на релаксанти ефект пентоксифилина на спонтану ритмичку активност (*Sp*). Црвена крива указује на релаксанти ефект пентоксифилина на контракције изазване са 0.018 mM калцијума/ $Ca^{2+}$ . Црвена крива са троугловима указује на релаксанти ефект пентоксифилина на контракције изазване са дуплом концентрацијом калцијума у медијуму (2 x  $Ca^{2+}$ , 0.36 mM). Плава крива указује на релаксанти ефект пентоксифилина на ацетилхолински тип активације (*Ach*). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом пентоксифилина (P) и типом стимулације (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу, али је само код спонтано и  $Ca^{2+}$ - стимулираних активних утеруса ефекат пентоксифилина било могуће статистички значајно фитовати на овај начин ( $Chi^2/DoF < 0.05$ ). За холинергички тип активације утеруса, сигмоидални фит није ни било могуће урадити због опсега доза пентоксифилина које нису биле довољне за потпуно моделовање. На графику су дате и ED<sub>50</sub> вредности израчунате из сигмоидалних кривих са статистички значајном разликом међу њима. Криве су поређене F-тестом и приказане су само статистички значајне разлике међу њима.



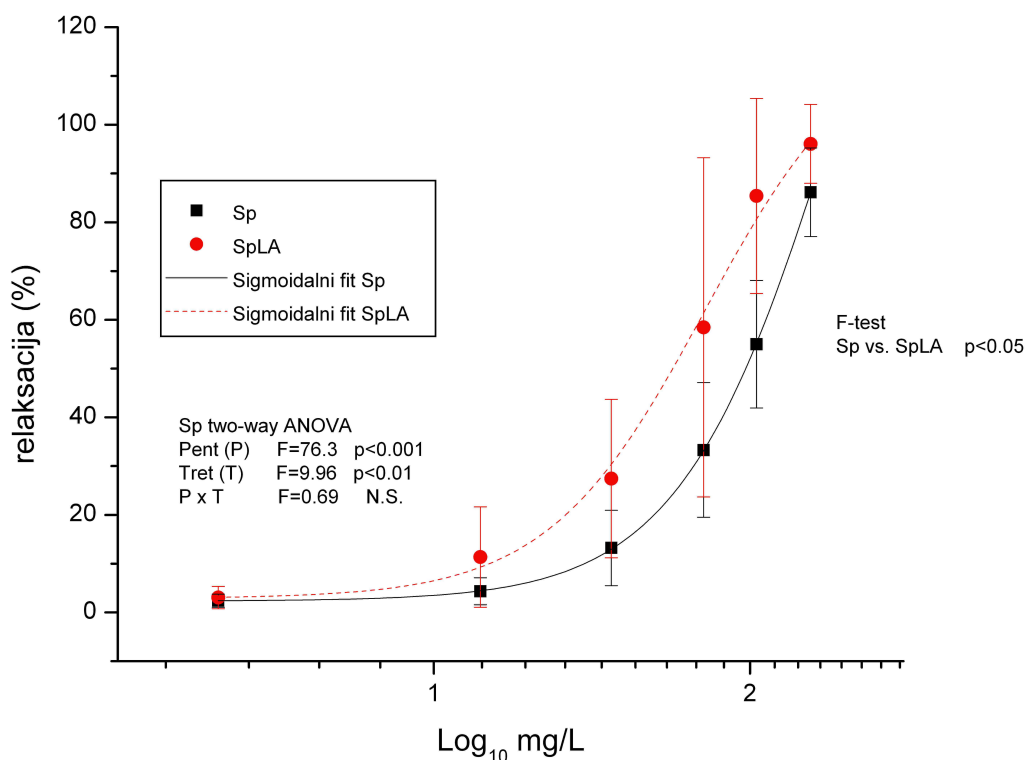
**Слика 2** Оригинали трасеј утицаја растућих концентрација пентоксифилина на спонтану ритмичку активност (А), као и на активност изазвану различитим концентрација калцијум-хлорида (0.018 mM) (Б).

**2. Утицај претретмана са L-аргинином на релаксантни ефекат растућих концентрација пентоксифилина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом**

У овој другој серији експериментима испитивали смо дејство растућих концентрација пентоксифилина (0,015; 0,03; 0,06; 0,15; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mg/ml) на спонтану ритмичку активност утеруса, као и на активност изазвану калцијум-хлоридом (0.018 mM), у присуству стандардне концентрације L-аргинина (0,3μmol) у купатилцу за изоловане органе.

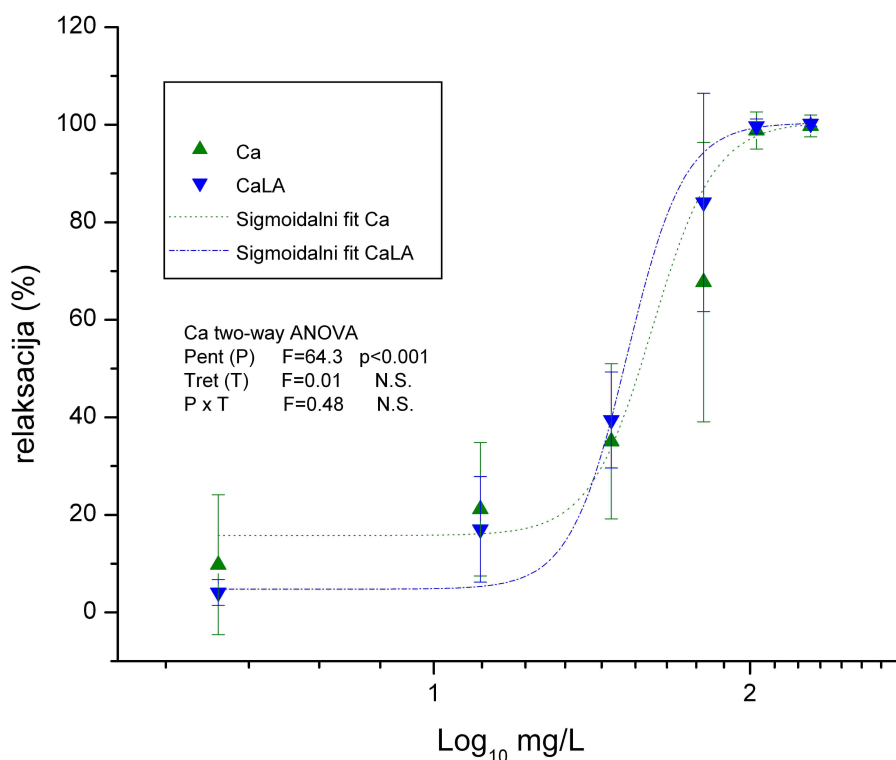
Показали смо да, претретман утеруса са L-аргинином (0,3μmol), код спонтано активних утеруса доводи до благог потенцирања релаксантног ефекта пентоксифилина (ANOVA ефекат претретмана,  $p < 0.01$ ; статистички значајно промењен нагиб сигмоидално моделоване криве

релаксантног ефекта пентоксифилина,  $p < 0.05$ , сл. 3). Међутим, максимални инхибиторни ефект пентоксифилина на овом типу активације, присуство L-аргинина, није значајније променило. Запажа се само потенцирање релаксантног ефекта у почетним концентрацијама пентоксифилина. Насупрот томе, код активности утеруса стимулираних  $Ca^{2+}$ , претретман са L-аргинином, не доводи ни до каквих промена, изостаје потенцирање релаксантног ефекта пентоксифилина (сл. 4). И у овом случају, као и код прве серије експеримената, показано је да пентоксифилин нешто снажнији инхибиторни ефекат испољава на спонтану ритмичку активност, него на контракције изазване са  $0.018 \text{ mM } Ca^{2+}$  (сл. 3, 4, 5АБ). На основу ове наше серије експеримената може се закључити да се, у присуству L-аргинина, не мења у већој мери инхибиторни ефект пентоксифилина на спонтану ритмичку активност утеруса (максимални инхибиторни ефект пентоксифилина на овом типу активације није измењен), посебно на активност изазвану калцијум-хлоридом.



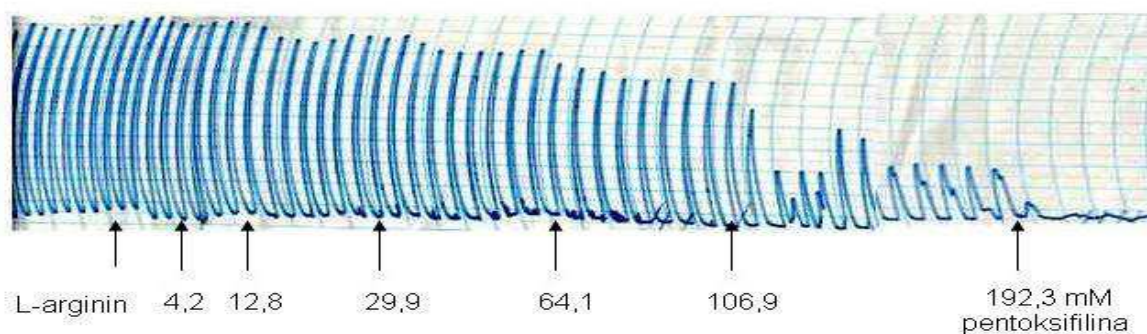
**Слика 3** Релаксантни ефекат пентоксифилина на спонтано активне утерусе претретиране са L-аргинином. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом пентоксифилина (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Поређење F-тестом је показало постојање статистички значајних разлика међу сигмоидално моделираним кривама.





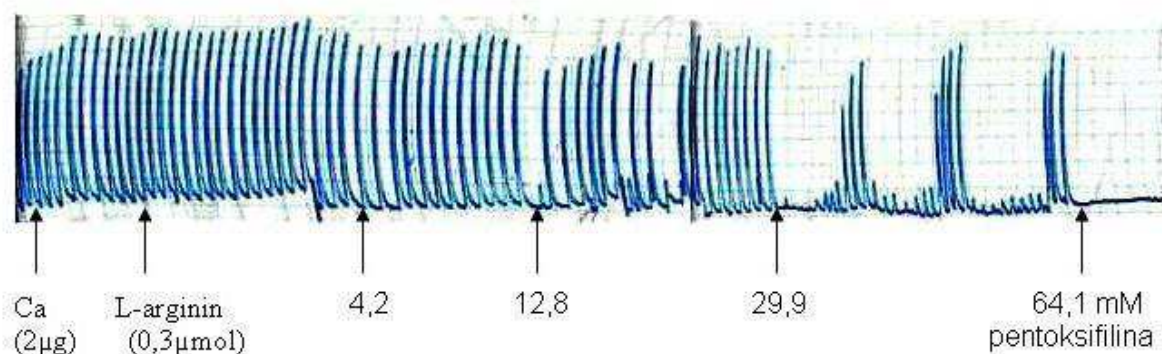
**Слика 4** Релаксанти ефекат пентоксифилина на  $\text{Ca}^{2+}$ - индуковане активне утерусе претретиране са L-аргинином. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом пентоксифилина (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Поређење F-тестом није показало постојање статистички значајних разлика између сигмоидално моделираних крива за сам пентоксифилин и претретман са L-аргинином.

А



Слика 5А Оригинални трасеј утицаја растућих концентрација пентоксифилина у присуству L-аргинина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова

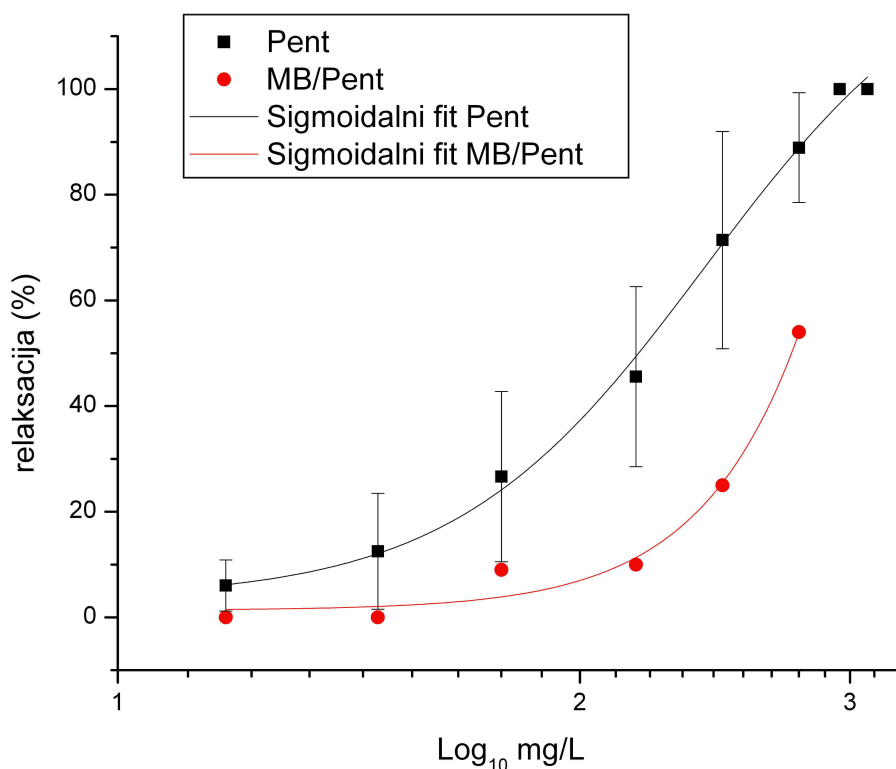
Б



Слика 5Б Оригинални трасеј утицаја растућих концентрација пентоксифилина у присуству L-аргинина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова изазвану калцијумом

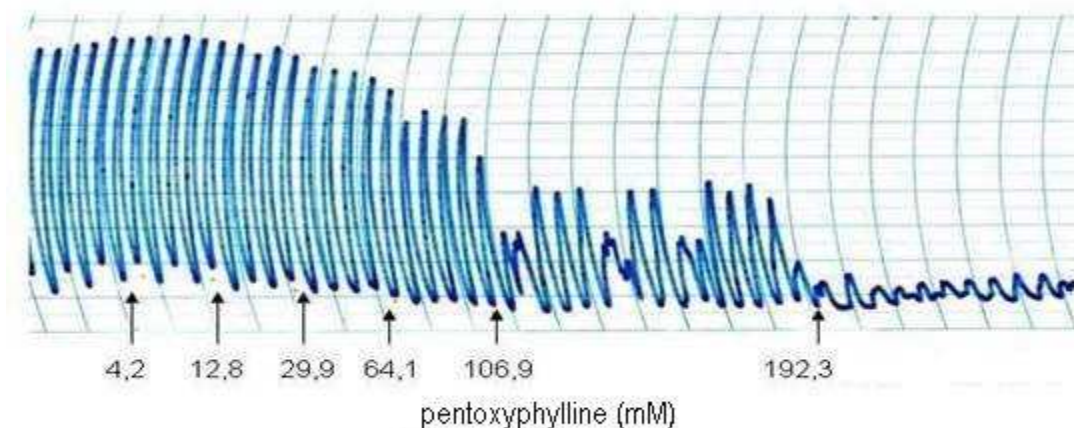
### 3. Утицај претретмана метиленским плавим (МВ) на релаксантни ефекат растућих концентрација пентоксифилина

**Метиленско плавило** инхибира стварање cGMP, тиме што спречава интеракцију NO са гванилатном циклазом. Резултати наших експеримената показују да метиленско плавило смањује релаксантни ефекат пентоксифилина. Ни највиша примењена концентрација пентоксифилина није довела до потпуног престанка контракција. Претретман са метиленским плавилем, значајно антагонизује релаксантни ефекат растућих концентрација пентоксифилина ( $p < 0.0001$ ). Интересантно је и да је инхибиција коју изазива пентоксифилин, у присуству метиленског плавила, краткотрајна. Наиме, додавање пентоксифилина инхибисало је контракције утеруса, али инхибиција је брзо нестајала и амплитуде записа контракција су се увећавале.

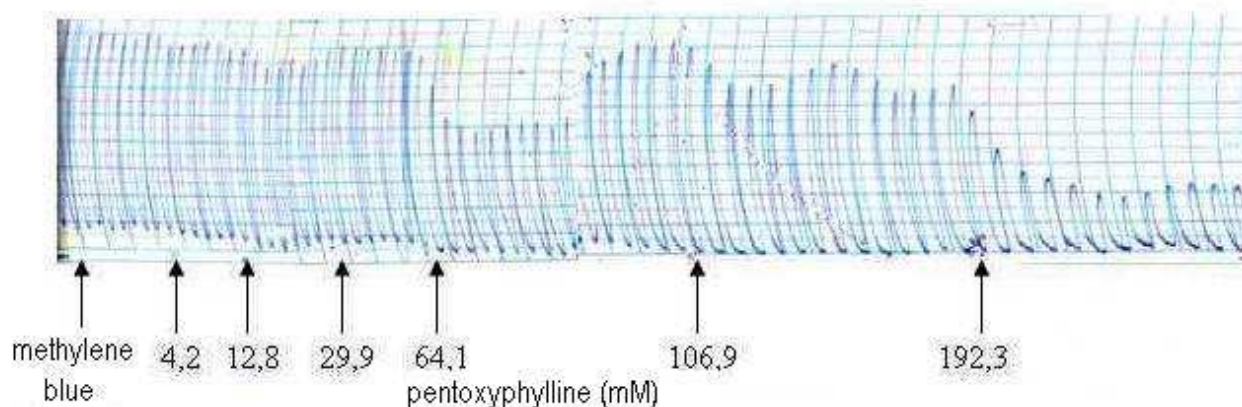


**Слика 6** Релаксантни ефекат растућих концентрација пентоксифилина (0,015; 0,03; 0,06; 0,15; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mg/ml) на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова и на спонтано активне изоловане утерусе пацова претретране метиленским плавилом (MB, 10 µg). Црвена крива означава релаксантни ефект пентоксифилина у присуству MB=MB/PENT. Плава крива=PENT означава контролни експеримент пентоксифилина без MB. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација (n=8–12 експеримената). Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом пентоксифилина (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Поређење F-тестом је показало постојање статистички значајних разлика међу сигмоидално моделираним кривама. Претретман са метиленским плавилом, значајно антагонизује релаксантни ефект растућих концентрација пентоксифилина (p<0.0001).

А



Б



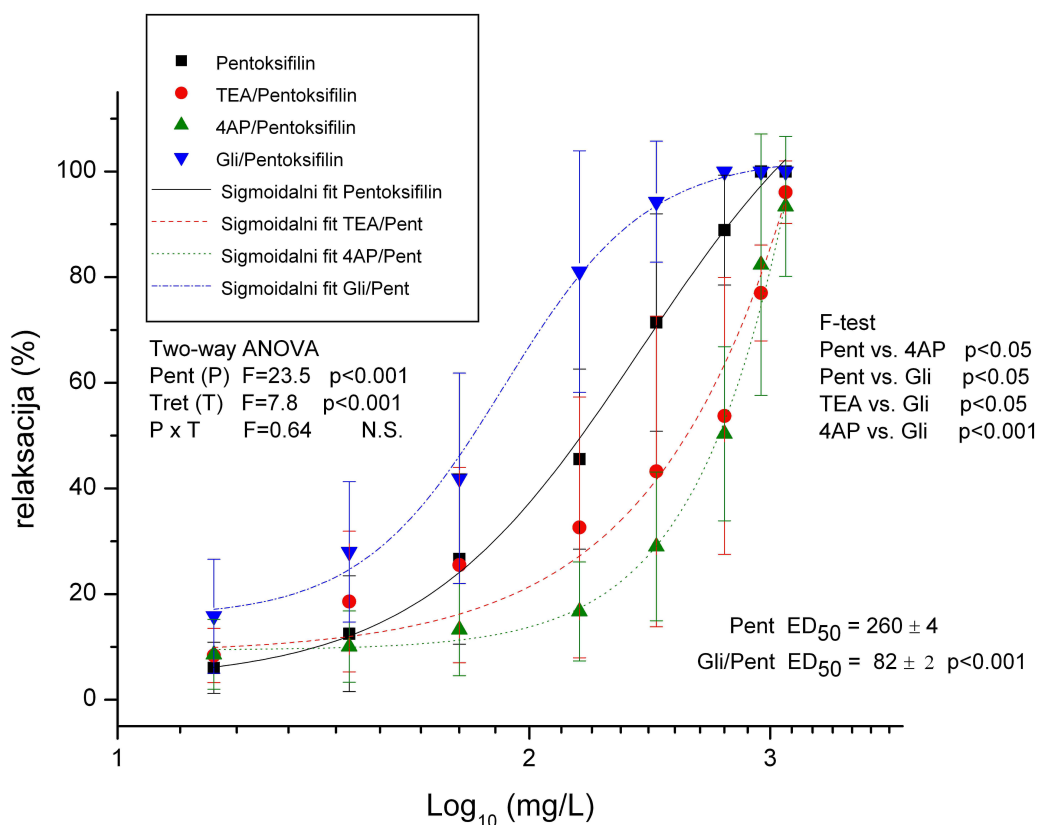
Слика 7АБ Оригинални трасеј утицаја растућих концентрација пентоксифилина у одсуству (контролни експеримент, сл. 7А) и присуству метиленског плавила у концентрацији од 10  $\mu\text{g}$  (7Б) на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова

**4. Утицај блокатора калијумских канала, глибенкламида (GLB), 4-аминопиридина (4AP) и тетраетиламонијума (TEA), на релаксантни ефект пентоксифилина на спонтаној ритмичкој активности**

У истраживањима релаксантног ефекта пентоксифилина желели смо да проучимо и евентуалну улогу калијумских канала у том ефекту, с обзиром да су богато заступљени у глатком мишићу утеруса. Обзиром да нема података да ли у механизму деловања пентоксифилина, осим механизма који укључује NO/cGMP, учествују и калијумски канали, испитивали смо његов релаксантни ефект на спонтану ритмичку активност негравидног утеруса пацова, а у другој серији експеримената и на фазну активност проузроковану калцијумом, најпре у присуству различитих концентрација глибенкламида (GLB) (блокатора отварања  $K_{ATP}$

канала), а потом 4-аминопиридина (4AP) (блокатора  $ВК_{Ca}$ ) и тетраетиламонијума (ТЕА) (блокатора волтажно зависних  $Ca^{2+}$  канала).

Када се утеруси са спонтаном ритмичком активношћу претретирају са ТЕА, 4AP и глибенкламидом, концентрацијска зависност релаксације пентоксифилином се задржава (ANOVA, статистички значајан ефекат концентрације пентоксифилина,  $p < 0.001$ ; сл. 8 и 9 АБ), али се статистички значајно мења степен релаксације у зависности од претретмана (ANOVA, статистички значајан ефекат претретмана  $p < 0.001$ , разлике се огледају и у  $ED_{50}$  вредностима и у ефектима поређења сигмоидално моделираних кривих). Претретман глибенкламидом доводи до статистички значајног повећања релаксантног ефекта пентоксифилина (статистички значајно нижа  $ED_{50}$  и другачији нагиб криве исказан преко F-теста, сл. 9АБ), док претретман са 4AP значајно смањује релаксантни ефекат, нарочито у опсегу нижих доза (што је статистички исказано F-тестом; претретман са 4AP не мења релаксантни ефекат највише дозе пентоксифилина).

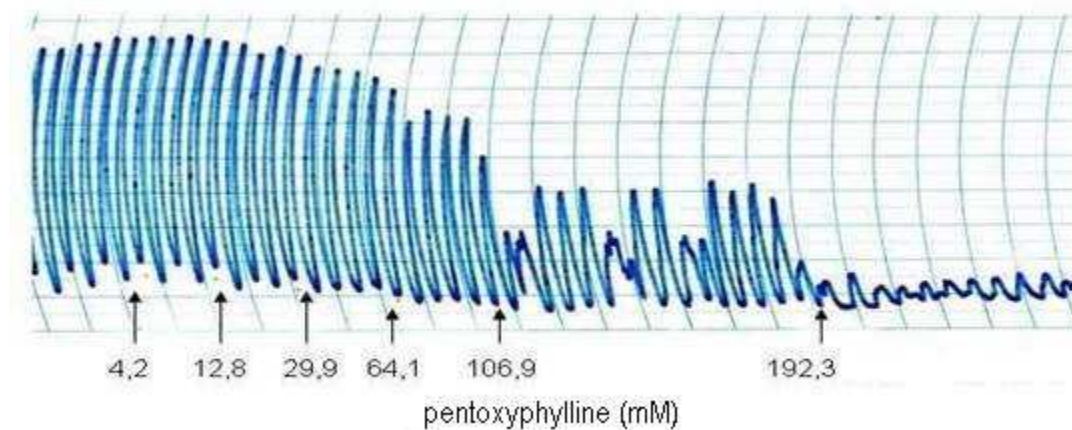


**Слика 8** Релаксантни ефекат пентоксифилина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова претретираног са ТЕА, 4AP и глибенкламидом (GLB). Црна крива означава релаксантни ефекат пентоксифилина у одсуству блокатора калијумских канала; црвена - у присуству ТЕА = ТЕА/Pentoksifilin; зелена са троугловима на горе - у присуству 4-AP = 4AP/Pentoksifilin и плава крива са троугловима на доле -у присуству глибенкламида = Gli/Pentoksifilin. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација.

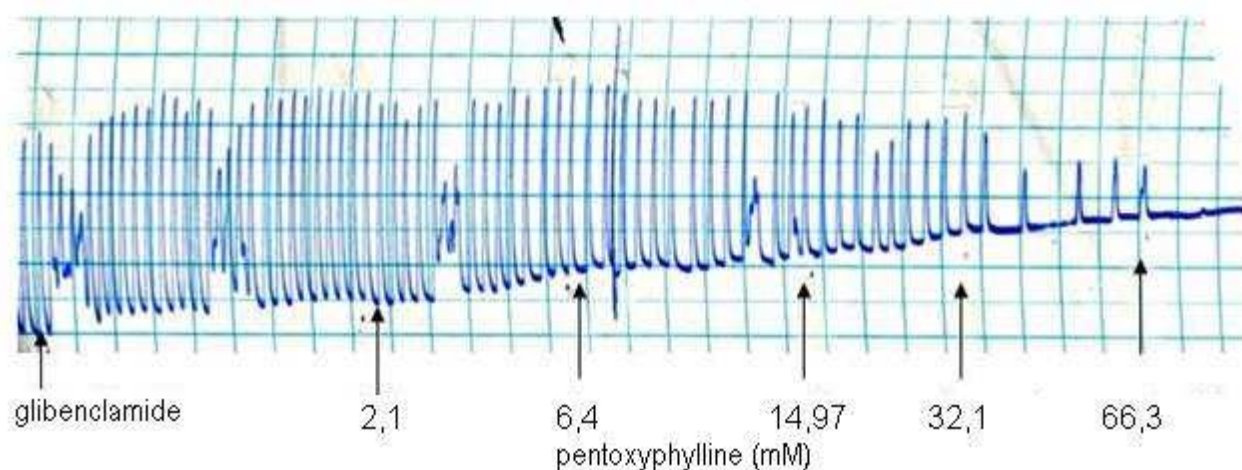


Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом пентоксифилина (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Сигмоидално моделирање криве претретмана са ТЕА није статистички значајно ( $\text{Chi}^2/\text{df}=0.24$ ). Поређење F-тестом је показало постојање статистички значајних разлика међу сигмоидално моделираним кривама.

А



Б

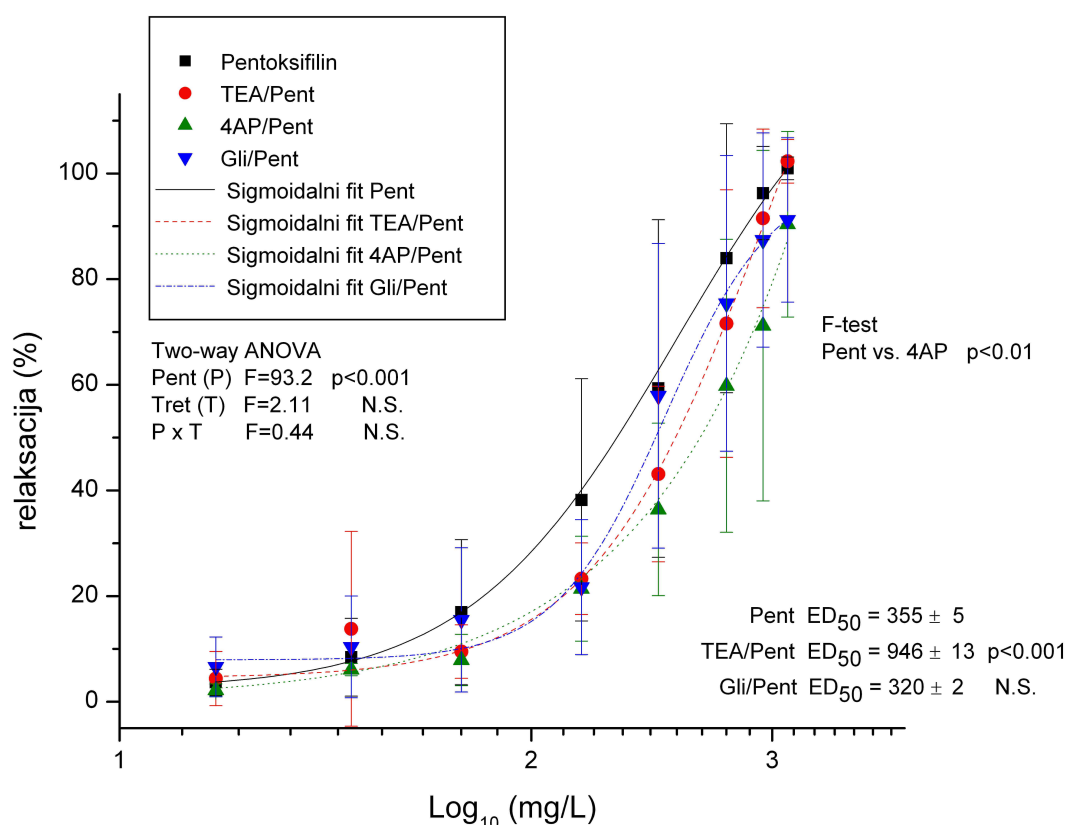


**Слика 9АБ** Оригинални трасеј утицаја растућих концентрација пентоксифилина у одсуству (контролни експеримент, сл. 9А) и присуству глибенкламида у концентрацији од 6  $\mu\text{g}$  (9Б) на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова. Претретман са глибенкламидом, значајно је антагонизовао релаксантни ефект растућих концентрација пентоксифилина ( $p < 0.0001$ ).

### 5. Утицај блокатора калијумских канала (глибенкламида, 4-аминопиридина и тетраетиламонијума) на релаксантни ефект пентоксифилина на контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом

Претретман  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса са ТЕА, 4АР и глибенкламидом, према анализи варијансе, не утиче на степен релаксације изазване пентоксифилином (ANOVA, нема статистички значајног ефекта претретмана; сл. 10). Ипак, када се пореде  $\text{ED}_{50}$  вредности и узме

у обзир поређење кривих F-тестом, показује се да, претретман са ТЕА, смањује релаксантни ефекат пентоксифилина (статистички значајна разлика  $ED_{50}$  вредности у односу на сам пентоксифин), највише због његове ефикасности у нижим дозама. Претретман са 4АР, доводи до смањења релаксантног ефекта у вишим дозама пентоксифилина, тако да се са апликованим дозама пентоксифилина приликом претретмана са 4АР није могао постићи максимални релаксантни ефекат, што доводи и до статистички значајне разлике у нагибу сигмоидалне криве (F-тест;  $p < 0.05$ ).



**Слика 10** Релаксантни ефекат пентоксифилина на  $Ca^{2+}$ - индуковане активне утерусе претретирание са ТЕА, 4АР и глибенкламидом. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом пентоксифилина (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Сигмоидално моделирање криве претретмана са 4АР и глибенкламидом није статистички значајно ( $Chi^2/df=0.2$  и  $0.09$ , респективно).  $ED_{50}$  вредности су поређене Tukey HSD t- тестом и показана је статистички значајна разлика у односу на сам пентоксифин. Поређење F-тестом је показало постојање статистички значајних разлика између сигмоидално моделираних кривих за сам пентоксифин и претретман са 4АР.

### Генерални закључак експеримената са пентоксифилином

Пентоксифин је изазвао концентрацијски-зависну инхибицију спонтане ритмичке активности, као и калцијумом (са  $0.018$  и  $0.36$  mM) индукованих контракција изолованог утеруса пацова. Степен релаксантног дејства пентоксифилина зависио је од типа активације глатког мишића утеруса.

Најснажнији релаксантни ефекат пентоксифилин показује на спонтано активним утерусима (најмања  $ED_{50}$ ), док је веома слаб на утерусима стимулисаним Ach. Релаксантни ефекат је јасно изражен и код  $Ca^{2+}$ -стимулисаних утеруса, са потпуном релаксацијом при највишим употребљеним концентрацијама код утеруса стимулисаних једноструком концентрацијом  $Ca^{2+}$ . Активација двоструком количином калцијума, смањује релаксантни ефекат пентоксифилина, тако да и при највишим употребљеним концентрацијама не долази до потпуне релаксације. У односу на спонтано активне утерусе, релаксантни ефекат пентоксифилина је слабији код  $Ca^{2+}$ -стимулисаних утеруса. За разлику од метиленског плавила, L-аргинин не антагонизује релаксантни ефекат пентоксифилина на контракције изолованог утеруса пацова, осим делимично на спонтану ритмичку активност (не мењајући његов максимални инхибиторни ефекат). Утицај наведених модулатора активности пентоксифилина може да укаже на могући механизам деловања пентоксифилина у глатким мишићним ћелијама утеруса. NO, највероватније није значајније укључен у релаксантни ефекат пентоксифилина, пошто пентоксифилин, у присуству L-аргинина, не доводи до значајније промене степена инхибиције контракција. Обзиром да је у нашим експериментима показано да метиленско плавило антагонизује релаксантно дејство пентоксифилина, може се закључити да је у механизам релаксантног дејства пентоксифилина на глатки мишић утеруса, највероватније, укључен и сигнални пут са cGMP, независан од NO.

У експериментима са испитивањем утицаја блокатора калијумских канала: глибенкламида/GLB (блокатор отварања  $K_{ATP}$  канала), 4-аминопиридина/4AP (блокатор  $VK_{Ca}$ ) и тетраетиламонијума/TEA (блокатор волтажно-зависних  $Ca^{2+}$  канала) на релаксантни ефекат пентоксифилина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом, показали смо да у механизму релаксантног деловања пентоксифилина, калијумски канали, не играју значајну улогу као што је то у случају пинацидила или протамина. Генерално, може се рећи да у релаксантном ефекту пентоксифилина на оба типа активације, отварање  $K_{ATP}$  канала, није од значаја. Претретман глибенкламидом, блокатором  $K_{ATP}$  канала, чак доводи до статистички значајног повећања релаксантног ефекта пентоксифилина (статистички значајно нижа  $ED_{50}$  и другачији нагиб криве исказан преко F-теста), што значи да је ефекат јачи у присуству овог *селективног блокатора  $K_{ATP}$  калијумских канала*. Комплетну инхибицију контракција добили смо и при мањим концентрацијама пентоксифилина. Глибенкламид, као антагонист ове врсте калијумских канала, доводи до продужене деполаризације, спречавајући излазну струју калијума одговорну за реполаризацију ћелијске мембране. С друге стране, претретман са 4AP (блокатор  $VK_{Ca}$ ), значајно смањује релаксантни ефекат пентоксифилина на спонтану ритмичку активност, нарочито у опсегу нижих доза (што је статистички исказано F-тестом), али не мења релаксантни ефекат највише дозе пентоксифилина. На калцијумском типу активације, TEA (блокатор



волтажно зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала) смањује релаксантни ефекат пентоксифилина (статистички значајна разлика  $\text{ED}_{50}$  вредности у односу на сам пентоксифин), највише због његове ефикасности у нижим дозама, док претретман са 4AP, доводи до смањења релаксантног ефекта у вишим концентрацијама пентоксифилина, тако да се, у присуству 4AP, није могао постићи његов максимални релаксантни ефекат (F-тест;  $p < 0.05$ ). На основу изнетог, може се рећи да у механизму релаксантног деловања пентоксифилина није заступљено отварање  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала. Међутим, отварање  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  и волтажно зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала има извешан значај, али у различитом степену, у механизму релаксантног ефекта пентоксифилина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом.

Додатна потврда о доминацији NO пута у механизму релаксантног ефекта пентоксифилина су наши већ описани резултати у присуству ВКК (GLB, TEA и 4AP), у којима смо показали да отварање калијумских канала не игра значајну улогу у механизму његовог деловања, посебно  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канали. Обзиром на чињеницу да релаксантни ефект пентоксифилина зависи и од концентрације калцијума (слабији ако је контрактилна активност изазвана са 0.36 mM у односу на 0.018 mM), може се рећи да и пентоксифин, у извесној мери, делује као калцијумски антагонист. Наши резултати такође указују да би пентоксифин могао да буде потенцијални токолитик. Међутим, за доношење дефинитивног закључка, неопходно је извршити испитивања релаксантног дејства пентоксифилина на утерус у *in vivo* условима, уз праћење евентуалних нежељених ефеката.

## II РЕЗУЛТАТИ

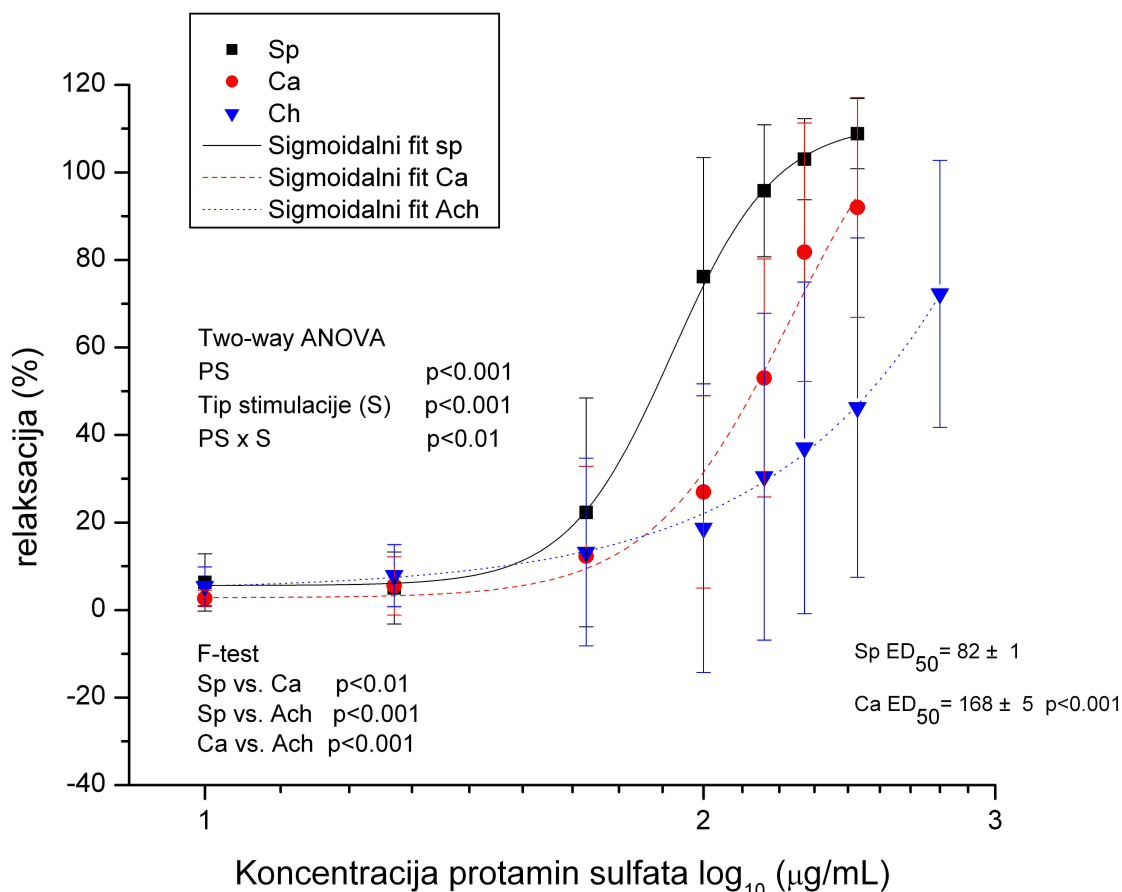
### ПРОТАМИН СУЛФАТ

#### 1. Утицај типа активације утеруса на релаксантни ефекат растућих концентрација протамин-сулфата

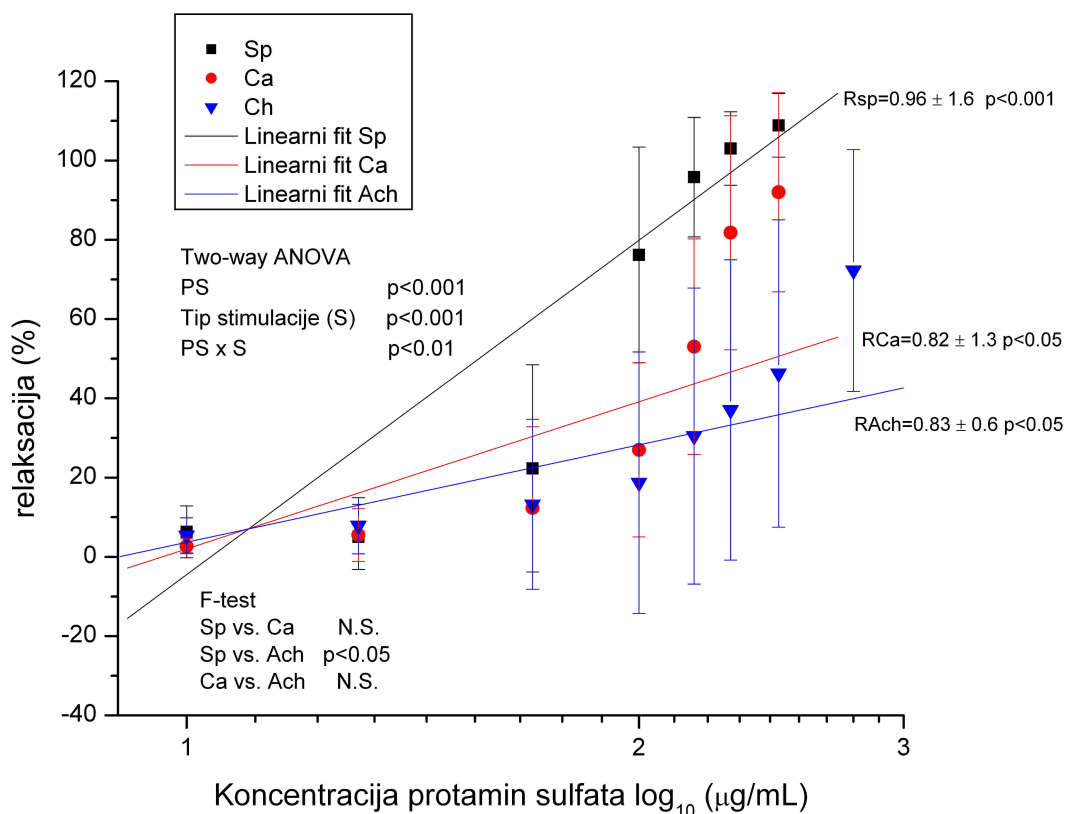
Протамин-сулфат (PS), који је мешавина полиамина, а користи се како би поништио антикоагулантни ефекат хепарина, често проузрокује вазодилатацију и системску хипотензију као нежељени ефект. Откривено је да протамин-сулфат испољава значајан ендотел зависни релаксантни ефекат на изолованим крвним судовима, те је стога циљ наших ранијих експеримената са овом супстанцијом био да се испита механизам релаксантног ефекта протамин-сулфата на изолованим реналним и мезентеричним артеријама узетим од нормотензивних и хипертензивних пацова. Показано је да протамин-сулфат проузрокује концентрацијски и ендотел зависну релаксацију изолованих реналних и мезентеричних артерија нормотензивних и хипертензивних пацова који су преконтраховани фенилефрином ( $10^{-6}$  mol), а очуваност васкуларног ендотела је потврђивана ацетилхолином ( $10^{-5}$  mol) и хистопатолошким испитивањем. Разлог за овакав ефекат протамина је, вероватно, његово стимулативно деловање на ослобађање NO, што може бити главни разлог системске хипотензије која се јавља током инфузије протамина. Ово се дешава такође захваљујући активацији ендотелне NO-синтазе. Горе описани резултати су били изазов да у нашим експериментима (у оквиру ове докторске тезе) испитамо, да ли је протамин-сулфат у стању да релаксира и друге глатке мишиће, укључујући и утерус, као и да проучимо механизам његовог релаксантног деловања на овом глатком мишићу, односно да утврдимо његов токолитички потенцијал, посебно у односу на пентоксифилин и пинацидил. Због тога смо у овој првој серији експеримената испитивали утицај различитих типова активације изолованог утеруса пацова (спонтана ритмичка активност и контракције изазване електричном стимулацијом, ацетилхолином и калцијумом) на релаксантни ефекат растућих концентрација протамин-сулфата.

Утврдили смо да растуће концентрације PS ( $\mu\text{g/ml}$ : 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 600) имају концентрацијски зависан релаксирајући ефекат на утерус пацова. Показало се да у нижим концентрацијама ( $\mu\text{g/ml}$ : 10, 20) нема скоро никакав ефекат, док у већим изазива потпуну релаксацију. Релаксантни ефект протамин-сулфата је био јаче изражен на спонтаној ритмичкој активности него на контракцијама изолованог утеруса проузрокованим калцијумом. Најслабији релаксантни ефект, протамин сулфат је испољио на контракције проузроковане ацетилхолином (сл. 11).

Протамин-сулфат (PS) је концентрацијски зависно релаксирао препарате који су испољавали спонтану ритмичку активност, али и фазну активност индуковану калцијумом ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и ацетилхолином (ACh) (ANOVA, ефекат концентрације протамин-сулфата,  $p < 0.001$ ; сл. 11). Тип стимулације утиче на степен релаксације (ANOVA, ефекат типа стимулације  $p < 0.001$ ): најјачи релаксантни ефекат PS показује на спонтано активним утерусима, док је у опсегу коришћених концентрација релативно слаб на контракције утеруса индуковане ACh, код којих највиша концентрација од  $600 \mu\text{g/mL}$  не доводи до потпуне релаксације (испод 50%). Овакав ефекат је јасан и када се упореде  $\text{ED}_{50}$  вредности:  $\text{ED}_{50}$  дозе релаксације протамин-сулфата за спонтани и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуковани тип активације се статистички значајно разликују ( $p < 0.001$ ). За ACh-индуковане утерусе није израчуната  $\text{ED}_{50}$  вредност због недостатка података о концентрацијама које показују максималан релаксантни ефекат (више од 80% за опсег апликованих доза). Поређење кривих је рађено F-тестом и тест показује да се све криве међусобно статистички значајно разликују. Релаксантни ефекат PS на утерусе се може описати и линеарном регресијом и то статистички значајно за све третмане (сл. 12). Поређење F-тестом је показало да се нагиб регресионе праве за спонтано-активне утерусе статистички значајно разликује ( $p < 0.05$ ) од израчунатог за ACh-индуковане утерусе, указујући да је за спонтано активне утерусе за релаксацију потребна много нижа доза.



**Слика 11** Релаксанти ефекат протамин-сулфата на различите типове активације изолованог утеруса (црна крива=спонтана ритмичка активност/Sp; црвена крива=контракције изазване калцијумом/ $\text{Ca}^{2+}$ ; плава крива=контракције изазване ацетилхолином/Ach). Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација ( $n=22$ , осим за Ach-индуковане утерусе код којих је  $n=8$ ). Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и типом стимулације (S) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу. Код спонтано и Ach-индукованих типова активације утеруса сигмоидални фит је статистички значајан ( $\text{Chi}^2/\text{dF} < 0.01$ ). На графику су дате и  $ED_{50}$  вредности израчунате из сигмоидалних кривих, осим за Ach-индуковане утерусе за које није израчуната  $ED_{50}$  вредност због недостатка података о концентрацијама које показују максималан релаксанти ефекат (више од 80% за опсег апликованих доза).  $ED_{50}$  дозе релаксације протамин-сулфата за спонтани и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуковани тип активације се статистички значајно разликују ( $p < 0.001$ ). Поређење кривих је рађено F-тестом и све криве се међусобно статистички значајно разликују.

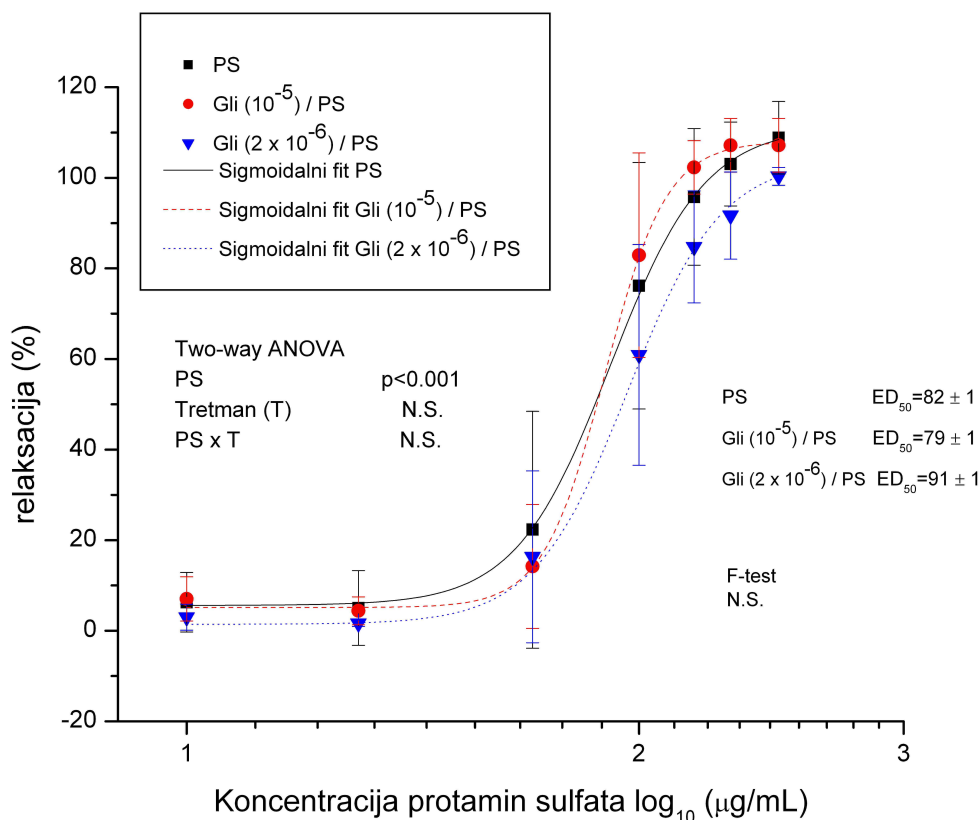


**Слика 12** Релаксантни ефекат протамин-сулфата на различите типове активације изолованог утеруса (црна крива=спонтана ритмичка активност/Sp; црвена крива=контракције изазване калцијумом/ $\text{Ca}^{2+}$ ; плава крива=контракције изазване ацетилхлином/Ach). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација (n=22, осим за Ach-индуковане утерусе код којих је n=8). Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом PS и врстом стимулације (S) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (P) ± SD и статистичка значајност модела) и поређене F-тестом. Поређење F-тестом је показало да се нагиб регресионе праве за спонтано-активне утерусе статистички значајно разликује.

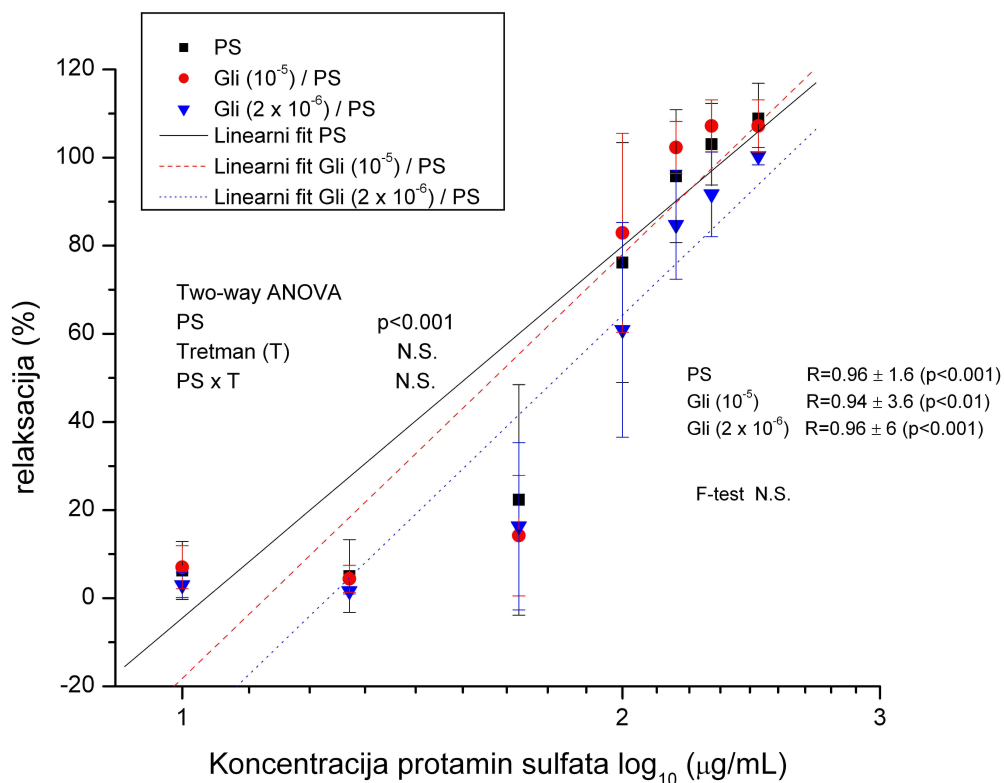
## 2. Утицај протамин-сулфата на контракције изолованог утеруса у присуству блокатора калијумских канала

### 2.1. Утицај претретмана глибенкламидом на релаксацију спонтано активних утеруса изазвану растућим концентрацијама протамин-сулфата

Претретман спонтано активних утеруса са глибенкламидом ( $10^{-5}$  и  $2 \times 10^{-6}$  M), не мења концентрацијски зависну релаксацију изазвану протамин-сулфатом (нема ефекта третмана ANOVA, сл. 13 и 14). Осим тога, ни сигмоидално фитоване криве (сл. 13), ни праве регресије (сл. 14) (тестиране обе F-тестом), а ни ED<sub>50</sub> вредности (тестирани једнофакторском анализом варијансе и post-hoc Tukey s- тестом, сл. 13) се не разликују међусобно.



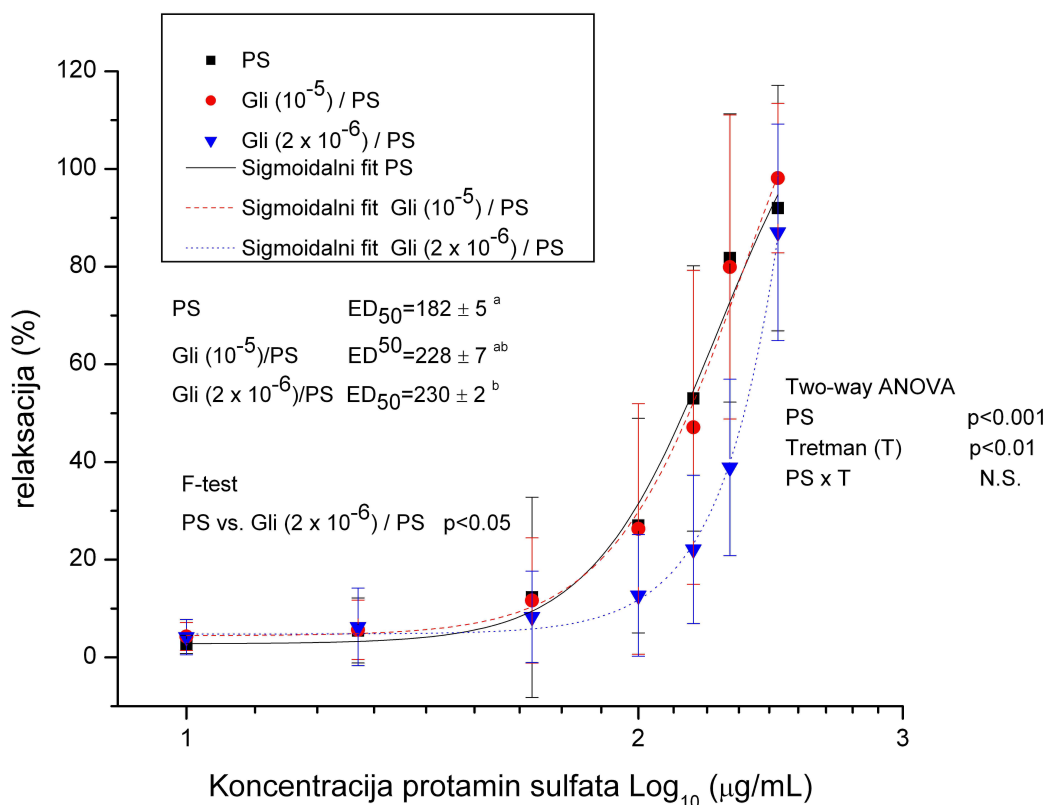
**Слика 13** Концентрацијски зависне криве приказују дејство PS у присуству (црвена и плава крива) и одсуству глибенкламида (црна крива) на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова. Релаксантни ефекат протамин-сулфата на спонтано активне утерусе претретмане са глибенкламидом ( $10^{-5}$ , црвена крива и  $2 \times 10^{-6}$  M, плава крива). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Сигмоидално моделирање кривих претретмана са две дозе глибенкламида није статистички значајно ( $\text{Chi}^2/\text{df}=0.0828$  и  $0.135$ ). Поређење F-тестом није показало постојање статистички значајних разлика међу сигмоидално моделираним кривама. ED<sub>50</sub> вредности су израчунате из сигмоидалних кривих, али између њих није било статистички значајних разлика тестираних једнофакторском анализом варијансе (ANOVA).



**Слика 14** Релаксантни ефекат протамин-сулфата на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова у присуству глибенкламида ( $10^{-5}$  и  $2 \times 10^{-6}$  М). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (R) ± SD и статистичка значајност модела) и поређене F-тестом.

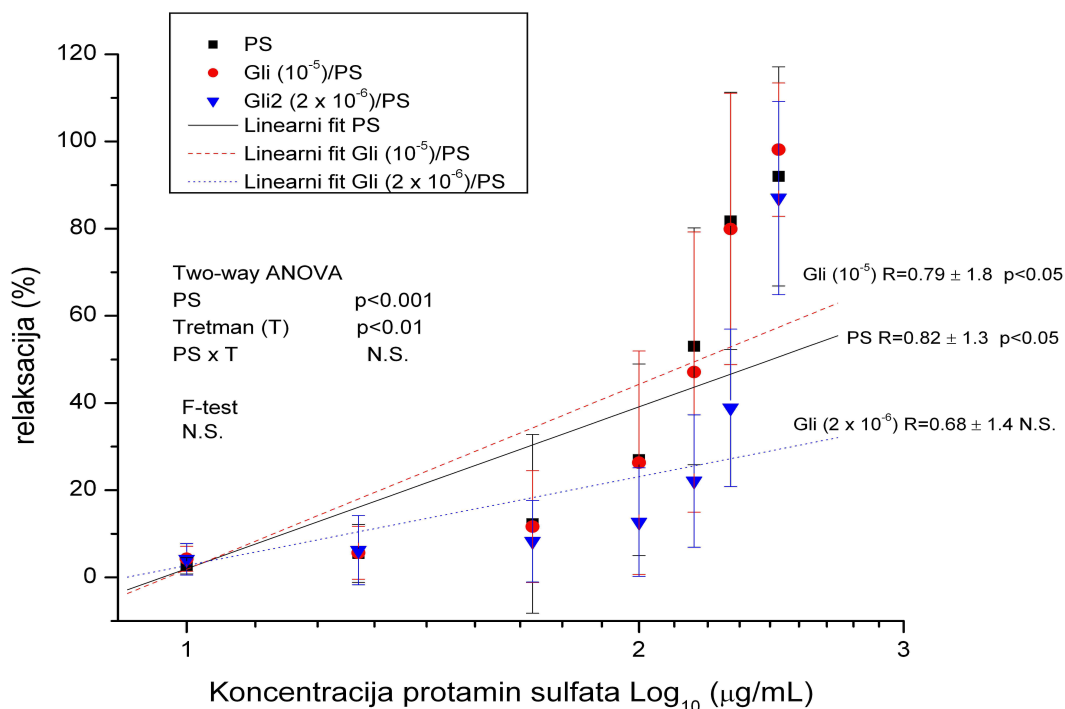
## 2.2. Утицај претретмана глибенкламидом на релаксантни ефект протамин-сулфата на $Ca^{2+}$ -индукованом типу активације утеруса

Концентрацијски зависне криве приказују дејство PS у присуству и одсуству глибенкламида на  $Ca^{2+}$ -индуковану активност изолованог утеруса пацова. Претретман са глибенкламидом у дози од  $2 \times 10^{-6}$  М, на  $Ca^{2+}$ -индукованом типу активације утеруса проузроковао је смањење релаксантног ефекта протамин-сулфата, док, претретман са глибенкламидом у концентрацији од  $10^{-5}$  М, није имао статистички значајан ефекат на релаксантни ефект протамин-сулфата (статистички значајан ефекат третмана у ANOVA, сл. 15, 16, 17; статистички значајна разлика у  $ED_{50}$  вредности за утерусе претретмане са глибенкламидом у концентрацији  $2 \times 10^{-6}$  М, сл. 15). Код  $Ca^{2+}$ -индукованих активних утеруса, екстраполација података у сигмоидални фит је статистички значајна ( $\chi^2/df < 0.05$ ; сл. 15), док је регресиони на ивици значајности ( $p < 0.05$ ; сл. 16). Осим тога, поређење F-тестом је код сигмоидалног начина екстраполације показало статистички значајну различитост криви релаксације између самог протамин-сулфата и претретмана са глибенкламидом дозе  $2 \times 10^{-6}$  М, док је такав ефекат код регресионог модела изостао.



**Слика 15** Концентрацијски зависне криве приказују дејство PS у присуству (црвена и плава крива) и одсуству глибенкламида на  $\text{Ca}^{2+}$ - типу активације. Релаксанти ефекат протамин-сулфата на  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованом типу активације изолованог утеруса пацова у присуству глибенкламида ( $10^{-5}$ , црвена крива и  $2 \times 10^{-6}$  M, плава крива). Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Сигмоидално моделирање кривих претретмана са две дозе глибенкламида је статистички значајно ( $\text{Chi}^2/\text{df} < 0.05$ ). Поређење F-тестом је показало постојање статистички значајних разлика између сигмоидално моделираних кривих за ефекат претретмана глибенкламидом дозом  $2 \times 10^{-6}$  M.  $ED_{50}$  вредности израчунате из сигмоидалних кривих су поређене једнофакторском анализом варијансе ANOVA и post hoc Tukey t- тестом (различита слова у индексу показују на статистички значајну разлику са прагом  $p < 0.05$ ).



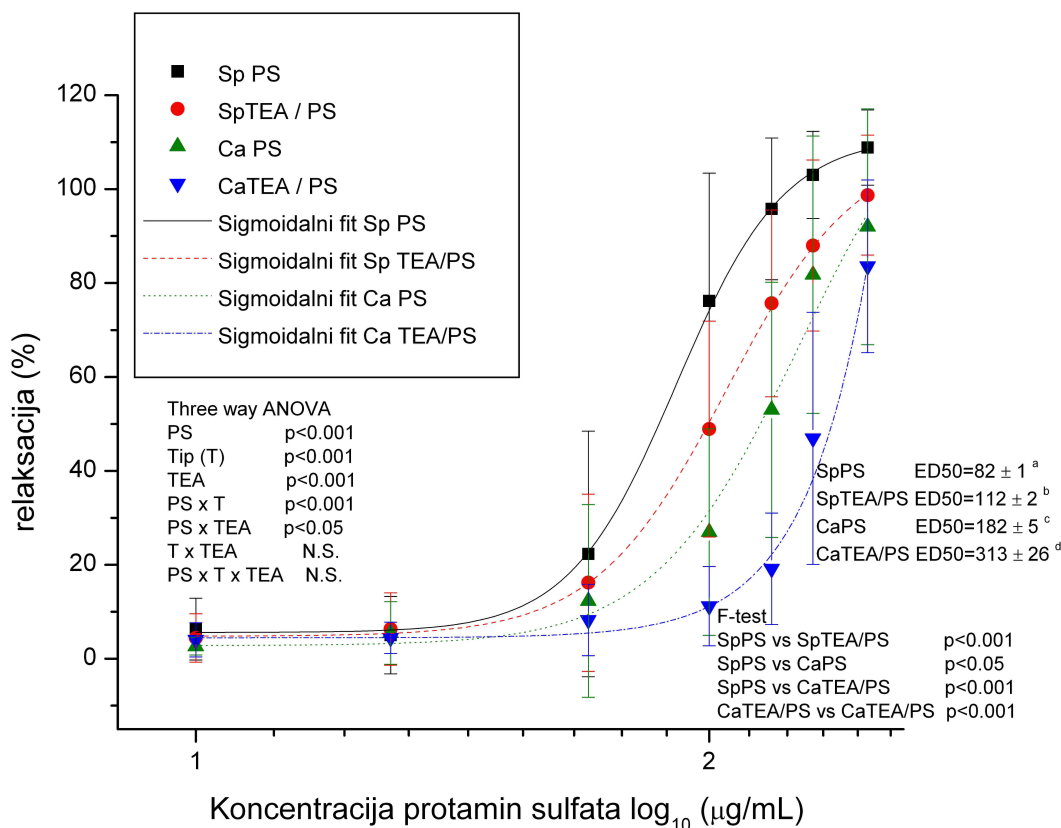


**Слика 16** Релаксантни ефекат протамин-сулфата на  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованом типу активације изолованог утеруса пацова у присуству глибенкламида ( $10^{-5}$  и  $2 \times 10^{-6}$  М). Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (R)  $\pm$  SD и статистичка значајност модела) и поређене F-тестом.

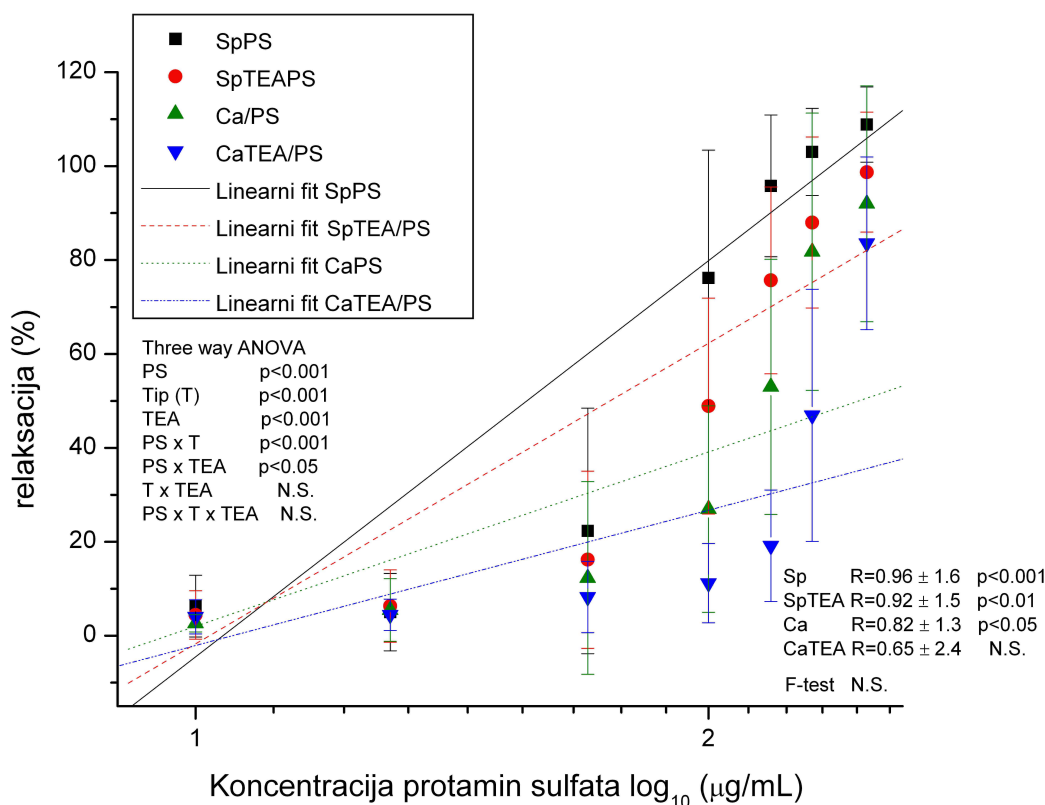
### 3. Утицај претретмана тетра-етил-амонијумом (TEA) на релаксантни ефекат протамин-сулфата на спонтани и $\text{Ca}^{2+}$ -индуковани тип активације изолованог утеруса

Претретман са ТЕА ( $6 \times 10^{-3}$  М), доводи до статистички значајног смањења релаксантног ефекта протамин-сулфата и код спонтано и код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса (статистички значајан ефекат третмана (ТЕА) у трофакторској ANOVA,  $p < 0.001$ ; сл. 17 и 18). Утицај ТЕА је већи код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса, што се види из статистички значајног ефекта интеракције PS x T у ANOVA. Исти тренд показује и анализа  $\text{ED}_{50}$  вредности (статистички значајно виша  $\text{ED}_{50}$  је за дозу протамин-сулфата код ТЕА претретираних утеруса у односу на сам протамин-сулфат, с тим што је повећање  $\text{ED}_{50}$  много више код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса), као и тестирање сличности сигмоидално фитованих кривих F-тестом (значајно се разликују криве за PS релаксацију спонтано активних утеруса у односу на претретирани са ТЕА, као и  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих и релаксираних са PS у односу на претретирани са ТЕА) (сл. 17). Сигмоидални фит за криве релаксације спонтано активних утеруса је статистички значајан и за претретман утеруса са ТЕА ( $\text{Chi}^2/\text{DoF} < 0.01$ ). Код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих утеруса, сигмоидални фит релаксације није добар ни у случају претретмана са ТЕА

( $\text{Chi}^2/\text{dF}=0.1056$ ), те је урађена и регресиона анализа (сл. 18). Регресиона анализа је статистички значајна код релаксације спонтано активних утеруса третираних растућим концентрацијама протамин-сулфата, док је слабо или незначајна код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих. Претретман са ТЕА, доводи до смањења нагиба и тежи вишим потребним концентрацијама протамин-сулфата за релаксацију, али F-тест није показао значајне разлике између кривих.



**Слика 17** Релаксантни ефекат протамин-сулфата на спонтано (Sp PS=контролна крива) и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуковане активне утерусе (Ca PS= контролна крива) претретиране са ТЕА=SpTEA / PS и CaTEA /PS ( $6 \times 10^{-3}$  M). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана трофакторском анализом варијансе (three-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS), типом активације (T) и претретманом ТЕА (TEA) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Сигмоидално моделирање кривих  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса није статистички значајно ( $\text{Chi}^2/\text{df}= 0.098$  и  $0.106$ ). Поређење F-тестом је показало постојање статистички значајних разлика међу сигмоидално моделираним кривама и само оне су дате на графику. ED<sub>50</sub> вредности су израчунате из сигмоидалних кривих и између њих је било статистички значајних разлика тестираних једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) и post hoc Tukey t- тестом (различита слова у индексу показују на статистички значајну разлику са прагом p<0.05).

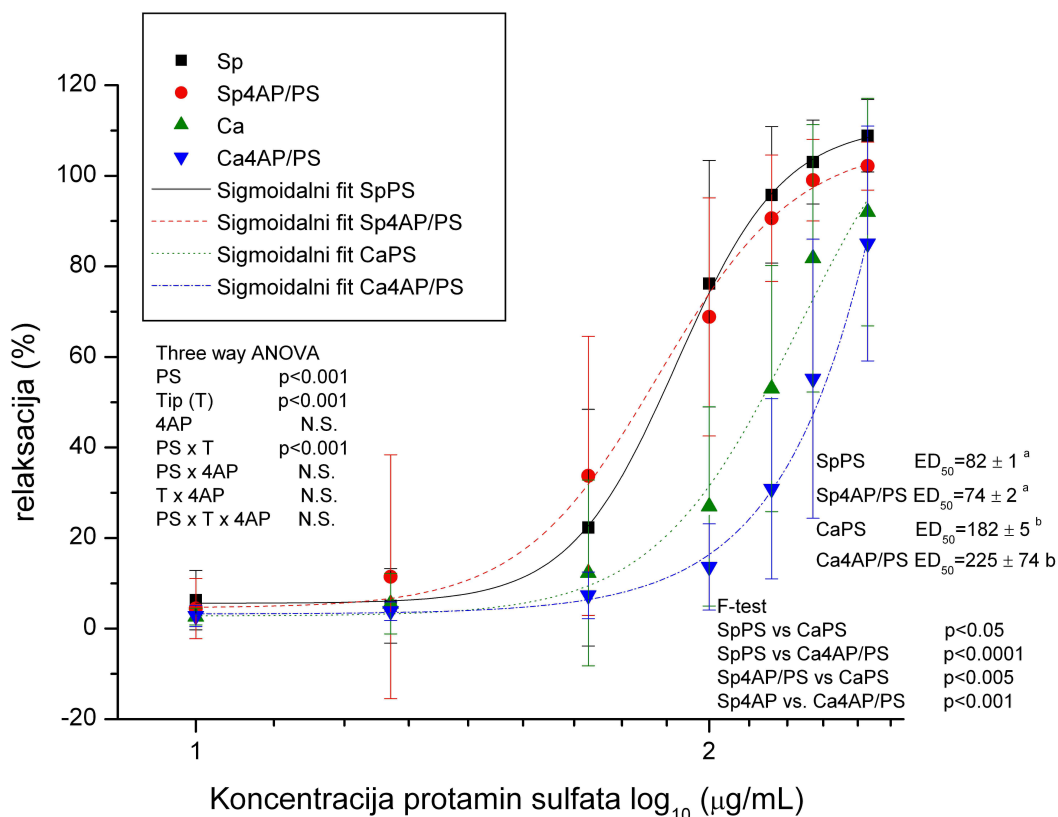


**Слика 18** Релаксантни ефекат протамин-сулфата на спонтано и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуковане активне утерусе претретиране са TEA ( $6 \times 10^{-3}$  M). Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана трофакторском анализом варијансе (three-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS), типом активације (T) и претретманом TEA (TEA) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (R)  $\pm$  SD и статистичка значајност модела) и поређене F-тестом.

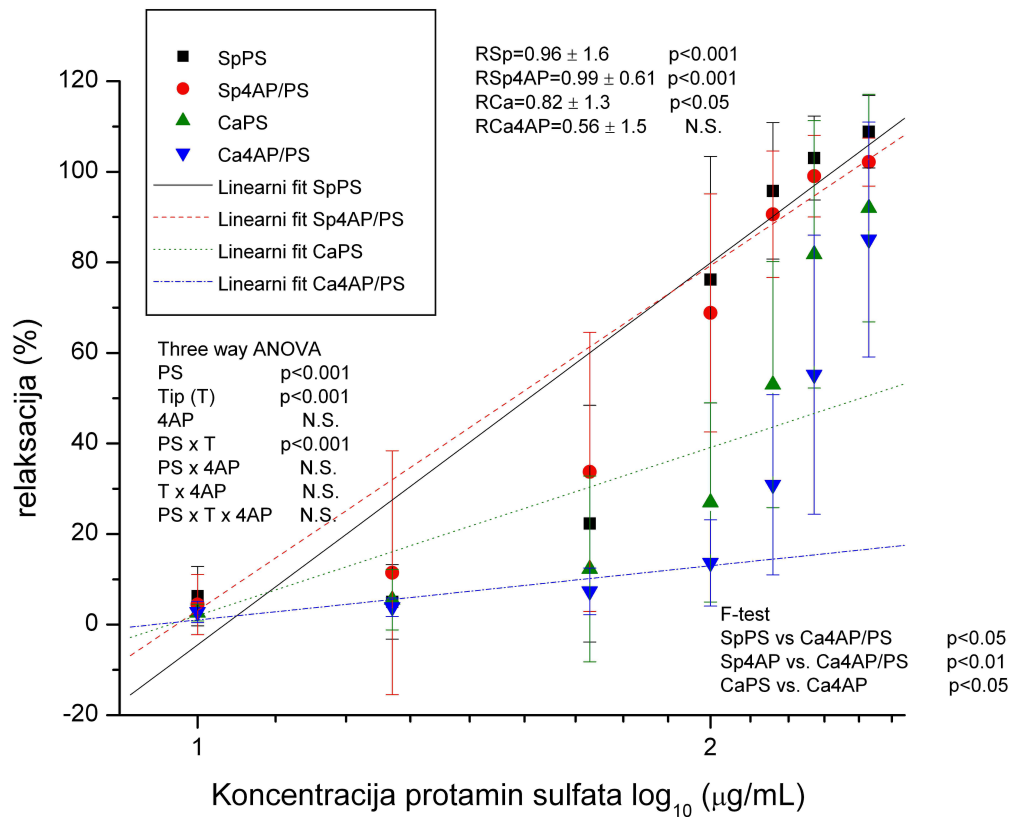
**4. Утицај претретмана 4-амино-пиридином (4AP) на релаксантни ефекат протамин-сулфата на спонтани и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуковани тип активације изолованог утеруса пацова**

Претретман са 4AP, није имао утицај на концентрацијски зависну релаксацију посредовану протамин-сулфатом на спонтаној ритмичкој активности изолованог утеруса (непостојање статистички значајних ефеката третмана у трофакторској анализи варијансе, сл. 19, 20). Претретман 4AP, код  $\text{Ca}^{2+}$ -типа активације изолованог утеруса делимично је антагонизовао релаксацију изазвану протамин-сулфатом, али ефекат није статистички значајан (непостојање статистичке значајности ефекта третмана, нити интеракције T x PS у трофакторској ANOVA, као ни статистичке значајности разлике у ED<sub>50</sub> вредностима код сигмоидалног фитовања ни разлике сигмоидалних кривих тестираних F-тестом, сл. 19). Као и у ранијим експериментима, релаксантни ефекат PS код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса се не може добро екстраполирати сигмоидалним начином и криве које се добију нису као модел статистички значајне (због недостатка потпуне релаксације на највишим употребљеним концентрацијама PS у овом експерименту). Стога, ни разлике у ED<sub>50</sub> вредностима протамин-сулфата, са и без претретмана са 4AP, код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса, услед велике грешке, и не дају статистички значајну различитост међу собом (сл. 19). Поређење сигмоидалних кривих F-тестом је само потврдило различитост релаксантног ефекта протамин-сулфата код спонтаних и  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих утеруса, али без значајног ефекта претретмана са 4AP. Екстраполација регресионом анализом (сл. 19) само потврђује горе наведене закључке:

модел је значајан само код спонтано активних утеруса, али без ефекта претретмана са 4AP на концентрацијски зависну релаксацију индуковану протамин-сулфатом. Ефекат постоји код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса, али је на ивици статистичке значајности ( $p < 0.05$ ), као смањење нагиба код регресионих правих услед релативно велике грешке.



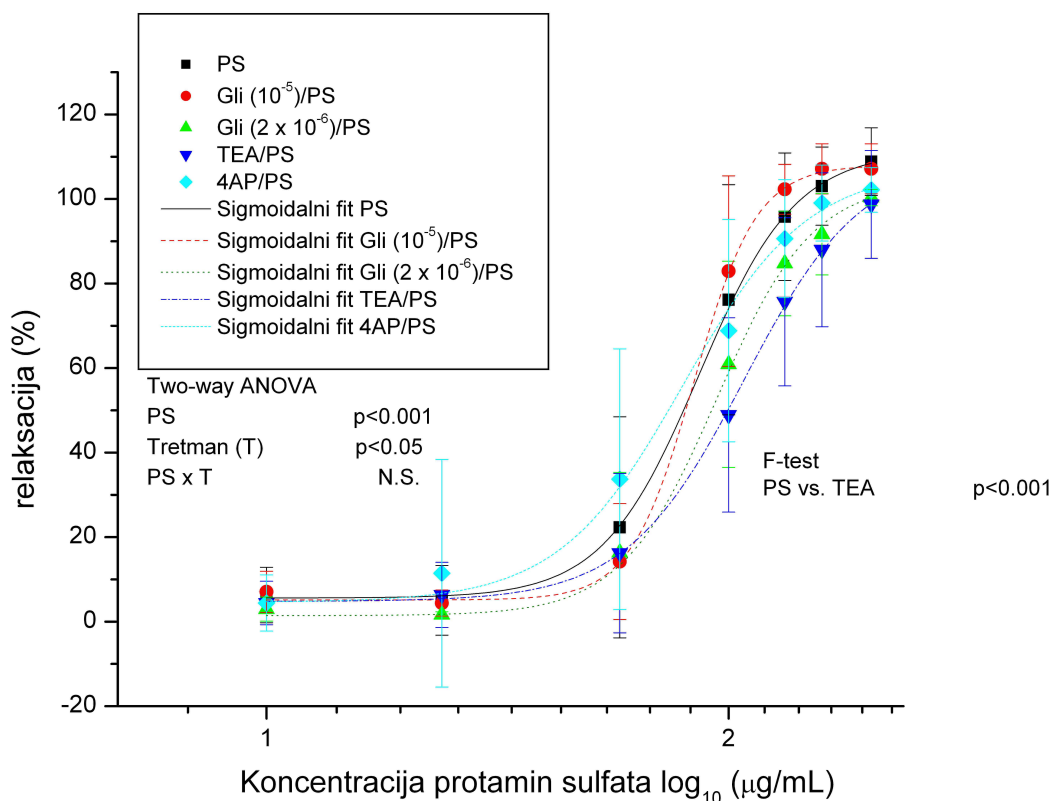
**Слика 19** Релаксантни ефекат протамин-сулфата на спонтано (Sp= црна контролна крива) и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуковане активне утерусе (Ca контролна зелена крива) претретирани са 4AP ( $10^{-3}$  M) (Sp4AP/PS=црвена крива и Ca4AP/PS= плава крива). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана трофакторском анализом варијансе (three-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS), типом активације (T) и претретманом 4AP (4AP) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Сигмоидално моделирање кривих  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса није статистички значајно ( $\text{Chi}^2/\text{df} = 0.098$  и  $0.082$ ). Поређење F-тестом је показало постојање статистички значајних разлика међу сигмоидално моделираним кривама и само оне су дате на графику. ED<sub>50</sub> вредности су израчунате из сигмоидалних кривих и између њих је било статистички значајних разлика тестираних једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) и post hoc Tukey t- тестом (различита слова у индексу показују на статистички значајну разлику са прагом  $p < 0.05$ ).



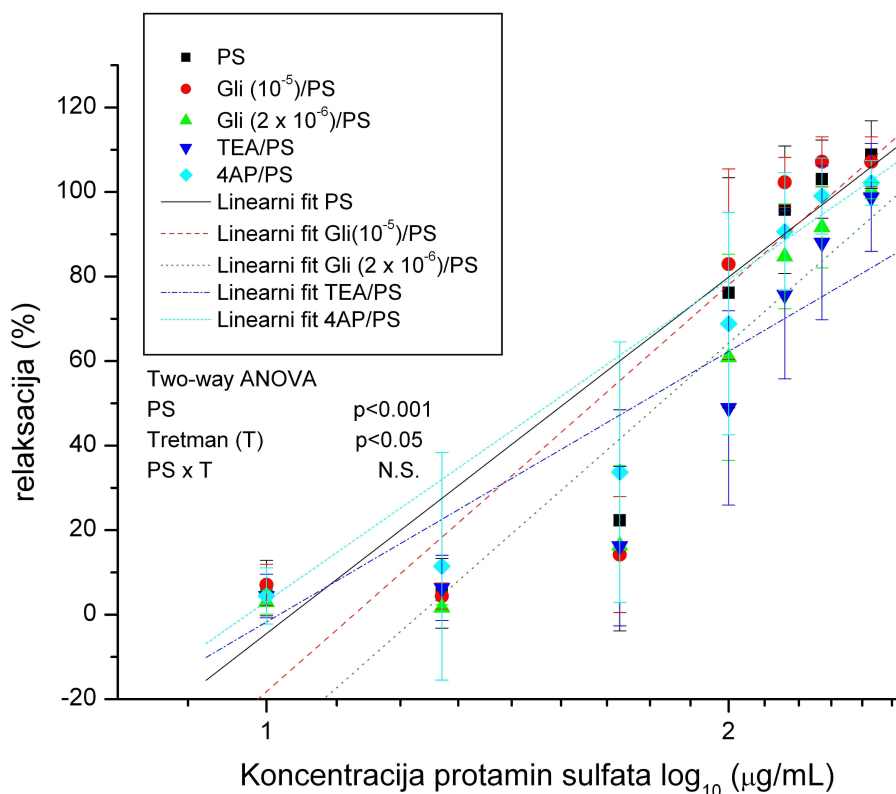
**Слика 20** Релаксантни ефекат протамин-сулфата на спонтано и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуковане активне утерусе претретирани са 4AP ( $10^{-3}$  M). Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана трофакторском анализом варијансе (three-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS), типом активације (T) и претретманом 4AP (4AP) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (R)  $\pm$  SD и статистичка значајност модела) и поређене F-тестом.

### 5. Утицај протамин-сулфата на спонтане контракције изолованог утеруса у присуству блокатора калијумских канала (GLB, TEA и 4-AP)

На сликама 21 и 22 су приказани, збирно, ефекти свих претретмана на концентрацијски зависну релаксацију посредовану растућим концентрацијама протамин-сулфата код спонтано активних утеруса, екстраполирани и преко сигмоидалног и преко регресионог начина. И на овом приказу се показује да, само претретман са TEA, делимично антагонизује релаксантни ефекат протамин-сулфата.



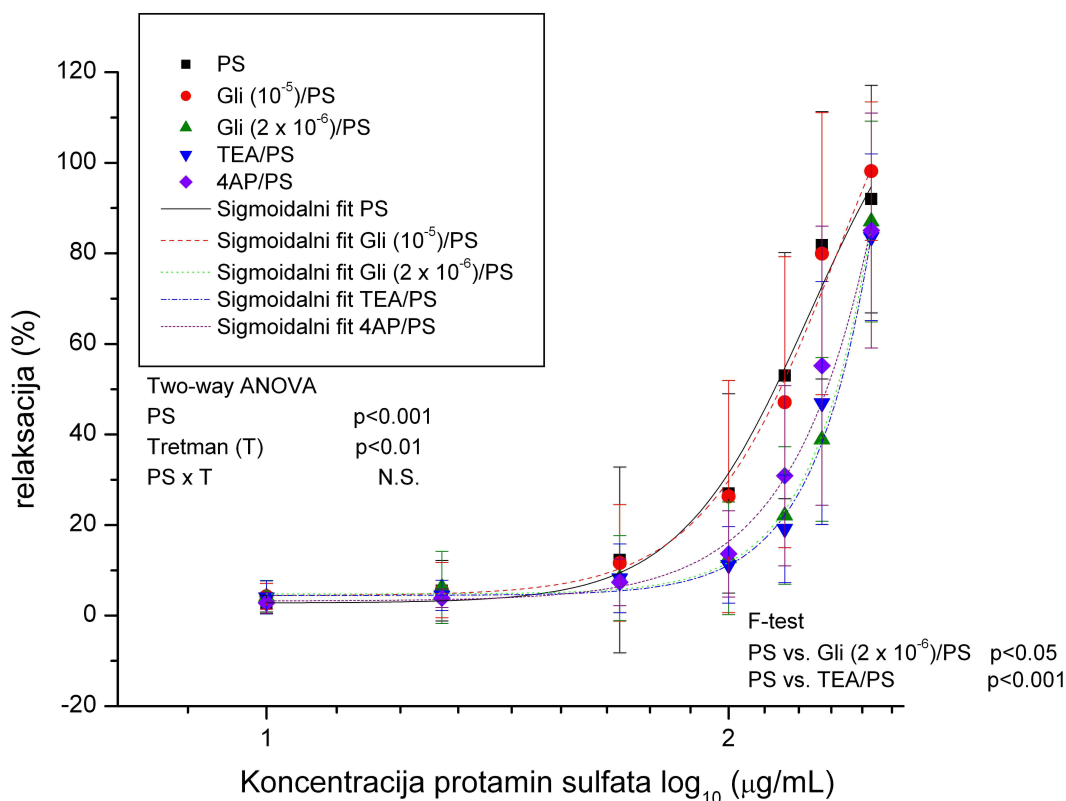
**Слика 21** Утицај различитих претретмана на релаксацију посредовану растућим концентрацијама протамин-сулфата спонтано активних утеруса. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и претретманом (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом (приказане су само статистички значајно различите разлике у односу на ефекат протамин-сулфата). Подаци о појединачним ефектима су дати на претходним сликама.



**Слика 22** Релаксантни ефекат протамин-сулфата на различито претретираним спонтано активним утерусима. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и претретманом (T) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу и поређене F-тестом. Подаци о појединачним ефектима су дати на претходним сликама.

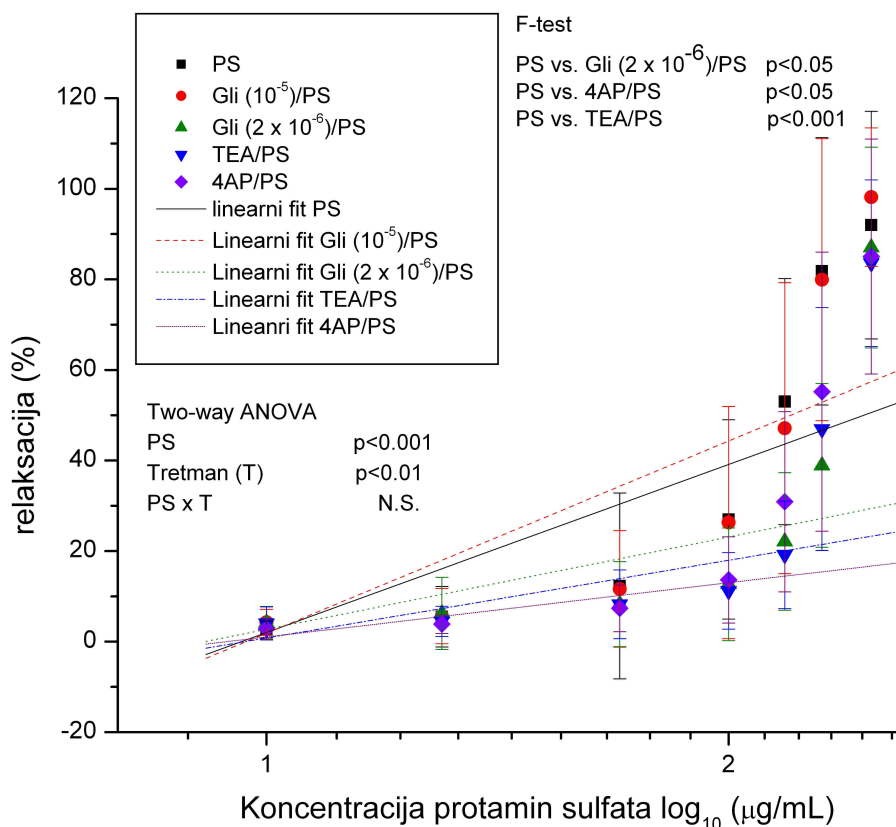
### 6. Утицај протамин-сулфата на контракције изолованог утеруса индуковане $Ca^{2+}$ у присуству блокатора калијумских канала (GLB, TEA и 4-AP)

На сликама 23 и 24 су приказани, збирно, ефекти свих претретмана на концентрацијски зависну релаксацију посредовану растућим концентрацијама протамин-сулфата код  $Ca^{2+}$ -индукованог типа активације утеруса, екстраполирани и преко сигмоидалног и преко регресионог начина. И на овом приказу се показује да, само претретман са TEA, а глибенкламид ( $2 \times 10^{-6}M$ ) и 4AP само делимично (што зависи од начина обраде резултата), антагонизују релаксантни ефекат протамин-сулфата.



**Слика 23** Утицај претретмана са различитим ВКК (GLB, TEA и 4-AP) на релаксацију посредовану растућим концентрацијама протамин-сулфата на контракције изолованог утеруса индуковане  $Ca^{2+}$ . Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и претретманом (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом (приказане су само статистички значајно различите разлике у односу на ефекат протамин-сулфата). Подаци о појединачним ефектима су дати на претходним сликама.

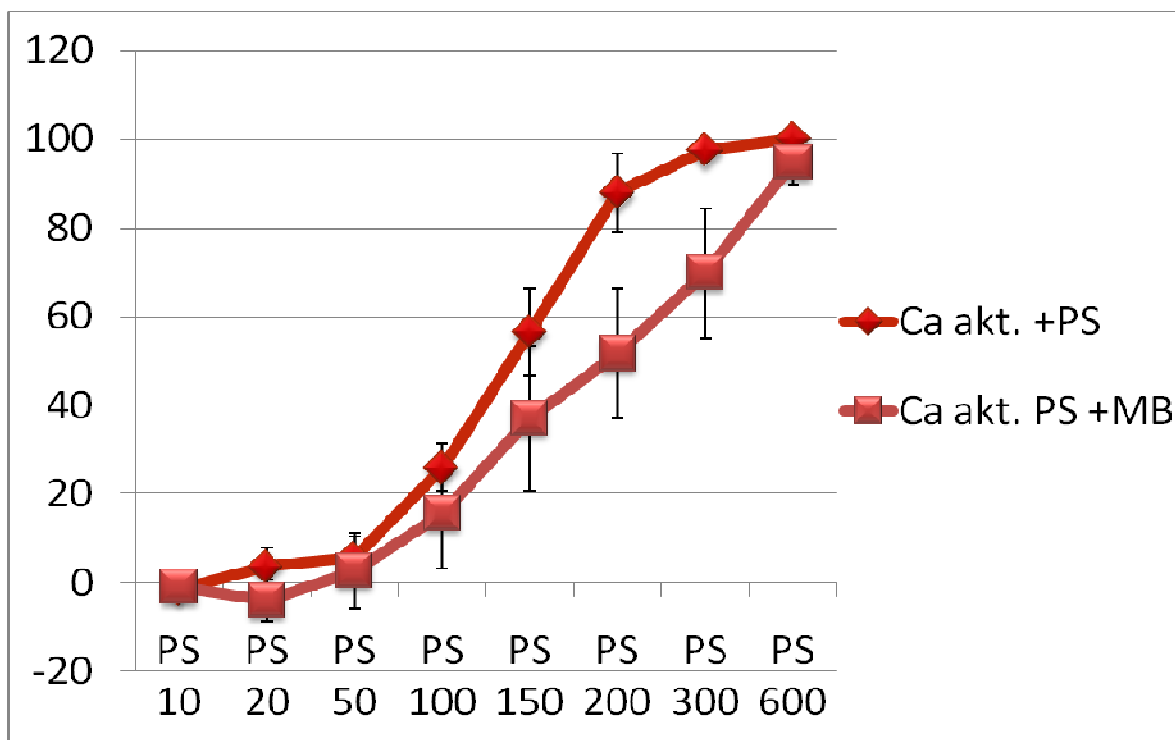




**Слика 24** Релаксантни ефекат протамин-сулфата у присуству различитих ВКК (GLB, ТЕА и 4-АП) на Ca<sup>2+</sup>-типу активације утеруса. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и претретманом (T) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу и поређене F-тестом. Подаци о појединачним ефектима су дати на претходним сликама.

### 7. Утицај претретмана метиленским плавим (МВ) на релаксантни ефекат растућих концентрација протамин-сулфата

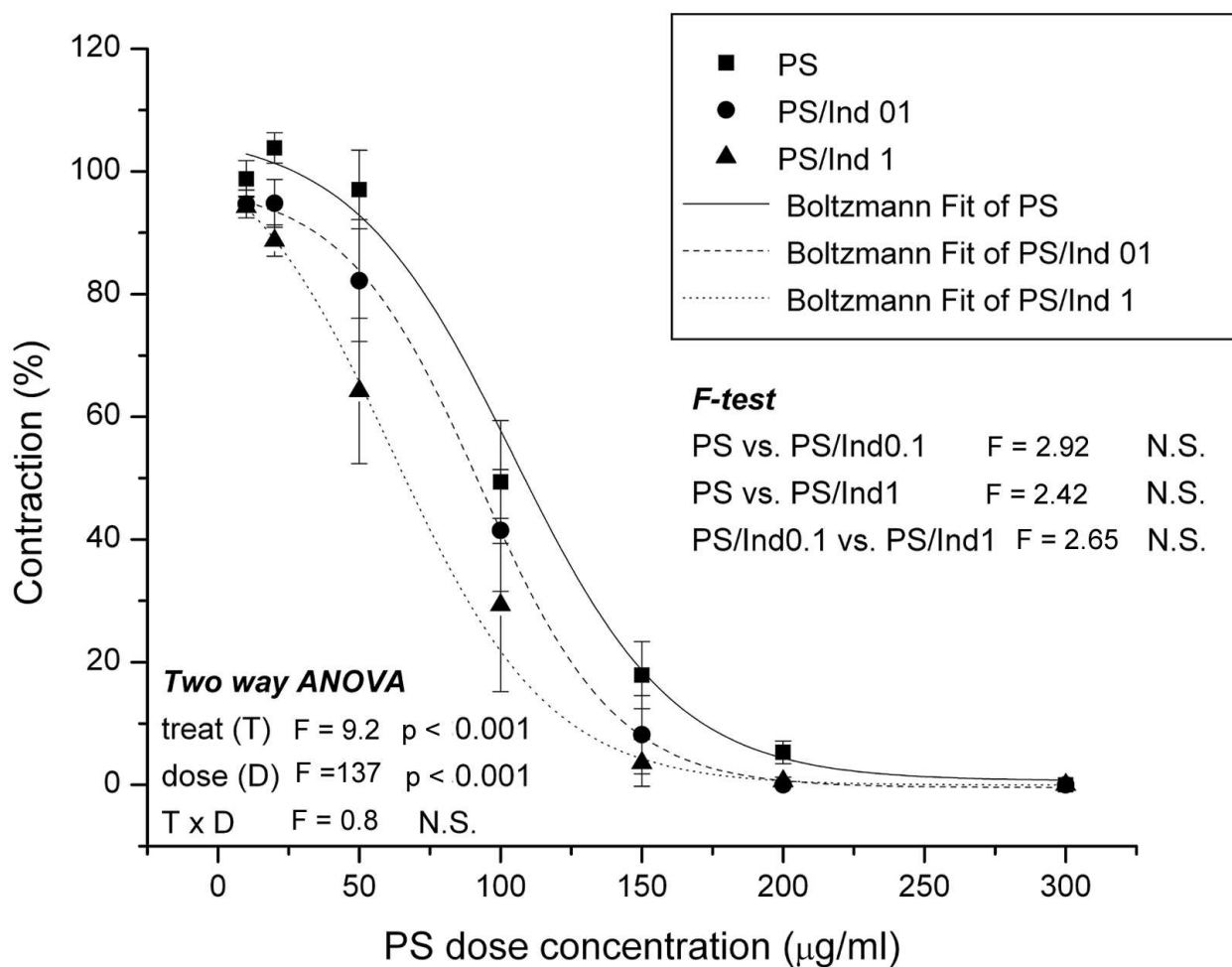
**Метиленско плавило**, као што смо напоменули, спречавањем интеракције NO са гванилатном циклазом, **инхибира синтезу cGMP**. Резултати наших експеримената показују да метиленско плавило смањује релаксантни ефекат протамин-сулфата. Ни највиша примењена концентрација протамин-сулфата није довела до потпуног престанка контракција (сл. 25). Претретман са метиленским плавилем, значајно антагонизује релаксантни ефект растућих концентрација протамин-сулфата (p<0.001).



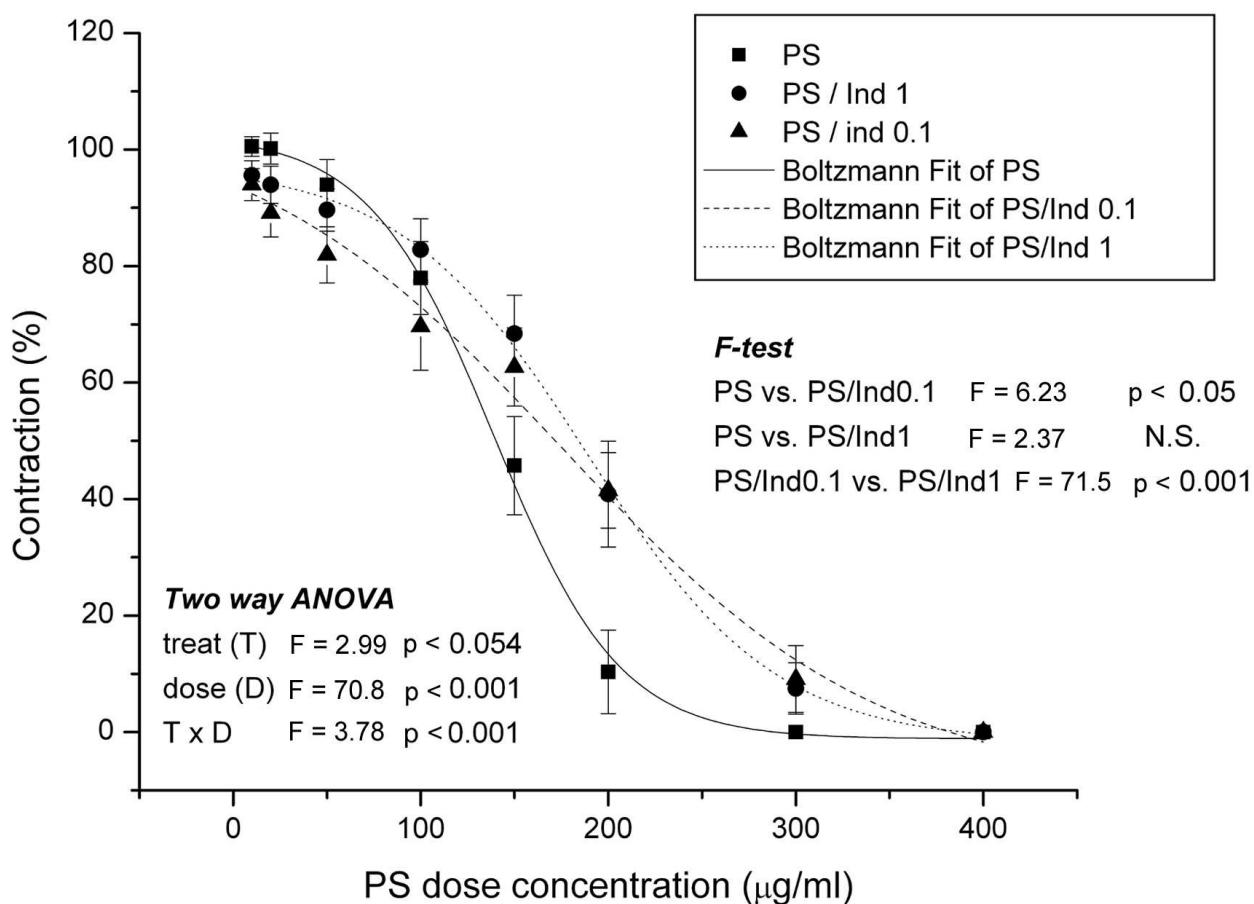
**Слика 25** Концентрацијски зависне криве показују дејство PS у одсуству ( $\text{Ca}^{2+}$  akt.+ PS) и присуству метиленског плавог ( $\text{Ca}^{2+}$  akt. PS + MB) на  $\text{Ca}^{2+}$  индуковану активност изолованог утеруса пацова

**6. Утицај протамин-сулфата у присуству индометацина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова и спонтану активност индуковану калцијумом**

Протамин-сулфат (PS) је концентрацијски зависно релаксирао препарате који су испољавали спонтану ритмичку активност (two-way ANOVA,  $p < 0.001$ ,  $n = 7$ ) (сл. 26). Претретман са индометацином (0.1 и 1  $\mu\text{g/ml}$ ), потенцира релаксантни ефект PS (two-way ANOVA,  $p < 0.001$ ,  $n = 7$ ), тако да је виша концентрација била више ефикасна (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (сл. 26). Није било разлике у кривама између две испитиване дозе (несигнификантне F вредности код F-теста). PS је такође концентрацијски зависно релаксирао препарате чије су контракције индуковане калцијумом (two-way ANOVA,  $p < 0.001$ ,  $n = 7$ ). Међутим, претретман са индометацином (0.1 и 1  $\mu\text{g/ml}$ ), је статистички значајно смањивао релаксантни ефект PS (статистички значајан ефекат третмана са индометацином у трофакторској ANOVA,  $p < 0.001$ ; сл. 26).



**Слика 26** Концентрацијски - зависне сигмоидне фит криве за PS-индуковану релаксацију на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова претретирану са индометацином (0.1 и 1 µg/ml). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација (n = 7). Сигмоидни фитови су урађени у сагласности са Boltzmann једначином. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом протамина-сулфата (PS) и претретманом (T) као факторима. Подаци о појединачним ефектима су дати на претходним сликама.



**Слика 27** Концентрацијски -зависне сигмоидне фит криве за PS-индуковану релаксацију на калцијумски тип активације изолованог утеруса пацова претретрану са индометацином (0.1 и 1 µg/ml). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација (n = 7). Сигмоидни фитови су урађени у сагласности са Boltzmann једначином. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом протамин-сулфата (PS) и претретманом (T) као факторима. Подаци о појединачним ефектима су дати на претходним сликама.

**Генерални закључак о експериментима са протамин-сулфатом**

Претходни резултати у нашој лабораторији, али и садашњи у оквиру ове докторске тезе, указују да протамин-сулфат (PS) изазива концентрацијски-зависну релаксацију, како спонтане, тако и калцијум индуковане активности изолованог утеруса, делом путем калијумских канала и у извесној мери преко адренергичких рецептора и посредством азот моноксид (NO)-зависних путева.

У садашњим експериментима смо показали да растуће концентрације PS, од 10 до 400 µg/ml, проузрокују концентрацијски зависну инхибицију испитиваних типова активације пацова (ниже концентрације од 10 до 20 µg/ml су без ефекта, док веће изазивају потпуну релаксацију). Релаксантни ефект протамин-сулфата зависи од типа активације и био је јаче изражен на спонтаној ритмичкој активности него на контракцијама изолованог утеруса проузрокованим калцијумом. Најслабији ефект протамин-сулфат је испољио на Ach тип активације.

На основу експеримената са испитивањем инхибиторног ефекта протамин-сулфата у присуству GLB, 4-AP и ТЕА, може се закључити да његов релаксантни ефект само делом зависи од отварања калијумских канала. У експериментима на спонтано активним утерусима, само је претретман са ТЕА делимично антагонизовао релаксантни ефекат протамин-сулфата, што значи да код релаксације на овом типу активације нису укључени АТР калијумски канали, а само делимично  $V_{Ca}$ . С друге стране, код  $Ca^{2+}$ -индукованог типа активације утеруса, само претретман са вишим концентрацијама глибенкламида ( $2 \times 10^{-6}M$ ), а ТЕА и 4AP само делимично (што зависи од начина обраде резултата), антагонизују релаксантни ефекат протамин-сулфата.

Претретман са метиленским плавилом (спречавањем интеракције NO са гванилатном циклазом и инхибицијом синтезе cGMP), значајно антагонизује релаксантни ефект растућих концентрација протамин-сулфата, што значи да у механизму његовог релаксантног дејства на глатки мишић утеруса учествује и сигнални пут са cGMP.

Познато је да је индометацин неселективни инхибитор циклооксигеназе (COX 1 и COX 2), који је у стању да спречи превремени порођај, редуковањем материчних контракција кроз инхибицију синтезе простагландина у утерусу. Претретман са индометацином, сам по себи, у садашњим експериментима није мењао активност изолованог утеруса пацова. Међутим, индометацин је значајно потенцирао релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова, док је његов ефект на активност индуковану калцијумом смањивао.

## III РЕЗУЛТАТИ

### ПИНАЦИДИЛ

#### *1. Утицај типа активације утеруса на релаксантни ефекат пинацидила*

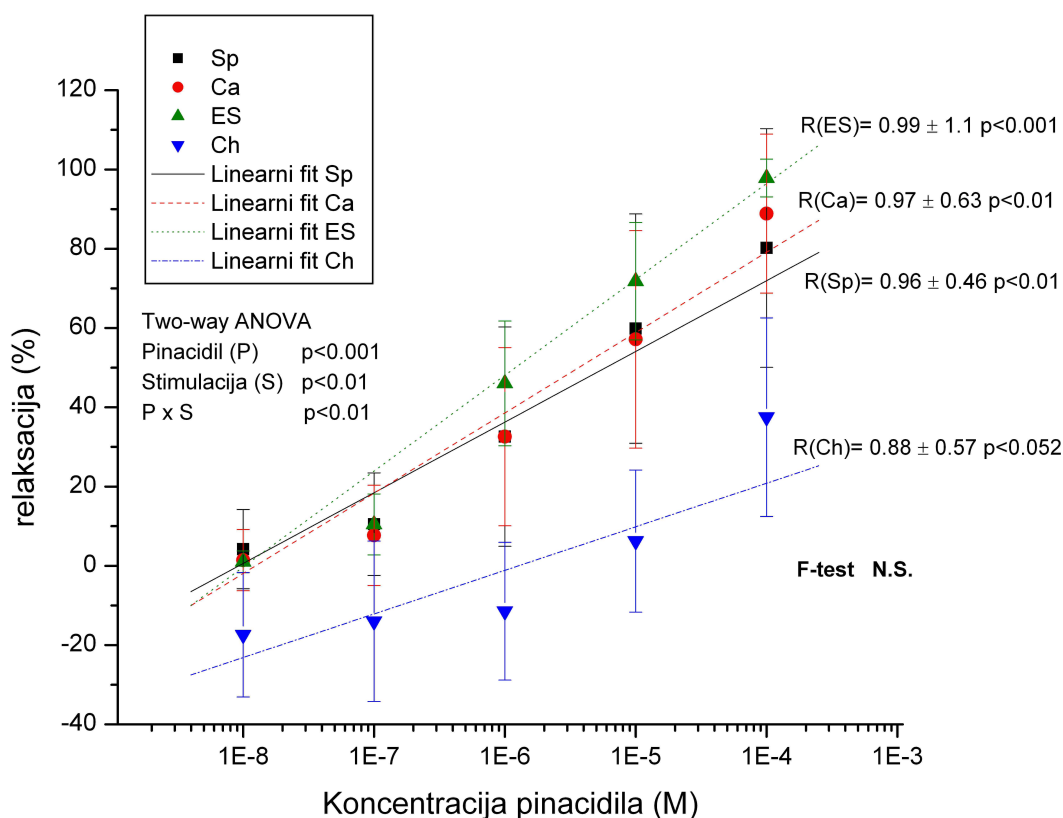
У нашим експериментима испитивали смо релаксантни ефект пинацидила (као и пентоксифилина и протамина-сулфата) на контракције изолованог утеруса пацова које одликује фазна активност (брза контракција и брза релаксација), која се побуђује електричном стимулацијом (ES), дејством хормона (као што је у нашим експериментима урађено са окситоцином), неуротрансмитерима (Ach) или спонтано. Такође, испитивали смо и ефект пинацидила на тоничну активност глатког мишића утеруса, коју карактеришу споре и продужене контракције без релаксације (у трудноћи су непожељне јер могу довести до смрти фетуса, а могу имати патолошки значај и за негравидни утерус), а могу се побудити раствором KCl.

Пинацидил (10 nM - 0.1mM) је концентрацијски зависно инхибисао спонтану ритмичку активност, као и контракције изолованог утеруса пацова индуковане калцијумом или електричном стимулацијом (скоро у подједнаком степену) (ANOVA, ефекат концентрације пинацидила,  $p < 0.001$ ; сл. 28 и 29). Код холинергичког типа активације утеруса, ниске концентрације пинацидила не изазивају инхибицију (у извесној мери имају стимулаторно дејство на овај тип активације), док га релаксирају тек највише концентрације од  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  M (ефекат врсте стимулације,  $p < 0.01$  и интеркација P x S,  $p < 0.01$  у двофакторској ANOVA). Све криве статистички значајно се описују линеарном регресијом, али међу њима нема разлике у нагибу (нема статистички значајног ефекта поређењем F-тестом). Дакле, релаксантни ефекат пинацидила је сличан (није статистички значајно различит) код спонтаних,  $Ca^{2+}$ - и електро-стимулисаних утеруса. Код холинергичке активације утеруса, мале концентрације пинацидила имају чак стимулаторан ефекат (до  $10^{-6}$  M), док делимична релаксација настаје тек при највишој коришћеној дози ( $10^{-4}$  M). Линеарна регресија зависности релаксације од концентрације пинацидила код холинергички стимулисаних утеруса је на ивици статистичке значајности ( $p < 0.052$ ), иако је коефицијент регресије прилично висок ( $R = 0.88$ ).

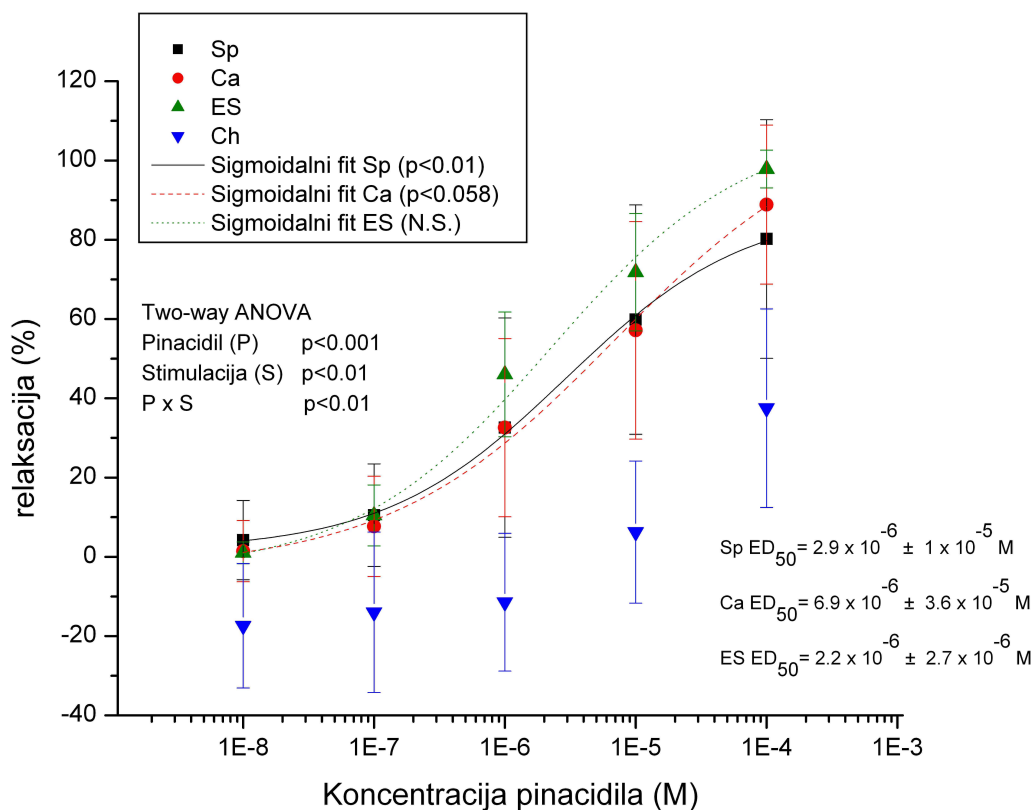
Криве су моделиране и према сигмоидалном моделу, али је само код спонтано активних утеруса ефекат пинацидила било могуће статистички значајно фитовати на овај начин ( $Chi2/DoF < 0.01$ ; сл. 29). Код  $Ca^{2+}$ - активираних утеруса, сигмоидални фит је био на ивици статистичке значајности ( $Chi2/DoF < 0.058$ ). За холинергички тип активације утеруса, сигмоидални фит није ни било могуће урадити због “негативних вредности” (у ствари

стимулаторног ефекта) ниских доза пинацидила. На графику су дате и ED<sub>50</sub> вредности израчунате из сигмоидалних кривих, али без статистички значајних разлика међу њима.

Генерално се може рећи да је пинацидил, снажнији релаксантни ефект (10 nM-0.1mM) испољио на спонтаној ритмичкој активности и контракцијама изолованог утеруса пацова индукованим калцијумом или електричном стимулацијом (скоро у подједнаком степену) него на контракције индуковане ацетилхолином и калијум хлоридом (KCl). Највише концентрације пинацидила су биле неопходне за инхибицију тоничних контракција изазваних високом концентрацијом раствора KCl (сл. 30) од 150 mM (сигнификантна ANOVA, стимулус, p<0.01 и интеракција доза x ефекти стимулације, p<0.01, n=10), нешто ниже за инхибицију контракција изазваних ацетилхолином, окситоцином и 40 mM калијум хлоридом (n=6), док су најниже концентрације пинацидила биле довољне за инхибицију контракција индукованих са окситоцином и 20 mM KCl.

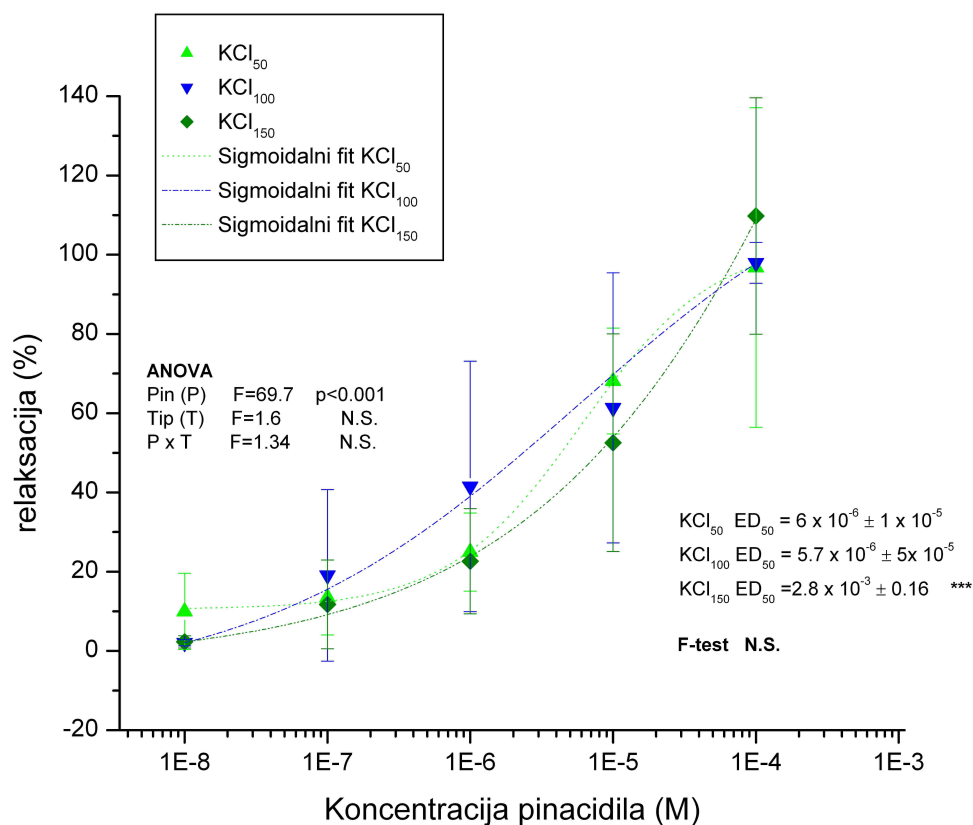


**Слика 28** Релаксантни ефекат пинацидила на различито стимулисане активне утерусе. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и врстом стимулације (S) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (R) ± SD) и поређене F-тестом.



**Слика 29** Релаксантни ефекат пинацидила (различити типови активације: Sp= спонтана ритмичка активност, Ca= индуковане контракције, ES=електрична стимулација, Ach= контракције проузроковане ацетилхолином) на различите стимулације изолованог утеруса пацова. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и врстом стимулације (S) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу, али је само код спонтано активних утеруса ефекат пинацидила било могуће статистички значајно фитовати на овај начин ( $\chi^2/DoF < 0.01$ ). За холинергички тип активације утеруса сигмоидални фит није ни било могуће урадити због ефеката стимулације активности при ниским концентрацијама пинацидила. На графику су дате и  $ED_{50}$  вредности израчунате из сигмоидалних кривих, али без статистички значајних разлика међу њима.





**Слика 30** Релаксантни ефекат пинацидила на утерусе стимулисане различитим концентрацијама раствора KCl. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и типом стимулације (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу, али је само код KCl (50mM) активираних утеруса ефекат пинацидила било могуће статистички значајно фитовати на овај начин ( $\chi^2/DoF < 0.05$ ). На графику су дате  $ED_{50}$  вредности израчунате из сигмоидалних кривих;  $ED_{50}$  KCl (150mM) се статистички значајно разликује од  $ED_{50}$  других концентрација KCl.

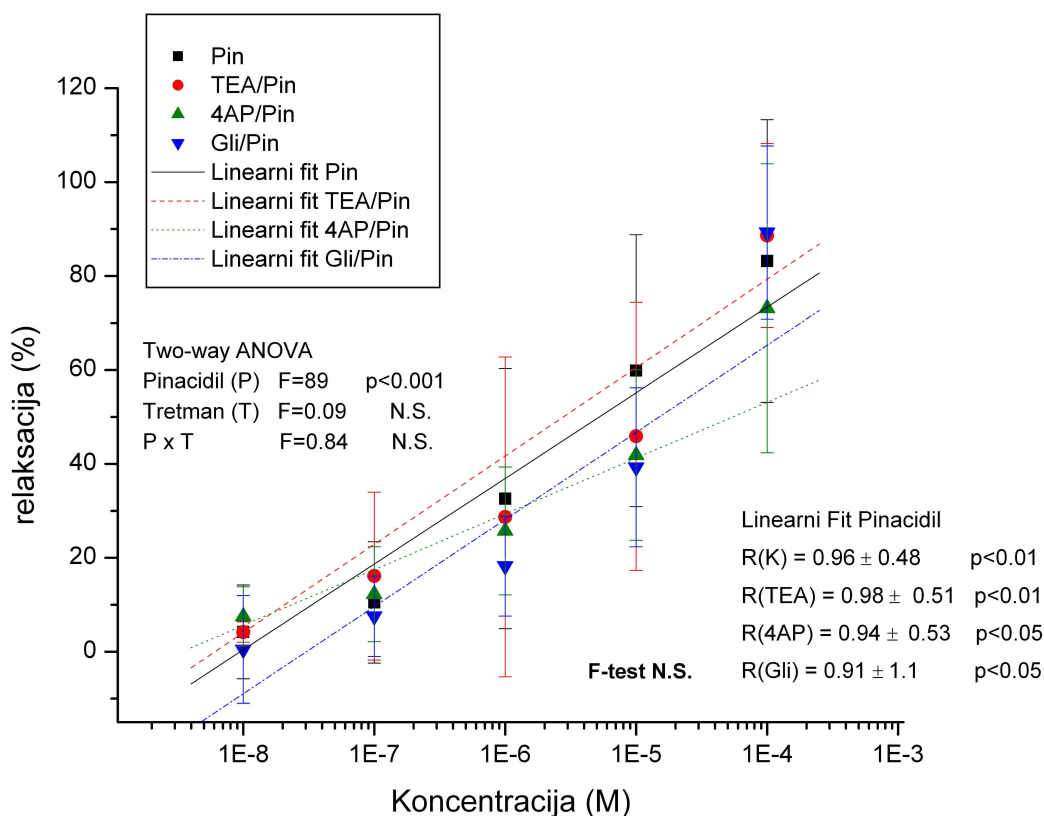
**2. Утицај пинацидила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова индуковане калцијумом (0.018 mM) у присуству блокатора калијумских канала: GLB, TEA и 4-AP.**

**2. 1. Утицај претретмана са различитим блокаторима калијумских канала на релаксантни ефекат растућих концентрација пинацидила на спонтану ритмичку активност утеруса**

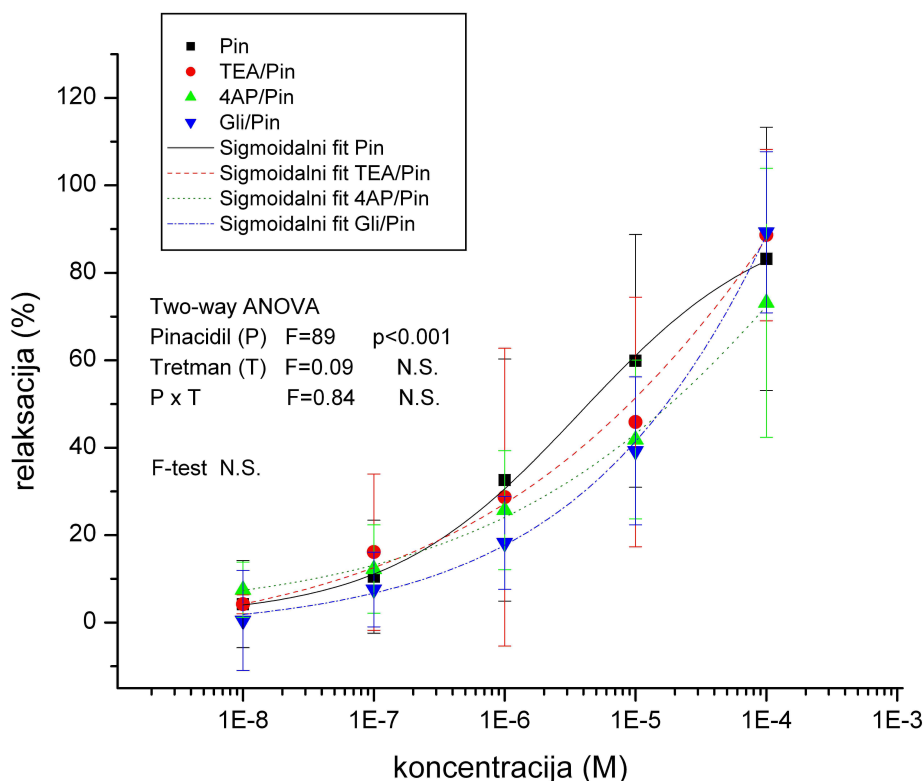
Пинацидил концентрацијски зависно релаксира спонтано активни утерус (двофакторска анализа варијансе, two-way ANOVA, статистички значајан ефекат концентрације пинацидила,  $p < 0.001$ ; сл. 31, 32). Када се утеруси претретирају са TEA, 4AP и глибенкламидом, дозна зависност се задржава, без ефекта на релаксацију изазвану пинацидилом (нема статистички значајног ефекта претретмана у двофакторској анализи варијансе). Регресиони карактер правих

се задржава и описује ефекат пинацидила и након претретмана, при чему су све регресионе праве сличне (поређење F-тестом није дало никакву статистички значајну различитост).

С обзиром да је модел дозне зависности утицаја пинацидила на релаксацију утеруса било могуће статистички значајно и сигмоидално фитовати ( $\text{Chi}^2/\text{df} < 0.01$ ), ефекти претретмана су фитовани и на овај начин и поређени F-тестом (сл. 31). Међутим, овај начин обраде је показао да се ефекат релаксације код спонтано активних утеруса, претретираних са ТЕА, не може статистички значајно екстраполирати на овај начин јер модел није статистички значајан ( $\text{Chi}^2/\text{df}=0.0816$ ). С друге стране, претретмани са 4АР и глибенкламидом, се статистички значајно сигмоидално фитију ( $\text{Chi}^2/\text{df} < 0.05$ ). Међутим, поређење F-тестом је показало да су, без обзира на значајност модела, све криве међусобно сличне (нема значајног ефекта поређењем F-тестом). С обзиром на сличност и на непостојање статистичке значајности модела,  $\text{ED}_{50}$  вредности нису ни дате, нити поређене.



**Слика 31** Релаксантни ефекат пинацидила на спонтано активне утерусе претретиране са ТЕА, 4АР и глибенкламидом. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (R) ± SD) и поређене F-тестом.



**Слика 32** Релаксантни ефекат пинацидила на спонтано активне утерусе претретиране са ТЕА, 4АР и глибенкламидом. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Сигмоидално моделирање криве претретмана са ТЕА није статистички значајно ( $\text{Chi}^2/\text{df}=0.0816$ ). Поређење F-тестом није показало постојање статистички значајних разлика међу сигмоидално моделираним кривама.

## 2.2. Утицај претретмана различитим блокаторима калијумских канала на релаксантни ефект растућих концентрација пинацидила на $\text{Ca}^{2+}$ -индуковану активност утеруса

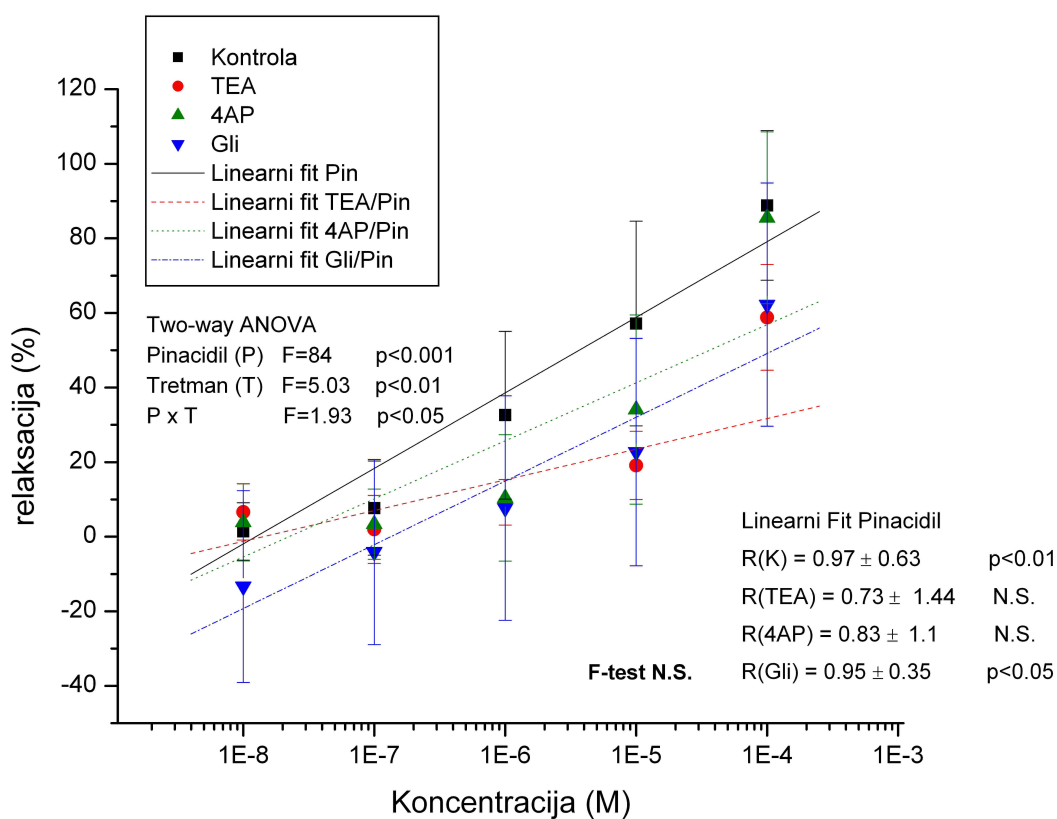
Претретман на  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованом типу активације изолованог утеруса са ТЕА, 4АР и глибенкламидом, утиче на степен релаксације изазване пинацидилом. Основни релаксантни ефекат исказан концентрацијском зависношћу преко линеарне регресије се мења тако да се линеарност, после третмана са ТЕА и 4АР, губи (сл. 33). Стога су криве дозне зависности релаксације утеруса под утицајем пинацидила код ових претретмана фитоване и сигмоидално (сл. 33).

Претретман на  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованом типу активације изолованог утеруса са ТЕА, доводи до губитка линеарности ефекта (регресиони фит није статистички значајан, сл. 33), али не прелази ни у сигмоидални (сигмоидални фит није статистички значајан, сл. 33), што указује на промену опсега доза у оквиру којих пинацидил делује, као и на недостатак класичног односа доза-ефекат. После претретмана са ТЕА, ниске концентрације пинацидила немају ефекат на

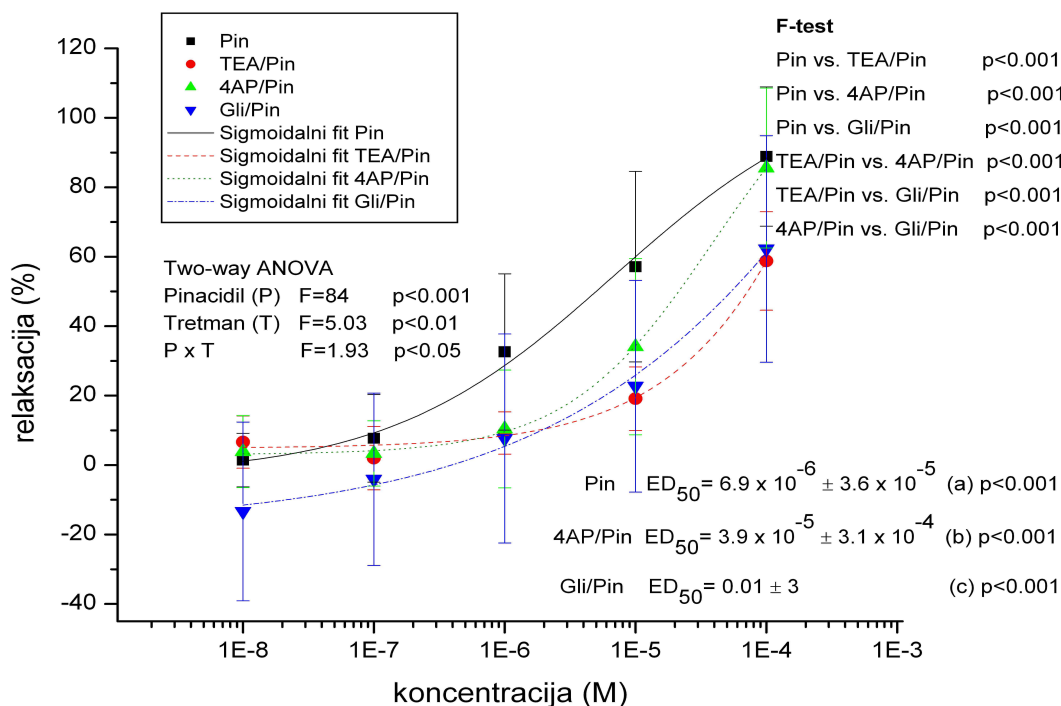
релаксацију ( $10^{-8}$ – $10^{-6}$ ), док је са вишим концентрацијама релаксација прилично смањена (ефекат претретмана (Т) и интеркација (P x T) у ANOVA).

И претретман са 4AP, доводи до губитка линеарности дозне зависности пинацидила (модел линеарне регресије није статистички значајан), али се кинетика трансформише у сигмоидални облик (сл. 33 и 34). Претретман са 4AP, смањује релаксантни ефекат пинацидила и помера ED<sub>50</sub> вредности ка вишим (сл. 33).

У односу на сам пинацидил, претретман Ca<sup>2+</sup>-индукованих активних утеруса са глибенкламидом, довео је до почетне стимулације активности након апликовања пинацидила, а релаксација настаје тек са дозом пинацидила од 10<sup>-4</sup> (сл. 33 и 34). Линеарни карактер криве остаје, али се екстраполација може урадити и преко сигмоидалног модела, који јасно показује вишеструко повећање ED<sub>50</sub> вредности (p<0.001). У сваком случају, претретман глибенкламидом, доводи до значајног смањења релаксантног ефекта пинацидила.



**Слика 33** Релаксантни ефекат пинацидила на Ca<sup>2+</sup>-индуковане активне утерусе претретиране са TEA, 4AP и глибенкламидом. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (R) ± SD) и поређене F-тестом. Линеарни модел регресије није статистички значајан за Ca<sup>2+</sup>-индуковане активне утерусе претретиране са TEA и 4AP и третиране растућим концентрацијама пинацидила.



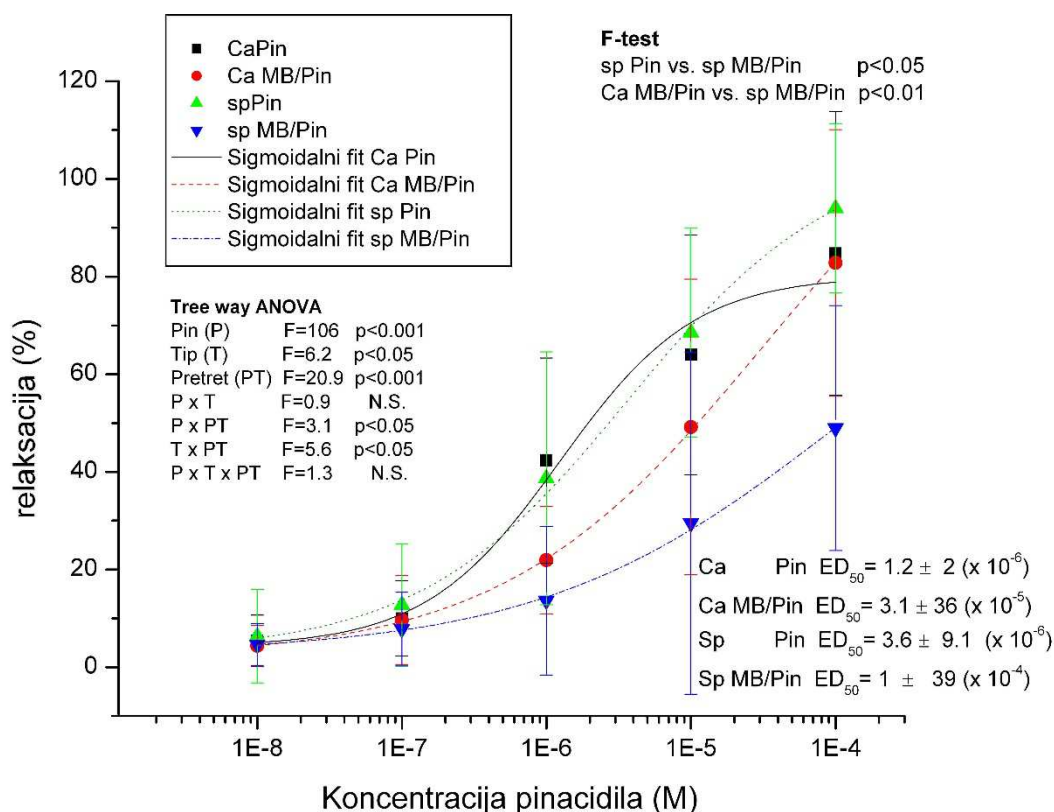
**Слика 34** Релаксантни ефекат пинацидила на Ca<sup>2+</sup>- индуковане активне утерусе претретирани са ТЕА, 4АР и глибенкламидом. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и врстом претретмана (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу и поређене F-тестом. Сигмоидално моделирање криве претретмана са ТЕА није статистички значајно (Chi<sup>2</sup>/df=0.227), те ED<sub>50</sub> вредности нису израчунате. ED<sub>50</sub> вредности су поређене Tukey HSD t-тестом и показана је статистички значајна разлика између њих (различита слова у заградама означавају статистички значајну различитост између група). Поређење F-тестом је показало постојање статистички значајних разлика међу сигмоидално моделираним кривама.

У овим презентираним експериментима смо показали да глибенкламид антагонизује релаксантни ефекат пинацидила на спонтану ритмичку активност, као и на Ca<sup>2+</sup> типу активације изолованог утеруса пацова. Нашли смо да глибенкламид снажније инхибира релаксантни ефекат пинацидила на контракције изолованог утеруса пацова изазване Ca<sup>2+</sup> него спонтану ритмичку активност утеруса.

**3. Испитивање инхибиторног ефекта пинацидила у присуству метиленског плавила и L-NAME на спонтану ритмичку активност и Ca<sup>2+</sup>- индуковану активност изолованог утеруса пацова**

У нашим експериментима метиленско плавило (0,9 x 10<sup>-6</sup> mol/L) антагонизује релаксантни ефекат растућих концентрација пинацидила на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова. Тако на пример, у присуству метиленског плавила, ни највећа примењена концентрација пинацидила (100 μM) није изазвала 50% инхибицију поменутог типа активације. С друге стране, у контролним експериментима, пинацидил је у овој концентрацији

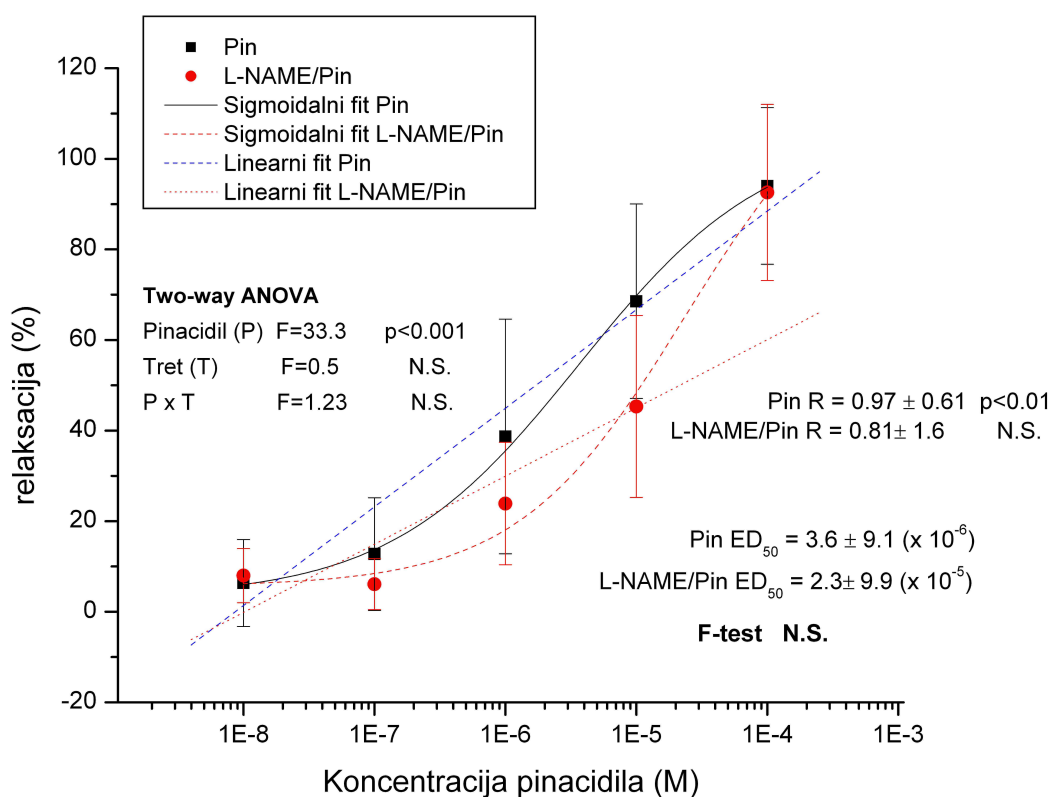
изазвао комплетну инхибицију спонтане ритмичке активности изолованог утеруса пацова (сл. 35).



**Слика 35** Релаксантни ефекат пинацидила на спонтане и Ca<sup>2+</sup>-активирани утерусе претретирани са метиленским плавим (МВ). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана трофакторском анализом варијансе (tree-way ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P), типом активације (T) и претретманом (PT) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу (на графику су приказане ED<sub>50</sub> вредности ± SD) и поређене F-тестом.

Претретман утеруса, и спонтано и Ca<sup>2+</sup>-индуковано активних утеруса, са МВ, значајно смањује релаксантни ефекат пинацидила (статистички значајан ефекат претретмана у трофакторској анализи варијансе, p<0.001; више ED<sub>50</sub> вредности у поређењу са ефектом самог пинацидила, сл. 35). Ефекат је израженији код спонтано активних утеруса код којих се значајно повећавају концентрације пинацидила потребне за релаксацију (статистички значајан ефекат интеракције типа активности и претретмана T x PT, p<0.05; више ED<sub>50</sub> вредности него код Ca<sup>2+</sup>-активираних утеруса). Поређење правих регресије и сигмоидално фитованих кривих је показало да се статистички значајно разликују управо спонтано активни утеруси претретирани са МВ у односу на оне третиране само са пинацидилем, по нагибу (F-тест, p<0.05), с тим што је тај ефекат потврђен и код Ca<sup>2+</sup>-активираних утеруса када се криве сигмоидално фитију (F-тест, p<0.01).

Претретман утеруса са L-NAME код спонтано активних утеруса нема статистички значајних ефеката на релаксацију посредовану пинацидилом (ANOVA, ефекат претретмана није значајан, сл. 36.). F-тест такође није показао значајне разлике у облицима и нагибима и сигмоидално и линеарно фитованих кривих. Иако су ED<sub>50</sub> вредности различите, због високе грешке није добијена статистички значајна разлика у погледу ефеката претретмана спонтано активних утеруса са L-NAME.



**Слика 36** Релаксантни ефекат пинацидила на спонтано активне утерусе претретмане са L-NAME. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност ефеката је тестирана двофакторском анализом варијансе (two-way ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и претретманом (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном и регресионом моделу и поређене F-тестом.

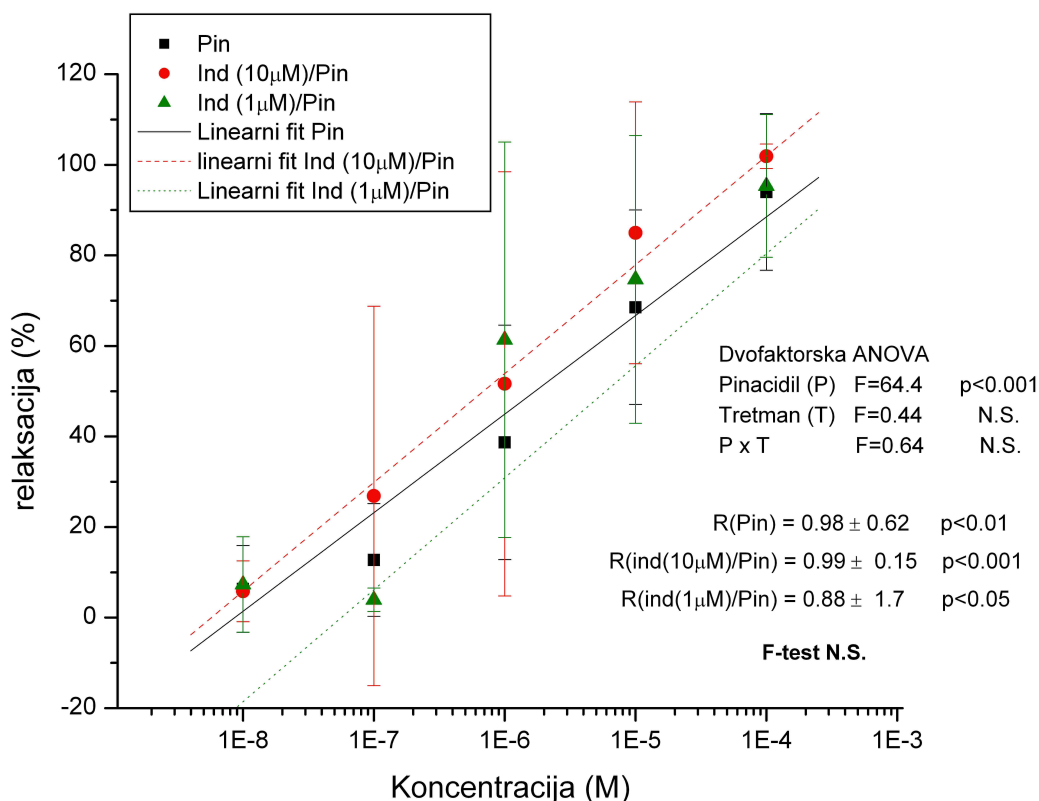
#### 4. Испитивање инхибиторног ефекта пинацидила у присуству индометацина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова

Пинацидил (10nM-0.1mM) изазива концентрацијски-зависну инхибицију спонтано активних утеруса без обзира на претретман индометацином (1 и 10 μM) (ANOVA, ефекат концентрације пинацидила, p<0.001; нема статистичке значајности ефекта претретмана нити интеракција дозе x ефекти стимулације, сл. 37 и 38). Све криве статистички значајно се описују



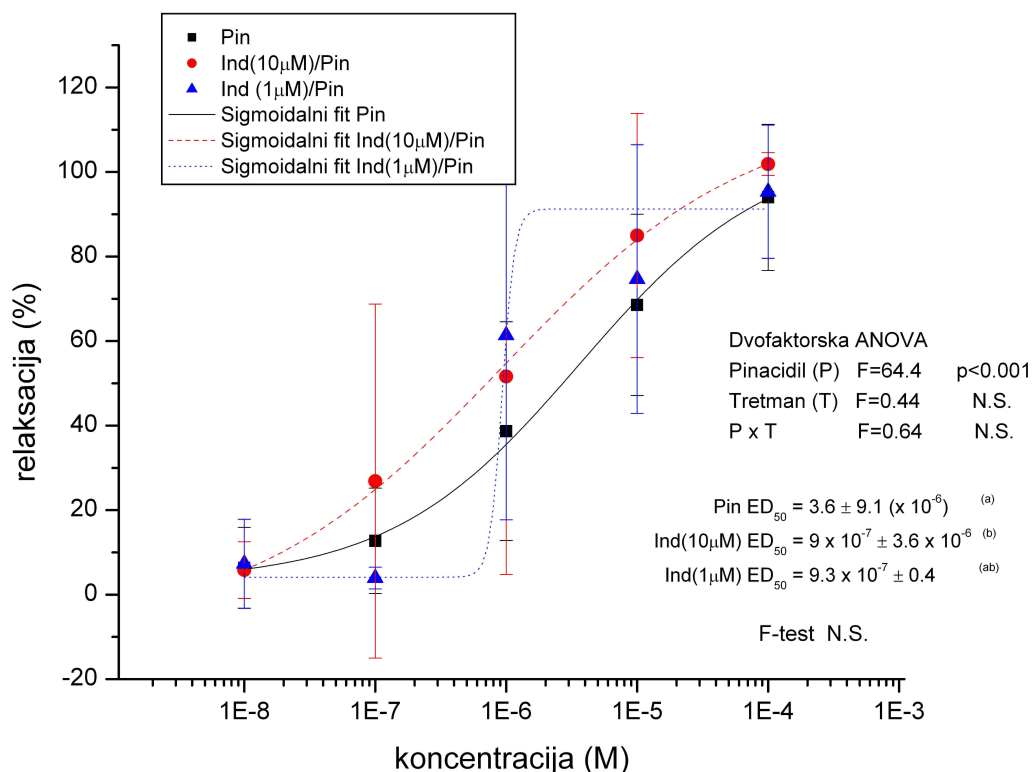
линеарном регресијом, али међу њима нема разлике у нагибу (нема статистички значајног ефекта поређењем F-тестом).

Криве релаксације су моделиране и према сигмоидалном моделу ( $\text{Chi}^2/\text{DoF} < 0.05$ ; сл. 38). Показало се да су за релаксацију спонтано активних утеруса посредовану пинацидилом потребне мање концентрације пинацидила уколико се утеруси претретирају индометацином (ниже  $\text{ED}_{50}$  вредности код претретмана индометацином). Ипак је грешка за претретман индометацином од  $1\mu\text{M}$  веома висока, па поређење кривих F-тестом није показало статистички значајне разлике у нагибу, као ни разлике у  $\text{ED}_{50}$  за овај претретман.



**Слика 37** Релаксантни ефекат пинацидила на спонтано активне утерусе претретиране различитом концентрацијом индометацина (1 и 10  $\mu\text{M}$ ). Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и третманом (T) као факторима. Криве су моделиране према линеарном моделу (приказан је фактор регресије (R)  $\pm$  SD и статистичка значајност модела) и поређене F-тестом.





**Слика 38** Релаксантни ефекат пинацидила на спонтано активне утерусе претретиране различитом концентрацијом индометацина (1 и 10 µM). Резултати су приказани као средње вредности ± стандардна девијација. Статистичка значајност је тестирана двофакторском анализом варијансе (ANOVA), са концентрацијом пинацидила (P) и третманом (T) као факторима. Криве су моделиране према сигмоидалном моделу ( $\text{Chi}^2/\text{DoF} < 0.05$ ) и поређене F-тестом. На графику су дате и ED<sub>50</sub> вредности израчунате из сигмоидалних кривих и поређене Tukey HSD стандардизованим t-тестом (различита слова у заградама у индексу указују на статистички значајну разлику p<0.05).

### Генерални закључак о експериментима са пинацидилом

Пинацидил (10 nM-0.1mM) изазива концентрацијски-зависну инхибицију различитих типова активације изолованог утеруса. Степен инхибиторног ефекта пинацидила зависи од типа активације. Генерално се може рећи да овај отварач калијумских канала проузрокује снажнији релаксантни ефект на спонтаној ритмичкој активност и контракцијама изолованог утеруса пацова индукованим калцијумом или електричном стимулацијом (скоро у подједнаком степену) него на контракције индуковане ацетилхолином и калијум хлоридом. Највише концентрације пинацидила су биле неопходне за инхибицију тоничних контракција изазваних високом концентрацијом раствора KCl од 150 mM, нешто ниже за инхибицију контракција изазваних ацетилхолином и 40 mM калијум хлоридом (n=6), док су најниже концентрације пинацидила биле довољне за инхибицију контракција индукованих са 20 mM KCl (најмања ED<sub>50</sub>).

Пинацидил је инхибисао спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова - малим делом посредством активације K<sub>ATP</sub> канала, као и контракције проузроковане

електричном стимулацијом (КК), али и калијум – независним механизмима који су повезани са интрацелуларном концентрацијом  $\text{Ca}^{2+}$  и/или cGMP путем.  $\text{Ca}^{2+}$  - индуковану контрактилност, пинацидил је инхибисао већим делом путем активације  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ . Метиленско плавило, за разлику од L-NAME и индометацина, антагонизује релаксантни ефекат пинацидила на спонтану ритмичку активност глатког мишића изолованог утеруса пацова, што говори да је у механизму његовог дејства делом укључен и сигнални пут са cGMP, независан од NO - учешће cGMP пута у механизму релаксантног ефекта пинацидила.

У експериментима у којима смо испитивали утицај блокатора калијумских канала: глибенкламида /GLB (блокатор отварања  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала), 4- аминопиридина /4AP (блокатор  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ ) и тетраетиламонијума /TEA (блокатор волтажно зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала) на релаксантни ефект пинацидила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом, показали смо да у механизму његовог деловања, отварање различитих типова калијумских канала, нема подједнак значај. Генерално, може се рећи да у релаксантном ефекту пинацидила на оба типа активације, отварање  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала није од пресудног значаја, као што је то случај са другим типовима калијумских канала. С друге стране, претретман са 4AP (блокатор  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ ) и ТЕА (блокатор волтажно зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала), на калцијумском типу активације смањује релаксантни ефекат пинацидила (статистички значајна разлика  $\text{ED}_{50}$  вредности у односу на сам пинацидил), највише због његове ефикасности у нижим концентрацијама, док претретман са 4AP, доводи до смањења релаксантног ефекта у вишим концентрацијама пинацидила, тако да се, у присуству 4AP, није могао постићи његов максимални релаксантни ефекат. На основу изнетог може се рећи да у механизму релаксантног деловања пинацидила на испитиваним типовима активације, није значајније заступљено отварање  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала. Међутим, отварање  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  и волтажно зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала, има изванредан значај, али у различитом степену у механизму релаксантног ефекта пинацидила на контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом. Додатна потврда о укључивању NO/cGMP пута и калцијумских канала у механизам релаксантног ефекта пинацидила су наши већ описани резултати у присуству ВКК (GLB, ТЕА и 4AP), у којима смо показали да отварање калијумских канала не игра пресудну улогу у механизму његовог деловања, посебно  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канали.

Индометацин, за разлику од експеримената са протамин-сулфатом, није значајно потенцирао релаксантни ефект пинацидила на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова, док је његов ефект на активност индуковану калцијумом потенцирао.

Способност пинацидила да комплетно релаксира негравидни утерус пацова преконтрахован са раствором богатим  $\text{K}^{+}$ , сугерише да  $\text{K}^{+}$  канал-независни путеви учествују у његовом релаксантном ефекту. МВ је сигнификантно антагонизовао релаксантни ефект

пинацидила на спонтану ритмичку активност, што имплицира да cGMP пут игра значајну улогу у механизму његовог дејства. Садашњи подаци показују да пинацидил испољава снажне релаксантне карактеристике у негравидном утерусу пацова у еструсној фази, због чега може да се узме у обзир као могући агенс за лечење дисменореје и токолизу. Сличан општи закључак се може извући и за пентоксифилин или протамин. На еквимоларној основи, пинацидил је испољио јачи релаксациони потенцијал од пентоксифилина и протамина. Могућност утицаја на активност калијумских канала у утерусу, али и другим механизмима (NO/cGMP пут или блокирање Ca<sup>2+</sup> канала), уз приступ селективној контроли миометријске активности, као и развој високо специфичних агониста калијумских канала, може имати потенцијалну терапијску вредност, не само у регулацији дисменореје, већ и спречавању превремених контракција за време порођаја.

# Дискусија

## САДРЖАЈ ДИСКУСИЈЕ

1. Карактеристике утицаја пентоксифилина на различите типове активације изолованог утеруса пацова (контракције проузроковане електричном пољном стимулацијом/неурогене контракције, ацетилхолином, окситоцином и додавањем калцијума у медијум);
2. Утицај метиленског плавила на релаксантни ефект пентоксифилина и L-аргинина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом;
3. Утицај блокатора калијумских канала (глибенкламида, 4-аминопиридина и тетраетиламонијума) на релаксантни ефект пентоксифилина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом;
4. Карактеристике утицаја протамин-сулфата на различите типове активације изолованог утеруса пацова (контракције проузроковане електричном пољном стимулацијом/неурогене контракције, ацетилхолином, окситоцином и додавањем калцијума у медијум);
5. Утицај индометацина на релаксантни ефект протамина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом;
6. Утицај блокатора калијумских канала (глибенкламида, 4-аминопиридина и тетраетиламонијума) на релаксантни ефект протамина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом;
7. Карактеристике утицаја пинацидила на различите типове активације изолованог утеруса пацова (контракције проузроковане електричном пољном стимулацијом/неурогене контракције, ацетилхолином, окситоцином и додавањем калцијума у медијум и различитим концентрацијама KCl (25, 50 и 80 mM);
8. Утицај метиленског плавила на релаксантни ефект пинацидила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом;
9. Утицај блокатора калијумских канала (глибенкламида, 4-аминопиридина и тетраетиламонијума) на релаксантни ефект пинацидила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом.

## ПЕНТОКСИФИЛИН

*Специфичности утицаја пентоксифилина на различите типове активације изолованог утеруса пацова (контракције проузроковане електричном пољном стимулацијом/неурогене контракције, егзогеним ацетилхолином, окситоцином и додавањем калцијума у медијум)*

У жељи да детаљније проучимо механизам деловања пентоксифилина, пинацидила, али и протамин-сулфата, испитивали смо ефекте ових релаксантних супстанција на различитим типовима активације изолованог утеруса пацова, који у различитој мери укључују екстрацелуларни и интрацелуларни калцијум, као и интеракцију са другим јонским каналима, посебно са калијумским. Због тога ћемо на почетку дискусије ефеката пентоксифилина, протамина и пинацидила, више рећи о овим типовима активације. О експериментима у којима је испитивана улога NO и о калијумским каналима, као и њиховој међусобној интеракцији у механизму релаксантног деловања пентоксифилина, протамина и пинацидила, биће говора у наредним поглављима дискусије ове докторске тезе.

У нашим експериментима, фазне контракције изолованог утеруса смо изазивали са ацетилхолином, електричном стимулацијом и различитим концентрацијама калцијума у медијуму. Тоничне контракције индуковали смо различитим концентрацијама KCl. Сви испитивани типови активације изолованог утеруса пацова, као и спонтана ритмичка активност, које смо користили у нашим експериментима, укључују промене у метаболизму јона калцијума и калијума. Редукцијом мембранског потенцијала повећава се пермеабилитет за калцијум, што омогућава његов улазак у ћелију и контракцију глатког мишића.

K<sup>+</sup> - канали, који се активирају у току процеса генезе акционих потенцијала у ћелијској мембрани, селективно су пропустљиви за јоне K<sup>+</sup>, при чему се кретање ових јона врши из унутрашњости ћелије у спољашњост. Овакав смер кретања K<sup>+</sup> јона удаљава ћелијску мембрану од стања критичног нивоа за генезу акционог потенцијала према области хиперполаризације. У тим условима се волтажно зависни Ca<sup>2+</sup> - канали инактивирају, долази до окончања уласка Ca<sup>2+</sup> у унутрашњост ћелије и релаксације глатког мишића (Bolton, 1979, 1983, 1986).

*Спонтана ритмичка активност глатког мишића утеруса* се остварује уласком калцијума у ћелију из екстрацелуларног простора, кроз калцијумске канале, смештене у ћелијској мембрани, што значи да овај тип активације највише зависи од концентрације калцијума у екстрацелуларном простору. Основа за спонтану ритмичку активност утеруса лежи у тзв. „pacemaker“ ћелијама, које нису нађене само у глатком мишићу утеруса, већ и мишићима

уретера и вене порте (Sergeant i sar., 2000; Povstyan i sar., 2003; Wray i sar., 2003). Екситација настала у „pacemaker“ ћелијама (спонтана мембранска струја), захваљујући каналској проводљивости, лако се преноси на околне ћелије и доводи до деполаризације и накнадног стварања акционог потенцијала, што ствара услове за контракцију. Претпоставља се да се ефикасност ових контракција заснива на „gap junction“ - мостовима међу ћелијама, заступљеним у утерусу (Wray i sar., 2003). Сматра се да спонтана деполаризација и активност „pacemaker“ ћелија доводе, не само до контракције, већ и до њихове континуираности, која се назива спонтана ритмичка активност, утеруса, али и неких других глатких мишића. С друге стране, неки аутори сматрају да у настанку спонтане ритмичке активности глатких мишићних ћелија главну улогу има  $Ca^{2+}$  из саркоплазматичног ретикулума (Kim i sar., 1995; Ohya i sar., 1987). Међутим, и улазак  $Ca^{2+}$  кроз јонске канале у сарколеми, путем Т-типа калцијумског канала, такође је повезан са трансмисијом акционог потенцијала и „pacemaker“ активношћу неких ћелија (Triggle, 1998). Поред тога,  $Ca^{2+}$ - зависни  $K^+$  канали, који су повезани са одржавањем потенцијала мировања, вероватно имају удела у генерисању спонтане ритмичке активности глатких мишића (Young, 2007; Aaronson i sar., 2006; Albrecht i sar., 1996; Tabb i sar., 1992).

Неки други типови активације мишића (контракције изазване ацетилхолином, калцијумом или окситоцином) у доброј мери, више него што се претпостављало, зависе од интрацелуларног калцијума смештеног у депоима ћелије, или калцијума који улази у ћелију активацијом мускаринских или окситоцинских рецептора (La Lanne i sar., 1984). Поредак осетљивости различитих типова активације глатког мишића утеруса на пинацидил обрнуто је пропорционалан поретку осетљивости овог мишића на блокаторе калцијумских канала (Jokanović, 2010; Sokolović i sar., 2012; Kordić-Bojinović, 2010, 2011, 2012).

**Електрична стимулација**, деполаризацијом ћелијске мембране нервних влакана и инфлука калцијума у ћелију путем волтажно зависних калцијумских канала, доводи до ослобађања ацетилхолина /Ach (Levitan i Kaczmarek, 1987). Насупрот томе, хиперполаризација мембране нерава и повећање проводљивости калијума, редукује ширења импулса кроз аксоне нерава и на крају кочи ослобађање неуротрансмитера (Nishiwaki i sar., 2000; Novaković i sar., 2007). Потврда тих чињеница су наши контролни експерименти са тетродотоксином (блокатор натријумских канала), у којима је инхибиција ослобађања ацетилхолина из нервних завршетака резултирала изостанак контракције изолованог утеруса пацова изазване електричном стимулацијом (Houdeau i sar., 2003; Bülbring i Tomita, 1967, 2003.). Након ових експеримената, истраживали смо какав је ефект атропина на контракције изолованог утеруса пацова изазване електричном стимулацијом (ES) и установили инхибицију овог типа активности због блокаде мускаринских

рецептора. Ови наши налази су у складу са експериментима Milovanovića i Varagića (1984), који су такође нашли у присуству атропина значајну редукцију контракција изазваних ES, што води закључку да овај тип контракција зависи од ослобађања ацетилхолина из холинергичких нерава. Слични налази су добијени и са другим типовима глатких мишића у којима преовладавају холинергичке структуре. Тако на пример, атропин је инхибисао контракције изоловане трахеје говечета изазване електричном стимулацијом (Song i sar., 1996).

Добро је познато да **окситоцин** појачава фреквенцију и јачину спонтане ритмичке активности глатког мишића утеруса. Сматра се да окситоцин проузрокује деполаризацију и тиме повећање фреквенције, амплитуде и целокупне контрактилне активности (Marshall, 1963). Међутим, утврђено је да окситоцин значајно не утиче на деполаризацију и промену потенцијала мировања глатких мишићних ћелија утеруса у дозама од 50–500  $\mu\text{U/ml}$  (Kleinhaus i Kao, 1969.)

**Ефекти ацетилхолина (ACh)** на изолованом утерусу пацова су резултат везивања ове супстанце за  $M_2$  и  $M_3$  тип мускаринских холинергичких рецептора (Milovanović i sar., 1981; Fernando i sar., 2004; Morizaki, 1989). Присуство  $M_2$  и  $M_3$  мускаринских рецептора у миометријуму пацова доказано је коришћењем радиоактивно обележеног ацетихолина, блокирањем његовог стимулативног ефекта селективним антагонистима (Burgen, 1979) и изоловањем mRNA за протеине ових типова мускаринских канала (Fernando i sar., 2004). Насупрот томе, никотински рецептори нису нађени у утерусу (Kuriyama i Suzuki, 1978).

### Специфичности инхибиције контрактилности утеруса/токолитици

Обзиром да је у овој дисертацији испитивању потенцијалних токолитика, као што су пентоксифилин, протамин-сулфат и пинацидил и њиховог потенцијала, ради разјашњења механизма њиховог деловања односно у којој мери је у то укључено модулирање различитих типова/субтипова калијумских канала, као и сигнални пут NO/cGMP, укључујући и њихову међусобну интеракцију, посвећена велика пажња, сматрам да у овом делу дискусије треба приказати садашњи статус токолитика, из кога ће се видети да још увек нема идеалног лека који би спречавао побачај или превремени порођај без нежељених ефеката. За њим, поред нас, трага армија истраживача, који ће сигурно достићи жељени циљ, токолитик без нежељених или са подношљивим нежељеним ефектима.

**Токолитици** су лекови који спречавају побачај или превремени порођај, инхибицијом контракција gravidног утеруса. Такође, они могу да контролишу индукцију порођаја окситоцином, односно да у случају предозирања утеротоника зауставе порођајне контракције и спрече оштећење или угушење плода. Међутим, трагање за идеалним токолитиком није



престало, због тога што могу да проузрокују нежељене ефекте код трудница и/или плода. Нежељени ефекти на плоду могу да се испоље интраутерино или након рођења. Пре доношења одлуке о примени лека, лекар мора да оцени индивидуалне потребе труднице и плода, као и ризике и предности које доноси примена различитих лекова. Због тога, један од циљева наших истраживања у овој докторској тези, поред разјашњења механизма деловања пентоксифилина, пинацидила и протамин-сулфата, је био да проучимо да ли они могу да се приближе идеалном токолитуку, који ће релаксирати гравидни утерус без испољавања нежељених ефеката на мајци и плоду. До сада су се као токолотици најчешће користили **бета<sub>2</sub>- адренергички агонисти**, али и **калцијумски антагонисти**, иако им токолиза није официјелна индикација. Поред њих, у сврхе токолIZE примењује се и магнезијум-сулфат, антагонисти окситоцина и етанол. Од **бета<sub>2</sub>- адренергичких агониста** као токолотици највише се примењују *ритодрин*, *тербуталин*, *фенотерол* и *салбутамол*. Ови лекови, након везивања за бета<sub>2</sub>- адренергичке рецепторе, стимулишу аденилатну циклазу, а тиме продукцију цикличног аденозин-монофосфата (сАМР). Створени сАМР помаже фосфорилацију циљних протеина и тиме омогућава појачано депоновање калцијума у саркоплазматском ретикулуму. Овако се смањује концентрација слободног интрацелуларног калцијума, неопходног за процес контракције, па услед тога наступа олабављење глатког мишића. Међутим, бета<sub>2</sub>-адренергички агонисти су релативно селективни, тако да у извесној мери стимулишу и бета<sub>1</sub>-адренергичке рецепторе у срцу, али и другим ткивима, посебно ако се примене у високим дозама. Због тога су могући нежељени ефекти, попут тахикардије, екстрасистола, хипотензије, али и хипергликемије и хиперинсулинемије (Kalezić i sar., 1993). Због тога, велики број истраживача улаже напор да пронађе нове лекове са потенцијалним карактеристикама токолИТИКА (уосталом и наша теза је томе посвећена), укључујући блокаторе калцијумских канала, отвараचे калијумских канала и друге вазодилататоре (NO донори, пентоксифилин, протамин, миноксидил (Milovanović i sar., 2012; Novaković i sar., 2007; Jokanović i sar., 2010; Sokolović i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2011, 2012; Milovanović i sar., 2013).

**Калцијумски антагонисти**, који опуштају глатки мишић утеруса тако што спречавају улазак јона калцијума у ћелију и тиме инхибирају контракцију, су били најближи идеалном токолитуку, док за неке није нађено да проузрокују тератогене ефекте. Међутим, у токолИТИЧКЕ сврхе, иако без официјелне индикације, се годинама користе добро познати лекови из ове групе, као што су органски калцијумски антагонисти (*верапамил*, *дилтиазем* и дихидропиридински деривати/ *нифедипин* и *нитрендипин*), који су нашли своје место у терапији кардиоваскуларних оболења. Неки органски нитрати, али и други лекови, такође могу у механизму свог деловања да укључе блокаду калцијумских канала. Калцијумски антагонисти, у терапијским

концентрацијама, преваходно блокирају волтажно-зависне калцијумске канале, док на рецепторне калцијумске канале делују при знатно већим концентрацијама. Дејства антагониста калцијума најбоље су проучена на срцу и крвним судовима. Испитиван је и њихов ефект на изолованом утерусу пацова. Varagić i Milovanović (1984) су показали да верапамил и нифедипин, у наномоларним концентрацијама, изазивају инхибицију спонтане ритмичке активности изолованог утеруса. Изнето је да чак отомоларне концентрације никардипина проузрокују инхибицију спонтане ритмичке активности изолованог утеруса пацова, али и контракције глатког мишића утеруса изазване електричном стимулацијом и KCl. Они су такође показали да степен релаксантног ефекта калцијумских антагониста зависи од врсте глатког мишића, али и од типа активације изолованог утеруса пацова. Превремени порођај је велики проблем савремене гинекологије. Фармаколози у терапији нуде различите врсте токолитика, међутим, ни један од данас познатих није решио овај проблем у потпуности. Разлози за то су недовољна ефикасност и висок степен нежељених дејстава ових лекова. Бројна истраживања, укључујући и наша, се обављају у циљу проналажења нових лекова са потенцијалним карактеристикама токолитика. Испитује се и дејство већ познатих лекова на контрактилност утеруса и њихова евентуална интеракција са калцијумским или калијумским каналима (Milovanović i sar., 1988).

**Азот-моноксид (NO)**, који је медијатор и модулатор бројних процеса у организму у физиолошким и патолошким условима, може да игра значајну улогу у механизму релаксантног ефекта протамин-сулфата и других вазодилататора на глатке мишиће. NO се у ћелијама ствара под утицајем NO-синтазе (Oreščanin-Dušić i sar., 2007). Високе дозе L-аргинина повећавају проток крви кроз крвне судове срца, мезентеријума, плућа и јетре, без ефекта на укупну периферну резистенцију и крвни притисак. Међутим, L-аргинин може да проузрокује значајну хипотензију код нормотензивних пацова, али само код животиња које су претретиране са физостигмином (Prostran i sar., 1994). Забележено је повећање NO синтезе за време нормалног гравидитета животиња, као и да недостатак или смањење NO може да буде узрок вазоконстрикције и пре-еклампсије код жена. NO се карактерише са изузетном реактивношћу у односу на интрацелуларне ензиме. Као што је већ напоменуто, један од ефеката NO је активација гванилатне циклазе (GC), која се може инхибирати са метиленским плавилем (Choi i sar., 2002; Oreščanin-Dušić i sar., 2007; Jokanović i sar., 2011; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012; Stanković i sar., 2010, 2012).

Међутим, потенцијалне индикације за примену пентоксифилина, као и механизам његовог деловања на молекуларном нивоу, нису довољно проучени, због чега је овај лек последњих година био предмет, како наших интензивних истраживања изван или у оквиру ове тезе (Kordić-

Bojinović i sar., 2010; Milovanović i sar., 2013), тако и од стране других аутора (Matson i sar., 1995). У нашим претходним студијама показали смо да у механизму релаксантног деловања пентоксифилина на изолованој мезентеричној артерији пацова ендотел игра значајну улогу. У оквиру ове докторске тезе проучавали смо ефект растућих концентрација пентоксифилина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса и друге типове активације овог глатког мишића. Ради разјашњења механизма деловања пентоксифилина на глатки мишић утеруса, проучавали смо његов ефект у присуству *L*-**аргинина** (прекурсора NO синтезе), антагониста калијумских канала: *глибенкламида* (GLB), *4-аминопиридина* (4-AP) и *тетраетиламонијума* (ТЕА) и *метиленског плавила* (блокатора гванилатне циклaze). Резултате тих истраживања дискутоваћемо ниже у тексту у овом поглављу о пентоксифилину.

**Пентоксифилин** је метилксантински дериват, који се дуго користи за периферна васкуларна оболења. У нашим експериментима најпре смо пошли од испитивања дејства растућих концентрација пентоксифилина на спонтану ритмичку активност утеруса, као и на активност изазвану различитим концентрацијама калцијум-хлорида (0.018 и 0.36 mM). Показали смо да је пентоксифилин изазвао концентрацијски-зависну инхибицију спонтане ритмичке активности, као и калцијумом (са 0.018 и 0.36 mM) индуковане контракције изолованог утеруса пацова. Степен релаксантног дејства пентоксифилина зависио је од типа активације глатког мишића утеруса. Најснажнији релаксантни ефекат пентоксифилин показује на спонтано активним утерусима (најмања ED<sub>50</sub>), док је веома слаб на утерусима стимулираним Ach. Релаксантни ефекат је јасно изражен и код Ca<sup>2+</sup>- стимулираних утеруса, са потпуном релаксацијом при највишим употребљеним концентрацијама код утеруса стимулираних једноструком концентрацијом Ca<sup>2+</sup>. Активација двоструком количином калцијума смањује релаксантни ефекат пентоксифилина, тако да и при највишим употребљеним концентрацијама не долази до потпуне релаксације. У односу на спонтано активне утерусе, релаксантни ефекат пентоксифилина је слабији код Ca<sup>2+</sup>- стимулираних утеруса. Међутим, максимална инхибиција спонтане ритмичке активности и активности изазване нижом концентрацијом калцијум-хлорида (0.018 mM) додатом у медиј је постигнута са истим максималним концентрацијама пентоксифилина. С друге стране, минималну инхибицију и то тек након примене максималних концентрација (12–18 %) пентоксифилин је испољио на контракције изолованог утеруса пацова изазване ацетилхолином, што упућује на одсуство антимукаринског ефекта, односно на механизме који играју улогу у овом типу активације. Вероватно да пентоксифилин испољава слабији ефект на контракције које више зависе од интрацелуларног калцијума. У прилог овоме говоре и наши резултати у којима је пентоксифилин испољио слабији инхибиторни учинак ако је контрактилна активност изазвана вишом концентрацијом калцијума (0.36 mM). Потврдили смо

да степен инхибиторног дејства пентоксифилина, као и у нашим већ публикованим радовима, не зависи само од примењене концентрације, већ и од типа активације глатког мишића (Kordić-Bojinović i sar., 2010; Milovanović i sar., 2013).

Резултати у којима смо показали да степен инхибиторног дејства пентоксифилина зависи од типа активације глатког мишића су у складу са литературним подацима добијеним за ефекте калцијумских антагониста на контракције глатког мишића утеруса. Тако на пример, никардипин, али и други калцијумски антагонисти (нитрендипин, нифедипин, фендилин, дилтиазем), је испољио веома снажан инхибиторни ефект на контракције изолованог утеруса пацова проузроковане електричном стимулацијом, знатно слабији ефект на спонтану ритмичку активност и контракције изазване ацетилхолином, а најслабији на активност утеруса проузроковану окситоцином (Varagić i sar., 1984; Milovanović i sar., 1988). Верапамил је, такође, најснажније инхибисао спонтану ритмичку активност, потом контракције утеруса проузроковане електричном стимулацијом и KCl-ом, а најслабије контракције изолованог утеруса пацова изазване окситоцином (Milovanović i Varagić, 1984). Од свих испитиваних калцијумских антагониста најснажнији ефект је испољио никардипин, као и нитрендипин. За инхибицију спонтане ритмичке активности изолованог утеруса биле су довољне чак фентомоларне концентрације. Насупрот томе, у случају верапамила и дилтиазема, чији је степен релаксантног ефекта такође зависио од типа мишићне активације, за комплетну инхибицију спонтане ритмичке активности утеруса биле су потребне наномоларне или микромоларне концентрације (Milovanović i Varagić, 1984; Milovanović i sar., 1987, 1988). У поређењу са пентоксифилином, степен инхибиторног ефекта калцијумских антагониста на глатком мишићу утеруса је био знатно јаче изражен и кретао се од отомоларних до микромоларних концентрација.

Објашњење за постојање разлика у релаксантном ефекту ових калцијумских антагониста на различите типове активације глатке мускулатуре утеруса једним делом лежи у различитој дистрибуцији јонских канала и промету калијума и калцијума, који очигледно различитим путевима и механизмима доводе до контракције у зависности од стимулативног сигнала. Спонтана ритмичка мишићна активност се остварује, највећим делом, уласком калцијума у ћелију кроз волтажне калцијумске канале ћелијске мембране из екстрацелуларног простора. Када се ради о утицају калцијумских антагониста на спонтану ритмичку активност, Milovanović i saradnici (2009) су још утврдили да степен релаксантног ефекта ових лекова зависи од тога да ли је у питању циркуларни или лонгитудинални мишић утеруса. Тако на пример, за инхибицију спонтане ритмичке активности циркуларног мишића биле су неопходне знатно више концентрације никардипина и верапамила него за релаксацију лонгитудиналног слоја утеруса.

Неки други типови активације мишића (изазвани ацетилхолином или окситоцином) више зависе од интрацелуларног калцијума смештеног у депоима ћелије или калцијума који доспева у ћелију активацијом мускаринских или окситоцинских рецептора (Varagić i sar., 1984).

***Утицај пентоксифилина у присуству L-аргинина и метиленског плавила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом***

Ефект L-аргинина на повећање протока крви кроз крвне судове срца, мезентеријума, плућа и јетре, без промена укупног периферног отпора и крвног притиска, може се антагонизовати са L-NAME (Van Geldern i sar., 1991). Обзиром да је L-аргинин супстрат за ензим NO синтазу, он може да повећа концентрацију азотног оксида и доводе до релаксације глатких мишићних ћелија. На анималним и хуманим моделима је показано да у случајевима ендотелне дисфункције и неспособности продукције NO, L-аргинин успоставља ендотел-зависну релаксацију. L-аргинин, међутим, може изазвати и значајну хипотензију код нормотензивних пацова, али само код животиња претретираних физостигмином (Prostran i sar., 1994). Публиковани су и подаци да у *in vitro* условима L-аргинин може да антагонизује релаксацију изазвану Na-нитропрусидом (Oreščanin i sar., 2006; Oreščanin i Milovanović, 2006).

Међутим, за разлику од налаза Oreščanin i saradnika из 2006. године, у нашим експериментима L-аргинин није антагонизовао релаксантни ефект пентоксифилина на спонтаној ритмичкој активности изолованог утерусу пацова. Овај наш резултат сугерише да пентоксифин вероватно остварује своје релаксантно дејство на утерусу независно од присуства азотног оксида. Међутим, на калцијумском типу активације изолованог утеруса, L-аргинин је потенцирао релаксантни ефект пентоксифилина. Насупрот овим резултатима, у експериментима (такође у нашој лабораторији) на изолованим бубрежним и мезентеричним артеријама узетим како од нормотензивних (NT), тако и од хипертензивних пацова (HT), утврђено је да L-аргинин чак антагонизује релаксацију изазвану натријум-нитропрусидом (SNP). Могуће објашњење запажене појаве аутори виде у могућности да натријум-нитропрусид остварује своје дејство преко пероксинитрита, а не преко S-нитрозотиола (Oreščanin i Milovanović, 2004). Релаксантни ефект SNP је био јаче изражен на крвним судовима узетим од NT ( $10^{-5}$  M SNP проузрокује 220 % релаксације са ендотелом и 240 % без ендотела) у поређењу са SH пацовима (100% релаксације са ендотелом и 150% без). L-аргинин је антагонизовао релаксантни ефект SNP у испитиваним реналним артеријама више код нормотензивних (100–160% са ендотелом и 110–195% без) него код хипертензивних пацова (0–10% са ендотелом и 35–75% без), са концентрацијама SNP од  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M). L-аргинин није значајније мењао релаксантни ефект SNP на изолованим реналним артеријама са ендотелом узетим од хипертензивних пацова (HT), што

показује да L-аргинин, хемијском модификацијом NO у редокс активне форме -нитросониум ( $\text{NO}^+$ ) и -нитроксил ( $\text{NO}^-$ ), прозрокује различите релаксантне ефекте код нормотензивних и хипертензивних пацова на изолованим артеријама са или без ендотела, потенцирајући улогу нитроксил индуковане релаксације SH пацова (Khan i sar., 2000; Oreščanin i Milovanović, 2006). Теравчевић i saradnici (2008) су показали да је SNP у стању да релаксира не само крвне судове и утерус, већ и глатки мишић изолованог илеума заморца, уз потврду о значају улоге NO у одвијању перисталтике гастроинтестиналног тракта.

**Метиленско правило инхибира стварање cGMP** тиме што спречава интеракцију NO са гванилатном циклазом. Резултати наших експеримената показују да метиленско правило смањује релаксантни ефекат пентоксифилина. Ни највиша примењена концентрација пентоксифилина није довела до потпуног престанка контракција. Интересантно је и да је инхибиција коју изазива пентоксифин у присуству метиленског правила краткотрајна. Наиме, додавање пентоксифилина инхибисало је контракције утеруса, али инхибиција је брзо нестајала и амплитуде записа контракција су се увећавале.

У складу са нашим резултатима је и податак да метиленско правило антагонизује релаксантни ефекат Na-нитропрусида на изолованим крвним судовима (Oreščanin i sar., 2007.). Метиленско правило онемогућава активацију гванилатне циклазе (а тиме и продукцију cGMP- цикличног гванозин монофосфата) и на тај начин спречава релаксацију мишића. cGMP активира cGMP-зависну протеинкиназу, која спречава улазак јона калцијума, активира калијумске канале и смањује ниво  $\text{IP}_3$ , што на крају доводи до вазодилатације. Ипак, показано је да метиленско правило не може да антагонизује релаксантно дејство натријум-азида и нитроглицерола (Milovanović i sar., 1985).

За разлику од метиленског правила (блокатор гванилатне циклазе), L-аргинин (прекурсор синтезе NO) не антагонизује релаксантни ефекат пентоксифилина на контракције изолованог утеруса пацова, осим делимично на спонтану ритмичку активност (не мењајући његов максимални инхибиторни ефекат). Утицај наведених модулатора активности пентоксифилина може да укаже на могући механизам деловања пентоксифилина у глатким мишићним ћелијама утеруса. NO, за разлику од изолованих крвних судова, највероватније није значајније укључен у релаксантни ефекат пентоксифилина на утерусу, пошто пентоксифин у присуству L-аргинина не доводи до значајније промене степена инхибиције контракција. Обзиром да је у нашим експериментима показано да метиленско правило антагонизује релаксантно дејство пентоксифилина, може се закључити да је у механизам релаксантног дејства пентоксифилина на глатки мишић утеруса највероватније укључен и сигнални пут са cGMP, независан од NO. Пентоксифин се у многим радовима наводи као блокатор фосфодиестеразе (Calogero i sar., 1998), који посредно, повећавањем нивоа cAMP-а, доводи до релаксације мишићне ћелије (Calogero i sar., 1998).

Ови наши резултати могу да означе пентоксифилин као могући лек који би се користио за превенцију превремених порођаја и побачаја. Будући експерименти би имали за циљ да покажу да ли пентоксифилин доводи до оваквог дејства и у *in vivo* експериментима и да ли испољава нежељене ефекте. Уколико би показао задовољавајуће резултате, уочени релаксантни ефекат пентоксифилина могао би да се користи за спречавање превремених порођајних контракција.

***Утицај блокатора калијумских канала (глибенкламида, 4-аминопиридина и тетраетиламонијума) на релаксантни ефект пентоксифилина на спонтаној ритмичкој активности и на контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом***

У истраживањима релаксантног ефекта пентоксифилина, желели смо да проучимо и евентуалну улогу калијумских канала у том ефекту. Калијумски канали су богато заступљени у глатким мишићима утеруса (Gojković-Bukarica *i sar.*, 1999; Novaković *i sar.*, 2007; Oreščanin *i Milovanović*, 2008; Jokanović *i sar.*, 2010; Sanborn *i sar.*, 2000). Најновији резултати показују да неки познати снажни вазодилататори, попут натријум-нитропрусида (донор NO) или миноксидила, у свом механизму укључују отварање калијумских канала (Schubert *i sar.*, 2004; Jokanović *i sar.*, 2009; Sokolović *i sar.*, 2012). Један од најбоље проучених типова калијумских канала, доминантан у глаткој мускулатури утеруса, је *велики калцијум зависни калијумски канал - BK<sub>Ca</sub> или tax1 K*. Током гестационог периода њихов значај се још више увећава, а нарочито током порођаја, јер се њиховом инхибицијом обезбеђује повећани ниво интрацелуларног Ca<sup>2+</sup>, неопходног за порођајне контракције (Khan *i sar.*, 1993, 1998, 2000, 2001). Такође, значајна је улога *АТФ-зависних калијумских (K<sub>АТФ</sub>) канала* у глаткој мускулатури утеруса, који чине спону између метаболичког стања ћелије и побуђености ћелије односно контрактилности (Morrison *i sar.*, 1993; Piper *i sar.*, 1990; Khan *i sar.*, 1998, 2001). Изгледа да су K<sub>АТФ</sub> канали активни само у метаболички компромитованој ћелији, што представља додатни изазов када је у питању проучавање контрактилности утеруса и јонских канала који су укључени у тај процес. Промене експресије и активности калијумових канала имају велики значај за контролу утерусне контрактилности. (Novaković *i sar.*, 2007). Тако на пример, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> индукује концентрацијски-зависну релаксацију изолованог утеруса пацова преко „*волтажно-зависних калијумских канала*“ (Arriah *i sar.*, 2009, 2012). У светлу ових сазнања, испитивање утицаја модулятора калијумских канала и њихове интеракције са NO на ткиво утеруса је значајно, како за испитивање физиологије и патофизиологије утеруса, тако и за проналажење нових терапијских концепата у лечењу поремећаја контрактилности утеруса (Milovanovic *i sar.*, 1988; Novaković *i sar.*, 2007; Kordić-Bojinović *i sar.*, 2010, 2011, 2012).

Са детаљним упознавањем  $K^+$  канала јавио се и огроман фармацеутски интерес, који је утицао на синтезу и развој селективних модулатора  $K^+$  канала, као и ре-евалуацију постојећег избора лекова и супстанци са утицајем на пропустљивост ћелијске мембране глатког мишића за  $K^+$  јоне (посебно вазодилататори са тзв. директним деловањем: пентоксифилин, миноксидил, диазоксид и др.).

Обзиром да нема података да ли у механизму деловања пентоксифилина, осим механизма који укључује NO/cGMP, учествују и калијумски канали, испитивали смо његов релаксантни ефект на спонтану ритмичку активност негравидног утеруса пацова и фазну активност проузроковану калцијумом, најпре у присуству различитих концентрација глибенкламида (GLB) (блокатора отварања  $K_{ATP}$  канала), а потом 4-аминопиридина (4AP) (блокатора  $VK_{Ca}$ ) и тетраетиламонијума (TEA) (блокатора волтажно зависних  $Ca^{2+}$  канала).

У овим експериментима са испитивањем утицаја блокатора калијумских канала: глибенкламида/ GLB (блокатор отварања  $K_{ATP}$  канала), 4-аминопиридина/4AP (блокатор  $VK_{Ca}$ ) и тетраетиламонијума/TEA (блокатор волтажно зависних  $Ca^{2+}$  канала) на релаксантни ефект пентоксифилина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом показали смо да у механизму релаксантног деловања пентоксифилина калијумски канали не играју значајну улогу као што је то у случају пинацидила или протамина. Генерално, може се рећи да у релаксантном ефекту пентоксифилина на оба типа активације отварање  $K_{ATP}$  канала није од значаја.

Претретман глибенкламидом, блокатором  $K_{ATP}$  канала, чак доводи до статистички значајног повећања релаксантног ефекта пентоксифилина (статистички значајно нижа  $ED_{50}$  и другачији нагиб криве исказан преко F-теста), што значи да је ефект јачи у присуству овог селективног блокатора  $K_{ATP}$  калијумских канала. Комплетну инхибицију контракција добили смо и при мањим концентрацијама пентоксифилина. Глибенкламид, као антагонист ове врсте калијумских канала, доводи до продужене деполаризације спречавајући излазну струју калијума одговорну за реполаризацију ћелијске мембране. С друге стране, претретман са 4AP (блокатор  $VK_{Ca}$ ) значајно смањује релаксантни ефекат пентоксифилина на спонтану ритмичку активност, нарочито у опсегу нижих доза (што је статистички исказано F-тестом), али не мења релаксантни ефекат највише дозе пентоксифилина. На калцијумском типу активације, TEA (блокатор волтажно зависних  $Ca^{2+}$  канала) смањује релаксантни ефекат пентоксифилина (статистички значајна разлика  $ED_{50}$  вредности у односу на сам пентоксифилин) највише због његове ефикасности у нижим дозама, док претретман са 4AP доводи до смањења релаксантног ефекта у вишим концентрацијама пентоксифилина, тако да се у присуству 4AP није могао постићи његов максимални релаксантни ефекат (F-тест;  $p < 0.05$ ).



На основу изнетог, може се рећи да у механизму релаксантног деловања пентоксифилина није заступљено отварање  $K_{ATP}$  канала. Међутим, отварање  $ВК_{Ca}$  и волтажно зависних  $Ca^{2+}$  канала има извештан значај, али у различитом степену, у механизму релаксантног ефекта пентоксифилина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом.

Додатна потврда о доминацији  $NO$  пута у механизму релаксантног ефекта пентоксифилина су наши већ описани резултати у присуству  $ВКК$  ( $GLB$ ,  $TEA$  и  $4AP$ ), у којима смо показали да отварање калијумских канала не игра значајну улогу у механизму његовог деловања, посебно не  $K_{ATP}$  канали. Обзиром на чињеницу да релаксантни ефект пентоксифилина зависи и од концентрације калцијума (слабији ако је контрактилна активност изазвана са  $0.36$   $mM$  у односу на  $0.018$   $mM$ ), може се рећи и да пентоксифилин, у извесној мери, делује као калцијумски антагонист. Наши резултати такође указују да би пентоксифилин могао да буде потенцијални токолитик. Међутим, за доношење дефинитивног закључка, неопходно је извршити испитивања релаксантног дејства пентоксифилина на утерус у *in vivo* условима, уз праћење евентуалних нежељених ефеката.

Међутим, вреди још једном се осврнути на наш резултат да је глибенкламид, селективни блокатор  $K_{ATP}$  канала, статистички значајно потенцирао релаксантни ефект пентоксифилина, јер је комплетна инхибиција спонтаних контракција настала при нижим концентрацијама пентоксифилина. Из ове чињенице се може закључити да у механизму његовог релаксантног деловања није заступљено отварање  $K_{ATP}$  канала, као што је то случај са неким другим вазодилаторима, попут миноксидила и пинацидила. Вероватно, глибенкламид као антагонист ове врсте калијумских канала доводи до продужене деполаризације спречавајући излазну струју калијума одговорну за реполаризацију ћелијске мембране. Са друге стране, показано је да глибенкламид доводи до инхибиције контракција изолованих артерија, вероватно интерагујући са волтажно-зависним калцијумовим каналима и блокирајући их (Crosbie, 2000). Наше резултате могли бисмо да покушамо да протумачимо на исти начин. Могуће је да глибенкламид подстиче релаксантни ефекат пентоксифилина тако што блокира волтажно-зависне калцијумске канале, чиме смањује улазак калцијума у ћелију, што доводи до релаксације мишића.

У овој серији наших експеримената установили смо да сва три блокатора  $K^+$  канала које смо користили у експериментима антагонизују у извесној мери инхибиторни ефект пентоксифилина на спонтану ритмичку активност негравидног утеруса пацова и фазну активност проузроковану калцијумом. Међутим, за разлику од наших резултата са протамином, пинацидилом или у експериментима са миноксидилом (mag. rad Jokanović, 2011), глибенкламид је испољио најслабији (статистички несигнификантан) антагонистички ефекат у концентрацији  $3$   $mmol/L$ , док су се код  $4AP$  и  $TEA$  тек концентрације  $3$   $mmol/L$  показале нешто ефикасније. Међутим,

једино је 4-АР нешто значајније инхибисао инхибиторни ефект пентоксифилина. Ови наши резултати указују да у механизму релаксантног деловања пентоксифилина нису значајније заступљени калијумски канали, осим у малој мери  $ВК_{Ca}$ . Насупрот томе, у механизму деловања пинацидила, како у нашим (Kordić-Bojinović i sar., 2012), тако и у резултатима других аутора (Novaković i sar., 2007; Jokanović i sar., 2010; Sokolović i sar., 2012), је показано да учествују калијумски канали, посебно  $K_{ATP}$  канали.

Неке разлике у нашим резултатима и резултатима наведених аутора, што се тичу блокатора калијумских канала, могу се објаснити коришћењем различитих типова активације изолованог утеруса, који могу на различити начин да модулирају поједине субтипове калијумских канала.

Такође, и релаксантни ефект вазодилататора миноксидила се највећим делом остварује путем отварања  $K_{ATP}$  канала, јер је глибенкламид испољио најснажнији антагонистички ефект. Међутим, Jokanović i saradnici (2012), али и ми у нашим експериментима (Kordić-Bojinović i sar., 2012), показали смо да у релаксантном ефекту миноксидила (кога данас сврставају у отварааче калијумских канала), односно пинацидила, поред АТР канала, учествују и други калијумски канали, посебно ако су примењене високе концентрације ових отвараача калијумских канала. Ако се упоредно анализирају концентрацијски-зависне криве за миноксидил у присуству сваког од ових блокатора у испитиваним концентрацијама, може се уочити да је најизраженију блокаду релаксантног ефекта миноксидила испољио глибенкламид, али само при концентрацијама мањим од 10 mmol/L (Sokolović i sar., 2012).

Релаксантни ефект највеће коришћене концентрације миноксидила од 10 mmol/L није било могуће антагонизовати ни једним од наведених блокатора. То је разлог због ког су вредности средњих ефективних концентрација миноксидила у присуству наведених блокатора ( $EC_{50}$ ) односно вредности њиховог негативног логаритма  $pD_2$  ( $pD_2 = -\log EC_{50}$ ) биле блиске.  $pD_2$  вредност миноксидила у присуству GLB 3  $\mu\text{mol/L}$  је износила 4,43, у присуству 4АР 3 mmol/L је износила 4,53, док је у присуству ТЕА 3 mmol/L вредност  $pD_2$  износила 4,47. Међусобни односи  $EC_{50}$  вредности миноксидила у присуству GLB, 4АР и ТЕА ( $CR$  вредности) указују да не постоји статистички значајна разлика ( $CR < 3$ ) између инхибиторног ефекта миноксидила у присуству ова три блокатора (Sokolović i sar., 2012).

Глибенкламид у односу на 4-аминопиридин и тетраетиламонијум је у нижим концентрацијама антагонизовао релаксантни ефект миноксидила на спонтаној ритмичкој активности. Поред тога, глибенкламид је најснажније антагонизовао релаксантни ефект миноксидила у најнижој примењеној концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ . С друге стране, 4АР ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  и  $3 \times 10^{-3}$  mol/L) - селективни блокатор волтажно-зависних  $K^+$  канала и тетраетиламонијум ТЕА ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  и  $3 \times 10^{-3}$  mol/L) - неспецифични блокатор  $ВК_{Ca}$  и волтажно зависних  $Ca^{2+}$  канала, концентрацијски

независно инхибирају релаксантни ефект миноксидила и то тек у милимоларним концентрацијама (Jokanović, 2011; Sokolović i sar., 2012).

Резултати ових експеримената наведених аутора са применом различитих блокатора калијумских канала, за разлику од наших експеримената са пентоксифилином, указују да у механизму релаксантног ефекта миноксидила у већој мери играју улогу  $K_{ATP}$  него  $VK_{Ca}$  и волтажно-зависни  $Ca^{2+}$  канали, посебно кад су у питању ниске концентрације овог вазодилататора. У прилог овом закључку говоре и резултати са глибенкалмидом, у којима је показано да је његов антагонистички ефект специфичнији, јер је блокада ефекта миноксидила постигнута са ниским концентрацијама овог блокатора. Више концентрације глибенкламида нису ефикасније у односу на концентрацију од  $3 \mu\text{mol/L}$ . Међутим, релаксантни ефект највише испитиване концентрације миноксидила од  $10 \text{ mM}$ , која је доводила до комплетне инхибиције спонтане ритмичке активности изолованог утеруса пацова (осим делом на калцијумском типу активације), није се могао антагонизовати ни са једним од испитиваних блокатора калијумских канала, као и у експериментима са пинацидилем, што је додатни доказ да у механизму релаксантног ефекта ових отварача калијумских канала учествују и други механизми.

## ПРОТАМИН СУЛФАТ

Потамин-сулфат (PS), који је мешавина полиамина, а користи се како би поништио антикоагулантни ефекат хепарина, често проузрокује вазодилатацију и системску хипотензију као нежељени ефект. Откривено је да протамин-сулфат испољава значајан ендотел зависни релаксантни ефекат на изолованим крвним судовима, те је стога циљ наших ранијих експеримената са овом супстанцијом био да се испита механизам релаксантног ефекта протамин-сулфата на изолованим реналним и мезентеричним артеријама узетим од нормотензивних и хипертензивних пацова. Показано је да протамин-сулфат проузрокује концентрацијски и ендотел зависну релаксацију изолованих реналних и мезентеричних артерија нормотензивних и хипертензивних пацова које су преконтраховане фенилефрином ( $10^{-6} \text{ mol}$ ), а очуваност васкуларног ендотела је потврђивана ацетилхолином ( $10^{-5} \text{ mol}$ ) и хистопатолошким испитивањем. Разлог за овакав ефекат протамина је, вероватно, његово стимулативно деловање на ослобађање NO, што може бити главни разлог системске хипотензије која се јавља током инфузије протамина. Ово се дешава такође захваљујући активацији ендотелне NO-синтазе.

Горе описани резултати су били изазов да у нашим експериментима (у оквиру ове докторске тезе) испитамо да ли је протамин-сулфат, који као што је напоменуто изазива значајан ендотел-зависан вазорелаксантни ефекат, у стању да релаксира и друге глатке мишиће, укључујући и утерус, као и да проучимо механизам његовог релаксантног деловања на овом глатком мишићу, односно да утврдимо његов токолитички потенцијал, посебно у односу на пентоксифилин и

пинацидил. Због тога смо у овој првој серији експеримената испитивали утицај различитих типова активације изолованог утеруса пацова (спонтана ритмичка активност и контракције изазване електричном стимулацијом, ацетилхолином и калцијумом) на релаксантни ефекат растућих концентрација протамин-сулфата. Такође је проучаван овај ефекат протамин-сулфата на овом глатком мишићу у присуству метиленског плавила и блокатора калијумских канала (ВКК).

У садашњим експериментима смо показали да растуће концентрације PS, од 10 до 400  $\mu\text{g/ml}$ , проузрокују концентрацијски зависну инхибицију испитиваних типова активације утеруса пацова (ниже концентрације од 10 до 20  $\mu\text{g/ml}$  су без ефекта, док веће изазивају потпуну релаксацију). Релаксантни ефект протамин-сулфата зависи од типа активације и био је јаче изражен на спонтаној ритмичкој активности него на контракцијама изолованог утеруса проузрокованим калцијумом. Најслабији релаксантни ефект протамин-сулфат је испољио на контракције проузроковане ацетилхолином, код којих највиша концентрација од 600  $\mu\text{g/mL}$  не доводи до потпуне релаксације (испод 50%), (ANOVA, ефекат концентрације протамин-сулфата,  $p < 0.001$ ). Овакав ефекат је јасан и када се упореде  $ED_{50}$  вредности:  $ED_{50}$  дозе релаксације протамин-сулфата за спонтани и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуковани тип активације се статистички значајно разликују ( $p < 0.001$ ). За ACh-индуковане утерусе није израчуната  $ED_{50}$  вредност због недостатка података о концентрацијама које показују максималан релаксантни ефекат (више од 80% за опсег апликованих доза). Механизам деловања је највероватније независан од  $K_{\text{ATP}}$  канала.

Обзиром да је откривено да протамин-сулфат испољава значајан ендотел зависни релаксантни ефекат на изолованим крвним судовима, испитиван је у нашој лабораторији и његов механизам релаксантног ефекта на изолованим реналним и мезентеричним артеријама узетим од нормотензивних и хипертензивних пацова. Показано је да протамин-сулфат проузрокује концентрацијски- и ендотел- зависну релаксацију изолованих реналних и мезентеричних артерија нормотензивних и хипертензивних пацова које су преконтраховане фенилефрином. Разлог за овакав ефекат протамина је, вероватно, његово стимулативно деловање на ослобађање NO, што може бити главни разлог системске хипотензије која се јавља током инфузије протамина. Ово се дешава такође захваљујући активацији ендотелне NO-синтазе. Oreščanin i Milovanović (2004) су такође показали да протамин проузрокује снажнији релаксантни ефекат на крвним судовима узетим од нормотензивних него од хипертензивних пацова, вероватно због боље очуваности ендотела на тим крвним судовима. Како је релаксантни ефекат био слабији код SH пацова у поређењу са нормотензивним, ови резултати указују да, поред васкуларног ендотела, глатки мишићи крвних судова имају веома значајну улогу у PS-посредованој релаксацији. Инхибиција  $K_{\text{ATP}}$  канала глибенкламидом може потенцирати ефекат PS, што

додатно указује да, осим ендотела, постоје и неки други механизми релаксације који се укључују када су калијумски канали блокирани. У случају спроводних артерија релаксанти ефекат протамин-сулфата се дешава путем ослобађања NO-а, а код малих крвних судова путем ослобађања ендотелног хиперполаришућег фактора (EDHF).

Као што смо напоменули, показали смо да протамин-сулфат проузрокује концентрацијски-зависну релаксацију глатког мишића утеруса, вероватно стимулативним деловањем на ослобађање азот-моноксида путем активације ендотелне NO-синтазе. На овај закључак нас наводи чињеница да присуство метиленског плавила (инхибитор cGMP-а), односно пропранолола (инхибитор синтезе cAMP-а), није утицало на релаксанти ефекат протамина.

Oreščanin-Dušić i saradnici (2008) су врло сериозно проучавали механизам инхибиције спонтаних ритмичких контрација изолованог утеруса пацова са протамином (PS) *in vitro* у присуству различитих агониста и антагониста. Претходни резултати у лабораторији ових аутора су показали да PS проузрокује дозно-зависну релаксацију, како спонтане, тако и калцијумом индуковане активности изолованог утеруса, предоминатно преко калијумских канала и, у мањој мери, преко адренергичких рецептора или NO-зависних путева. Претретман са N(G)-нитро-L-аргинин метил естром (L-NAME), инхибитором NOS ( $10^{-5}$  M) и пропранололом (5  $\mu\text{g/ml}$ ), блокатором синтезе цикличног аденозин монофосфата (cAMP), потенцирао је инхибиторни ефект PS на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова. Насупрот томе, тетраетиламонијум (ТЕА, 6 mM), широко распрострањен инхибитор  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  канала, смањује релаксацију изазвану протамином. Међутим, метиленско плавило (MB) (0.3  $\mu\text{g/ml}$ ), инхибитор цикличног гванозин монофосфата (cGMP), глибенкламид (GLB) (2  $\mu\text{M}$ ), селективни блокатор АТР-сензитивних  $\text{K}^+$  канала и 4-аминопиридин (4-AP) (1mM), блокатор волтажно-сензитивних  $\text{K}^+$  канала, нису испољили значајан ефект на релаксацију индуковану PS. На основу горе наведених резултата Oreščanin-Dušić i saradnika (2008), закључили смо да се релаксанти утицај PS може одиграти уз помоћ cAMP и cGMP посредоване фосфорилације, али и кроз већу проводљивост/активацију *калцијум-зависних калијумских канала ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ )*.

***Утицај претретмана са различитим блокаторима (ТЕА, 4АР и глибенкламид) калијумских канала (ВКК) на релаксантни ефект растућих концентрација протамина на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом***

***Утицај претретмана са глибенкламидом на релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтаним и  $Ca^{2+}$  индукованим контракцијама изолованог утеруса***

Претретман спонтано активних утеруса са глибенкламидом ( $10^{-5}$  и  $2 \times 10^{-6}$  М) не мења концентрацијски- зависну релаксацију изазвану протамин-сулфатом (нема ефекта третмана ANOVA). Осим тога, ни сигмоидално фитоване криве, ни праве регресије, тестиране обе F-тестом, а ни ED<sub>50</sub> вредности (тестирани једнофакторском анализом варијансе и post-hoc Tukey's - тестом) се не разликују међусобно. С друге стране, присуство глибенкламида у концентрацији од  $2 \times 10^{-6}$  М проузроковало је смањење релаксантног ефекта протамин-сулфата на контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом, док претретман са глибенкламидом у концентрацији од  $10^{-5}$  М није имао статистички значајан ефекат на протамин-сулфат посредовану релаксацију (статистички значајан ефекат третмана у ANOVA, статистички значајна разлика у ED<sub>50</sub> вредности за утерусе претретиране са глибенкламидом у концентрацији  $2 \times 10^{-6}$  М). Код  $Ca^{2+}$ -индукованог типа активације утеруса, екстраполација података у сигмоидални фит је статистички значајна ( $Chi^2/df < 0.05$ ), док је регресиони на ивици значајности ( $p < 0.05$ ). Осим тога, поређење F-тестом је код сигмоидалног начина екстраполације показало статистички значајну различитост криви релаксације између самог протамин-сулфата и претретмана са глибенкламидом дозе  $2 \times 10^{-6}$  М, док је такав ефекат код регресионог модела изостао.

***Утицај претретмана тетра-етил-амонијумом (ТЕА) на релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтаним и  $Ca^{2+}$  -индукованим контракцијама изолованог утеруса***

Претретман са ТЕА ( $6 \times 10^{-3}$  М) доводи до статистички значајног смањења релаксантног ефекта протамин-сулфата и код спонтано и код  $Ca^{2+}$ -индукованог типа активације утеруса (статистички значајан ефекат третмана (ТЕА) у трофакторској ANOVA,  $p < 0.001$ ). Утицај ТЕА је већи код  $Ca^{2+}$ -индукованог типа контракција изолованог утеруса, што се види из статистички значајног ефекта интеракције PS x T у ANOVA. Исти тренд показује и анализа ED<sub>50</sub> вредности (статистички значајно виша ED<sub>50</sub> је за дозу протамин-сулфата код ТЕА претретраних утеруса у односу на сам протамин-сулфат, с тим што је повећање ED<sub>50</sub> много више код  $Ca^{2+}$ -индукованог типа активације утеруса, као и тестирање сличности сигмоидално фитованих криви F-тестом

(значајно се разликују криве за PS релаксацију спонтано активних утеруса у односу на претретиране са ТЕА, као и  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих и релаксираних са PS у односу на претретиране са ТЕА). Сигмоидални фит за криве релаксације спонтано активних утеруса је статистички значајан и за претретман утеруса са ТЕА ( $\text{Chi}^2/\text{DoF} < 0.01$ ). Код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих утеруса, сигмоидални фит релаксације није добар ни у случају претретмана са ТЕА ( $\text{Chi}^2/\text{dF} = 0.1056$ ), те је урађена и регресиона анализа. Регресиона анализа је статистички значајна код релаксације спонтано активних утеруса третираних растућим концентрацијама протамин-сулфата, док је слаба или незначајна код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих. Претретман са ТЕА доводи до смањења нагиба и тежи вишим потребним дозама протамин-сулфата за релаксацију, али F-тест није показао значајне разлике између кривих.

***Утицај претретмана 4-амино-пиридином (4AP) на релаксацију спонтано и  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса***

Претретман активних утеруса са 4AP није имао утицај на концентрацијски зависну релаксацију посредовану протамин-сулфатом код спонтано активних утеруса (непостојање статистички значајних ефеката третмана у трофакторској анализи варијансе). Претретман  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса са 4AP делимично је антагонизовао релаксацију изазвану протамин-сулфатом, али ефекат није статистички значајан (непостојање статистичке значајности ефекта третмана, нити интеракције T x PS у трофакторској ANOVA, као ни статистичке значајности разлике у  $\text{ED}_{50}$  вредностима код сигмоидалног фитовања, ни разлике сигмоидалних кривих тестираних F-тестом). Као и у ранијим експериментима, релаксантни ефекат PS код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса се не може добро екстраполирати сигмоидалним начином и криве које се добију нису као модел статистички значајне (због недостатка потпуне релаксације на највишим употребљеним дозама PS у овом експерименту). Стога, ни разлике у  $\text{ED}_{50}$  вредностима протамин-сулфата са и без претретмана са 4AP код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса услед велике грешке и не дају статистички значајну различитост међу собом. Поређење сигмоидалних кривих F-тестом је само потврдило различитост релаксантног ефекта протамин-сулфата код спонтаних и  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих утеруса, али без значајног ефекта претретмана са 4AP. Екстраполација регресионом анализом само потврђује горе наведене закључке: модел је значајан само код спонтано активних утеруса, али без ефекта претретмана са 4AP на концентрацијски зависну релаксацију индуковану протамин-сулфатом. Ефекат постоји код  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованих активних утеруса, али је на ивици статистичке значајности ( $p < 0.05$ ), као смањење нагиба код регресионих правих услед релативно велике грешке.

На основу експеримената са испитивањем инхибиторног ефекта протамин-сулфата у присуству GLB, 4-AP и TEA, може се закључити да његов релаксантни ефект само делом зависи од отварања калијумских канала. У експериментима на спонтано активним утерусима, само је претретман са TEA делимично антагонизовао релаксантни ефекат протамин-сулфата, што значи да код релаксације на овом типу активације нису укључени АТР калијумски канали, а само делимично  $ВК_{Ca}$ . С друге стране, код  $Ca^{2+}$ -индукованог типа активације утеруса, само претретман са вишим концентрацијама глибенкламида ( $2 \times 10^{-6}M$ ), а TEA и 4AP само делимично (што зависи од начина обраде резултата), антагонизују релаксантни ефекат протамин-сулфата. Претретман са метиленским плавилом (спречавањем интеракције NO са гванилатном циклазом и инхибицијом синтезе cGMP) значајно антагонизује релаксантни ефект растућих концентрација протамин-сулфата, што значи да у механизму његовог релаксантног дејства на глатки мишић утеруса учествује и сигнални пут са cGMP.

### ***Ефект протамин-сулфата у присуству индометацина***

Претходни резултати у нашој лабораторији, али и садашњи у оквиру ове докторске тезе, указују да протамин-сулфат (PS) изазива концентрацијски-зависну релаксацију, како спонтане, тако и калцијум индуковане активности изолованог утеруса, преодоминантно путем калијумских канала и, у мањој мери, преко адренергичких рецептора, посредством азот-моноксид (NO)-зависних путева.

Познато је да је индометацин неселективни инхибитор циклооксигеназе (COX 1 и COX 2), који је у стању да спречи превремени порођај, редуковањем материчних контракција кроз инхибицију синтезе простагландина у утерусу. У жељи да разјаснимо прецизан механизам релаксантног деловања протамина, испитивали смо у којој мери је укључен циклооксигеназни пут. У ту сврху смо испитивали његов инхибиторни ефект у присуству индометацина (0.1 и 1  $\mu g/ml$ ). У нашим експериментима показали смо да индометацински претретман, сам по себи, не мења активност утеруса. Међутим, претретман са индометацином значајно је потенцирао релаксантни ефект протамина на спонтаним ритмичким контракцијама изолованог утеруса пацова, док је његов ефект на активност индуковану калцијумом смањивао.

Поред тога, показали смо да претретман са индометацином повећава активност CuZnSOD и слабо повећава активност GR за време спонтаних контракција утеруса, у поређењу са применом самог протамина. За време контракција изолованог утеруса пацова изазваних калцијумом, претретман са индометацином је повећавао активност CuZnSOD, GSH-Px и GR. Наши резултати су показали да у условима инхибиције COX ензима, индометацин може да утиче на ефекте протамина (Kordić-Bojinović i sar., 2011).



## ПИНАЦИДИЛ

Физиолошки процес који доводи до почетка порођаја у предвиђеном термину, као и патофизиолошка основа превременог порођаја или побачаја, још увек су предмет фундаменталне и клиничке фармакологије и поред бројних података који постоје о томе. Правилно развијање трудноће захтева тзв. мировање утеруса, односно релаксацију овог глатког мишића. Неопходна је и равнотежа између рецептора чијом стимулацијом настаје контракција (мускарински, алфа адренергички, хистамински и др.) и оних помоћу којих се остварује релаксација, а то су, пре свега, бета<sub>2</sub>-адренергички рецептори. На ту равнотежу утичу, како ендокрини, тако и егзокрини фактори. На срећу, постоје и лекови који могу да коригују поремећај те равнотеже и постигну успостављање доминације релаксације над контракцијом миометријума. У такве сврхе може највише да послужи примена прогестерона, као и токолитика, лекова који су у стању да релаксирају гравидни утерус. Због тога, ова докторска теза има за циљ да наговести могућу примену и других лекова у те сврхе, посебно оних који отварају калијумске канале, или оних који њиховом модулацијом, као и/или интеракцијом са NO, стварају услове за релаксацију миометријума. У те сврхе смо се трудили да појаснимо механизам деловања познатих супстанција: пентоксифилина, протамин-сулфата и пинацидила, који се, како су показала наша истраживања, вероватно одвија посредством отварања калијумских канала и/или укључивањем NO сигналног пута. Међу њима су, што се тога тиче, установљене и разлике које се односе на то да ли у релаксацији доминира њихов ефект на јонске, пре свега калијумске канале, или ефект посредством NO, или комбинација оба или више сигналних путева. Због тога ћемо у поглављу дискусије о пинацидилу све то разматрати и упоредити све три испитиване супстанције. Један од фактора који је најодговорнији за релаксантни ефект гравидног миометријума је и азот- оксид-NO. Иако је ова супстанца у облику гаса предмет опсежних истраживања последње деценије, још увек има непознаница о њеном значају као трансмитера и могућег модулятора калијумских и других канала. Показано је да азот- оксид инхибира миометријумску контрактилну активност на сличан начин код гравидних жена и код оних у порођају, уз укључење калијумових канала. Калијумови канали могу бити активирани механизмима који обухватају директно дејство NO или преко cGMP. Нешто новија истраживања искључују дејство cGMP, а апострофирају улогу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ariah i sar., 2009, 2012).

Миометријске контракције су фазичне по природи, што значи да постоји период релаксације између контракција. Међутим, ако се контракције одржавају и постају тоничне, постоји опасност по живот фетуса због хипоксије, јер долази до сужавања крвних судова у целом миометријуму. Због тога су фазичне, регуларне контракције, захваљујући мењању потенцијала

мембране и уласку јона калцијума у глатку мишићну ћелију, основа за успешан порођај. Мембрански потенцијал глатког мишића утеруса није стабилан, тако да се у неким ћелијама може означити као пејсмејкерски, јер се у њима дешава спонтана деполаризација мембране која се доводи у везу са волтажном-зависним калцијумским каналима (Т-тип) са пејсмејкерском активношћу (Milovanović i sar., 1988a).

Превремени порођај (рађање детета пре 37. недеље живота), који се дешава код 7 до 12 % од укупно живорођене деце, представља озбиљан проблем савремене гинекологије и акушерства, због великог пренаталног морбидитета и морталитета. Због тога што снажне и учестале миометријске контракције за време трудноће могу бити узрок превременог порођаја, контрола материчне контрактилности код миометријске дисфункције је важан терапијски циљ и подстицај за развој нових токолитика (Milovanović i sar., 1984; Novaković i sar., 2007).

Данашњи агенси који контролишу контракције утеруса (токолитици) су недовољно ефикасни и имају висок степен нежељених дејстава. Од велике је важности што данас можемо идентификовати нова места погодна за деловање агенаса који модификују контрактилност утеруса. Све је више доказа који показују да калијумски канали могу бити та нова места за деловање токолитика (Kalezić i sar., 1993; Novaković i sar., 2007).

Калијумски канали који се отварају у току процеса настанка акционог потенцијала у ћелијској мембрани одлажу на ћелијској мембрани стварање критичног прага за генезу акционих потенцијала, стварајући услове за хиперполаризацију. Тада долази до затварања волтажном-зависних  $Ca^{2+}$  канала, ограничава се улазак  $Ca^{2+}$  у ћелију и омогућује релаксација глатког мишића.

Отварачи калијумских канала представљају нове лекове у терапији кардиоваскуларних оболења, посебно хипертензије, јер се отварањем калијумских канала омогућује релаксација крвних судова. Због тога је испитивање њиховог дејства на утерусу од великог значаја, због могућег проналаска нових токолитичких агенаса који би можда били ефикаснији и специфичнији од досадашњих и са мање нежељених дејстава. Многи истраживачи, па и наша истраживачка група, у најперспективније убрајају калцијумске антагонисте и отвараче калијумских канала који делују са или без укључивања система NO (Milovanović i sar., 1984; Milovanović i sar., 1985, 2013; Novaković i sar., 2007; Oreščanin i sar., 2008; Apiah i sar., 2009).

Функционална равнотежа између контракције и релаксације је изузетно битна за правилну функцију утеруса, односно менструације без дисменореје, трудноћу без контракција и порођај са јаким и правилним контракцијама. Активност негравидног миометријума је најјаче изражена током еструса и периода овулације. За време гравидитета, утерус мора да буде у стању мировања, односно релаксације, или да се региструју само благе асичроне контракције које су такође важне за обезбеђење умереног тонуса зида утеруса. Почетком процеса порођаја и

постпарталног периода, миометријум генерише јаке и добро синхронизоване контракције (Slavić i sar., 2006). Због тога, проучавање механизма који модулирају или контролишу и омогућавају процес контракције и релаксације, како за нас у току израде ове докторске тезе, тако и за друге ауторе, је од велике важности. Централну улогу у процесима контракције и релаксације играју јонски канали. Њихово затварање и отварање, односно модулација, посебно калијумских канала, су основа регулације мембранског потенцијала ћелије. Релаксација је омогућена повећањем концентрације интрацелуларног калијума и смањењем концентрације интрацелуларног калцијума. Због тога смо и ми у нашем раду проучавали лекове који модулишу активност калијумских канала, јер је то од пресудне важности за контролу утерусне ексцитабилности.

Крајем прошлог века, због испољеног фармаколошког интереса и решења проблема токолизе, започела је интензивна синтеза нових супстанција које модулишу калијумске канале. Поред тога, овај процес је корелисан са реevaluацијом механизма деловања неких познатих вазодилататора који доводе до релаксације глатких мишића непознатим механизмом, али са потенцијалом отварања или блокирања калијумских канала. За многе супстанције (попут миноксидила, диазоксида и др.) које су сврставане у тзв. вазодилаторе са директним дејством, последњих година је потврђено да испољавају особину модулирања, односно отварања калијумских канала. Такође, неки релаксанти глатких мишића присутни у *Materii medicae*, укључујући калцијумске антагонисте и доноре NO, можда у свом механизму деловања укључују и калијумске канале. Зато није изненађење што се у новије време конституисала прилично велика група хемијски веома разнородних једињења која имају једну заједничку особину, особину отварања калијумских канала (Novaković i sar., 2007; Arijah i sar., 2009).

Пинацидил је синтетисан још давне 1970. године, а тек касније је откривено да овај лек релаксира глатке мишиће крвних судова отварањем калијумских канала (Bray i sar., 1987). Због тога се пинацидил сврстава као први откривени члан из групе отварача калијумских канала (ОКК). Међутим, комплетан механизам којим он доводи до релаксације глатких мишића још увек није сасвим познат. Уопштено речено, отварачи калијумских канала, повећањем пермеабилности мембране за  $K^+$  јоне, доводе до хиперполаризације и стварања услова за померање мембранског потенцијала од прага мировања ка негативним вредностима, што покреће каскаду догађаја, који за крајњу последицу имају смањење концентрације интрацелуларног  $Ca^{2+}$  и релаксацију глатких мишића (Bray i Quast, 1992; Sokolović i sar., 2012; Drakul i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012). Каскадна реакција која доводи до релаксације укључује најпре затварање волтажно-зависних  $Ca^{2+}$  канала (вероватно Т типа) и тиме смањење уласка  $Ca^{2+}$  у ћелију. Наредни корак је смањено стварање  $IP_3$  и инхибиција ослобађања  $Ca^{2+}$  из  $IP_3$  осетљивих  $Ca^{2+}$  депоа, уз смањење осетљивости контрактилних

елемената за  $\text{Ca}^{2+}$  и повећање фракције  $\text{Ca}^{2+}$  везаног за мембрану. Претпоследња степеница је активирање  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  пумпе и смањење јона  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелији, а последња активирање SERCA пумпе и повратак јона  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазме у ендоплазматски ретикулум (Bray, 1991; Wray i sar., 2003, 2005; Gomez-Viquez i sar., 2003; Wray i sar., 2007; Sanborn i sar., 2005; Sokolović i sar., 2012; Drakul i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012).

ОКК су нашли примену у лечењу ангине пекторис (Frampton i sar., 1992), хипертензије (Duty i Weston, 1990), конгестивне срчане инсуфицијенције (Giles i sar., 1992) и релаксације глатке мускулатуре бронхија код астме (Duty i Weston, 1990), а наговештено је и проширење индикација за ове лекове, укључујући и токолизу утеруса (Sokolović i sar., 2012; Drakul i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012).

Фармаколошки ефекти пинацидила, али и других отварача калијумских канала, проучавани су на различитим моделима изолованих мишића, укључујући срце (Escande i sar., 1989), крвне судове (Jovanović i sar., 1994; Jahangir i Terzić, 2005; Gojković i Kažić, 1999), трахеју (Allen i sar., 1986), бешику (Anderson i sar., 1988), скелетне мишиће (Weik i Neumcke, 1990), као и неурално ткиво (Tremblay i sar., 1991) и бета ћелије панкреаса (Plant i Henquin, 1990). Међутим, у малом броју студија проучавано је релаксантно дејство пинацидила на препарате изолованог хуманог утеруса (Kostrzewska i sar., 1996; Morrison i sar., 1993; Khan i sar., 1998) или утеруса пацова (Piper i sar., 1990). Такође, не постоји довољно поузданих електрофизиолошких проучавања о  $\text{K}_{\text{ATP}}$  каналима у глатком мишићу утеруса (Curley i sar., 2002; Khan i sar., 2001; Hamada i sar., 1994). Са друге стране, познато је да релаксација утеруса проузрокована пинацидилом може бити антагонизована глибенкламидом, селективним блокатором  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала (Novaković i sar., 2007; Morrison i sar., 1993; Piper i sar., 1990; Sokolović i sar., 2012; Drakul i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012).

Као потврда да су  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канали присутни у глатким мишићима утеруса, служе налази mRNA за гене каналског домена Kir 6 и гене сулфонил уреа домена SUR2B  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала (Chien i sar., 1999; Sokolović, магистарски рад, 2011). Међутим, овај тип калијумских канала још није потврђен електрофизиолошким експериментима. Могуће објашњење можда можемо наћи у чињеници да су промене у експресији и дистрибуцији калијумских канала, па и  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала, честе и да зависе од многих фактора, као што су гравидно стање (Matharoo-Ball i sar., 2003), утицај хормона (Perez i Toro, 1994; Gimple i Fahrenholz, 2001) и неуротрансмitera (Houdeau i sar., 2003).

На основу свега наведеног, најпречи циљ наших експеримената, чији су резултати приказани у овој тези, је био усмерен испитивању механизма деловања, не само пинацидила, већ и пентоксифилина и протамина, на калијумске канале и њихову евентуалну интеракцију са NO сигналним путевима у изолованом утерусу пацова.

Наши експерименти у оквиру израде ове тезе су планирани тако да смо проучавали релаксантни ефекат пинацидила, типичног отварача  $K_{ATP}$  канала, али и могућих тзв. „нетипичних отварача  $K_{ATP}$  канала“, као што је пентоксифилин или протамин (њихова дискусија је већ горе у тексту обрађена), на различите типове контракције негравидног изолованог утеруса пацова (спонтане ритмичке контракције, контракције изазване електричном стимулацијом/ендогеним ацетилхолином, егзогеним ацетилхолином, калцијумом,  $KCl$  и окситоцином. Такође смо поставили себи као циљ и дефинисање механизма деловања пинацидила на  $K_{ATP}$  канале или друге типове калијумских канала, као и улоге  $NO$  у њиховој модулацији.

***Карактеристике утицаја пинацидила на различите типове активације изолованог утеруса пацова (контракције проузроковане електричном пољном стимулацијом /неурогене контракције, ацетилхолином, додавањем калцијума у медијум и различитим концентрацијама  $KCl$  (50, 100 и 150 mM)***

Пинацидил концентрацијски-зависно релаксира спонтану ритмичку активност, као и контракције проузроковане калцијумом и електричном стимулацијом изолованог утеруса пацова (ANOVA, ефекат испитиваних концентрација пинацидила,  $p < 0.001$ ). Код холинергичког типа активације утеруса (са  $Ach$ ), пинацидил, примењен у нижим концентрацијама није проузроковао антагонистички ефект, већ је у извесној мери потенцирао овај тип активације. Релаксантни ефект (око 30%) на овај тип активације, пинацидил је испољио у највишим концентрацијама, од  $10^{-5}$  и  $10^{-4}M$  (ефекат пинацидила на ову врсту стимулације је  $p < 0.01$  и интеракција  $P \times S$ ,  $p < 0.01$  у двофакторској ANOVA). Све криве статистички значајно се описују линеарном регресијом, али међу њима нема разлике у нагибу (нема статистички значајног ефекта поређењем F-тестом). Дакле, релаксантни ефекат пинацидила је сличан (није статистички значајно различит) код спонтаних,  $Ca^{2+}$ - и електро-стимулисаних утеруса. Код холинергички активираних утеруса, мале концентрације пинацидила имају стимулативан ефекат (до  $10^{-6}M$ ), док делимична релаксација настаје тек при највишој коришћеној концентрацији ( $10^{-4}M$ ). Линеарна регресија зависности релаксације од концентрације пинацидила, код холинергички стимулираних утеруса, је на ивици статистичке значајности ( $p < 0.052$ ), иако је коефицијент регресије прилично висок ( $R=0.88$ ). С друге стране, минималну инхибицију и то тек након примене максималних концентрација, пинацидил је испољио код холинергички активираних утеруса (12–18 %). На основу наших резултата прве серије експеримената са пинацидилом, који се декларише као селективни отварач  $K_{ATP}$  калијумских канала, навешћемо генерални закључак о овој серији експеримената, неопходан за даљу дискусију.

Пинацидил (10 nM-0.1mM) изазива концентрацијски-зависну инхибицију различитих типова активације изолованог утеруса пацова. Степен инхибиторног ефекта пинацидила зависи од типа активације. Генерално се може рећи да овај отварач калијумских канала проузрокује снажнији релаксантни ефект на спонтаној ритмичкој активност и контракцијама изолованог утеруса пацова индукованим калцијумом или електричном стимулацијом (скоро у подједнаком степену) него на контракције индуковане ацетилхолином и калијум-хлоридом. Највише концентрације пинацидила су биле неопходне за инхибицију тоничних контракција изазваних високом концентрацијом раствора KCl од 150 mM, нешто ниже за инхибицију контракција изазваних ацетилхолином и 40 mM калијум хлоридом, док су најниже концентрације пинацидила биле довољне за инхибицију контракција индукованих са 50 и 100 mM KCl (најмања ED<sub>50</sub>).

Степен инхибиторног ефекта пинацидила, као и у експериментима са пентоксифилином, одликује зависност од типа активације глатког мишића утеруса. Исто тако, и пентоксифилин је, као и пинацидил, испољио најслабији релаксантни ефект на контракције изолованог утеруса пацова изазване ацетилхолином, што упућује на одсуство антимукаринског ефекта, односно на механизме који играју улогу у овом типу активације. Вероватно да пентоксифилин и пинацидил, поред већ дискутованих разлика у механизму деловања, нарочито што се тиче улоге и врсте калијумских канала, испољавају слабије ефекте на контракције које више зависе од интрацелуларног калцијума. У прилог овоме говоре и наши резултати у којима је пентоксифилин испољио слабији инхибиторни учинак ако је контрактилна активност изазвана вишом концентрацијом калцијума (0.36 mM).

Наша истраживања са пинацидилом, кога смо у експериментима користили као типичног отварача калијумских канала, су била посебно фокусирана на његов ефект на спонтану ритмичку активност глатког мишића утеруса, јер је овај тип активности добар модел за испитивање деловања потенцијалних токолитика, укључујући и пинацидил, јер претежно зависи од екстрацелуларног калцијума.

Треба напоменути да су најниже испитиване концентрације пинацидила ( $10^{-8}$  M и  $10^{-7}$  M) показале слаб или минималан инхибиторни ефект, док су више концентрације ( $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M) испољиле снажан релаксантни ефекат, који је у већини експеримената доводио (са највишом испитиваном концентрацијом) до потпуног блока спонтане ритмичке активности изолованог утеруса, вероватно укључивањем и других калијумских канала (KK), осим типа K<sub>ATP</sub>.

Пинацидил је у нашим експериментима концентрацијски-зависно инхибисао, не само амплитуду, већ и фреквенцију спонтаних ритмичких контракција глатког мишића утеруса. Наши резултати са пинацидилом су у складу са другим истраживањима на спонтаним ритмичким контракцијама на хуманом негравидном и гравидном миометријуму, која такође

показују да је релаксантни ефекат пинацидила концентрацијски зависан (Kostrzewska i sar., 1996; Morrison i sar., 1993; Jokanović, 2011).

Код појединих ћелија глатких мишића утеруса уочено је да потенцијал мембране није стабилан и да долази до спонтане деполаризације мембране, захваљујући „pacemaker“ ћелијама, које су главни извор спонтане ритмичке контрактилности (Sergeant i sar., 2000; Povstyan i sar., 2003). „Спонтанa мембранска струја“ каналске проводљивости доводи до деполаризације и накнадног стварања акционог потенцијала у ћелијама утеруса. Екситација настала у „pacemaker“ ћелијама преноси се на суседне ћелије вероватно путем „gap junction“ мостова међу ћелијама, заступљеним у материчном ткиву. Дакле, могуће место деловања пинацидила могу бити калијумски канали на пресинаптичкој мембрани нерва (Wray i sar., 2003; Sokolović i sar., 2012; Drakul i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012).

Пинацидил испољава снажан инхибиторни ефект на спонтану активност, не само изолованог утеруса, већ и на другим глатким мишићима, укључујући и васкуларне, као што је вена порте кунџа и то у сличним или нижим концентрацијама од 10  $\mu\text{M}$  (Kocić i sar., 2006; Weston i sar., 1988; Sokolović i sar., 2012; Drakul i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012).

Такође, и други отварачи  $\text{K}^+$ -канала, као што је кромокалин, изазивали су хиперполаризацију мембране глатке мишићне ћелије и промене цитосолне концентрације  $\text{Ca}^{2+}$ , уз испољавање релаксантног ефекта на контракције изоловане трехеје свиње индуковане ацетилхолином. Овим експериментима Shieh i saradnici (1992) су показали да отварачи  $\text{K}^+$ -канала могу да релаксирају и друге глатке мишиће, осим крвних судова, што је дало могућност ширења индикација за ове лекове. Кромокалин је такође у експериментима Hollingswortha i saradnika (1987), у значајно нижим концентрацијама (1.3  $\mu\text{M}$ ) у односу на концентрације пинацидила које смо ми применили у нашим експериментима, скоро комплетно инхибисао амплитуду спонтаних контракција изолованог утеруса пацова. Сличан инхибиторни утицај отварача  $\text{K}^+$ -канала, пинацидила и кромокалина, који је у корелацији са нашим, је нађен и на глатком мишићу мокраћне бешике пацова. Пинацидил свакако има јединствену природу међу ОКК. Познато је да различити ОКК имају различито понашање и захтевају специфичне услове за активацију  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала.

Наши експерименти нам дају за право да кажемо да пинацидил остварује свој инхибиторни ефекат под различитим околностима, односно испољен је и при различитим типовима активације изолованог утеруса пацова.

Jokanović i saradnici (2010) су показали да нема разлике у релаксантном ефекту пинацидила на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса узетог од хипертензивних и нормотензивних пацова. Међутим, пинацидил је једино испољио израженији инхибиторни ефекат на  $\text{Ca}^{2+}$ -индукованим контракцијама утеруса који су узети од нормотензивних у односу на спонтано

хипертензивне пацове. Постојање разлике у релаксантном ефекту неке супстанције у зависности да ли глатки мишић потиче од хипертензивних или нормотензивних пацова су јасно показали Oreščanin i saradnici (2006). Поменути аутори су показали да је релаксантни ефект натријум- нитропрусида био јаче изражен на изолованој реналној и мезентеричној артерији код хипертензивних него код нормотензивних животиња. Посебно јаче изражен релаксантни ефект овог донора NO је био у случају потпуне одсутности ендотела. Ова разлика у релаксантном ефекту пинацидила на калцијумском типу активације изолованог утеруса пацова узетог од хипертензивних животиња се може објаснити, као и код крвних судова, већом сензитивношћу утеруса према контрактилним и релаксантним супстанцијама (Jokanović i sar., 2010). Jokanović је такође (2011, магистарски рад) показала да промена температуре није значајно утицала на инхибиторни ефекат пинацидила, како код спонтане ритмичке активности, тако и код  $Ca^{2+}$ - индуковане активности изолованог утеруса пацова. Један од разлога за ову серију њихових експеримената су били резултати Milovanovića i saradnika (1987) са калцијумским антагонистима (никардипин и нитрендипин) на различитим типовима активације изолованог утеруса пацова. Поменути аутори су показали да је релаксантни ефект ових калцијумских антагониста био јаче изражен на вишој температури медијума од 37 °C. Међутим, други аутори су у истом моделу експеримента показали да је степен инхибиторног ефекта пинацидила на спонтаној ритмичкој активности изолованог утеруса зависио од температуре медијума. Наиме, они су показали да се на нижој температури медијума, од 30°C, инхибиторни ефект (смањење и фреквенце и амплитуде спонтаних ритмичких контракција утеруса) постиже са нижим концентрацијама пинацидила у односу на температуру медијума од 37 °C. С друге стране, када се радило о  $Ca^{2+}$  - индукованим контракцијама, релаксантни ефект пинацидила није зависио од температуре медијума, због тога што, како наводе аутори, додавање екстрацелуларног  $Ca^{2+}$  има примат над варирањем температуре.

Растуће концентрације пинацидила, поред инхибиције спонтане ритмичке активности изолованог утеруса, проузрокују такође, концентрацијски зависну инхибицију контракција изолованог утеруса пацова изазваних електричном стимулацијом, калцијумом и ацетилхолином. Степен инхибиторног ефекта пинацидила зависио је од типа активације. Пинацидил је најслабији инхибиторни ефекат испољио на контракцијама изолованог утеруса пацова изазваним ацетилхолином. Остале типове активације пинацидил је инхибисао у подједнаком степену.

Пинацидил је инхибисао спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова (малим делом посредством активације  $K_{ATP}$  канала), као и контракције проузроковане електричном стимулацијом, али и калијум – независним механизмима који су повезани са интрацелуларном концентрацијом  $Ca^{2+}$  и/или cGMP путем.  $Ca^{2+}$  - индуковану контрактилност, пинацидил је



инхибисао већим делом путем активације  $ВК_{Ca}$ . Метиленско плавило антагонизује релаксантни ефекат пинацидила на спонтану ритмичку активност глатког мишића изолованог утеруса пацова, што говори да је у механизму његовог дејства делом укључен и сигнални пут са cGMP, независан од NO - учешће cGMP пута у механизму релаксантног ефекта пинацидила.

Стимулативни ефекат ацетилхолина који се ослобођа за време електричне стимулације, као и егзогеног ацетилхолина, последица је активације мускаринских рецептора  $M_2$  и  $M_3$  на сарколеми глатке мишићне ћелије (Fernando i sar., 2004) и каскаде догађаја, који за крајњи циљ имају повећање проводљивости и концентрације калцијума. Активирање  $M_3$  рецептора стимулише PLC, која катализује хидролизу  $PIP_2$  на  $IP_3$  и DAG, који даље утиче на активност протеин киназе C (PKC) и тим путем на отварање јонских канала за  $Ca^{2+}$ , док  $IP_3$  посредује ослобађање  $Ca^{2+}$  из интрацелуларних депоа (Sanborn i sar., 1996, 2005; Sanborn, 2007ab; Eglen, 2005; Sokolović i sar., 2012; Drakul i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012).

Везивање ацетилхолина за  $M_2$  мускаринске рецепторе посредно доприноси настанку контракције индуковане егзогеним ацетилхолином. Те контракције су биле знатно мање осетљиве на дејство пинацидила у поређењу са контракцијама изазваним електричном стимулацијом. Иако су оба типа контракција условљена везивањем ацетилхолина за мускаринске рецепторе, релаксантна ефикасност пинацидила код ових типова активације се значајно разликовала. С друге стране, пинацидил је у подједнаком степену инхибисао спонтану ритмичку активност и контракције индуковане електричном стимулацијом. Пинацидил је испољио већу осетљивост (релаксацију) на контракције изазване егзогено додатим ацетилхолином, вероватно због тога што отвара калијумске канале, како у мишићном ткиву, тако и у нервним завршцима (Jokanović i sar., 2010, 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2012).

Novaković i saradnici (2007) и Jokanović (2011) су такође показали, као и ми у нашим експериментима, да степен инхибиторног дејства зависи од типа активације и примењене концентрације пинацидила.

Наши резултати са пинацидилом су делом у складу са подацима који постоје у литератури, посебно са оним који се односе на дејство  $Ca^{2+}$  антагониста на различите типове активације глатког мишића утеруса. Наиме, Milovanović i saradnici (1988) су такође показали да степен инхибиторног ефекта верапамила, нитрендипина, а посебно никардипина (али са постојањем већих разлика у односу на распон концентрација и тип активације глатког мишића), зависи од типа активације глатког мишића утеруса. За разлику од наших резултата са пинацидилом, никардипин је, а и други поменути  $Ca^{2+}$  антагонисти, у најјачем степену инхибисао спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова и контракције проузроковане електричном стимулацијом. За комплетну инхибицију наведеног типа активације биле су довољне отомоларне концентрације овог лека. Поменути аутори су, као и ми у нашим експериментима са

пинацидилем, нашли слабији инхибиторни ефект калцијумских антагониста на ацетилхолинском или окситоцинском типу активације (Milovanović i sar., 1988). Вреди још напоменути да релаксантни ефекат  $\text{Ca}^{2+}$  антагониста (никардипина и нитрендипина) зависи, не само од типа активације глатког мишића, већ и од врсте глатког мишића. Тако на пример, за инхибицију спонтане ритмичке активности и контракција проузрокованих електричном стимулацијом изолованог утеруса биле су довољне отомоларне концентрације никардипина или нитрендипина. С друге стране, за инхибицију контракција изолованог колона, бешике и езофагуса пацова су биле неопходне микромоларне концентрације ових  $\text{Ca}^{2+}$  антагониста.

Већ смо у дискусији поглавља о пентоксифилину напоменули да је миноксидил врло снажан вазодилататор, који вероватно у свом механизму деловања укључује калијумске канале, због чега су Јокановић i saradnici (2010, 2012) проучавали која врста калијумских канала учествује у његовом вазодилататорном ефекту на спонтану ритмичку активност, али и на друге типове активације, са и без ВКК. Они су показали да растуће концентрације миноксидила проузрокују концентрацијски-зависну инхибицију спонтане ритмичке активности, као и контракција изолованог утеруса пацова изазваних електричном стимулацијом и калцијумом, као и да степен инхибиторног ефекта миноксидила, у значајнијој мери у односу на пинацидил (нарочито када је у питању спонтану ритмичку активност и контракције проузроковане калцијумом), зависи од типа активације глатког мишића утеруса. Миноксидил је најјачи инхибиторни ефекат испољио на контракцијама изолованог утеруса пацова изазваним електричном стимулацијом, нешто слабији на спонтаној ритмичкој активности, а најслабија релаксација је добијена на контракцијама изолованог утеруса пацова изазваним калцијумом. Међусобни однос  $\text{EC}_{50}$  вредности за различите типове активације када је био у питању пинацидил, за разлику од миноксидила, указује да не постоји статистички значајна разлика између инхибиторног ефекта пинацидила на спонтану активност утеруса пацова и активности изазване калцијумом и електричном стимулацијом. Једино је разлика постојала када су у питању контракције изазване ацетилхолином.

За разлику од пинацидила који је у подједнаком степену инхибисао спонтану ритмичку активност и контракције проузроковане калцијумом и електричном стимулацијом, миноксидил је најслабији ефект изазвао на контрактилност индуковану калцијумом. Ови налази Јокановић i saradnika (2012) упућују на закључак да у механизму деловања пинацидила и миноксидила, поред сличности у погледу отварања калијумских канала, постоје и значајне разлике када се ради о другим механизмима деловања који учествују у релаксантном ефекту ових супстанција. Тако на пример, податак да миноксидил значајно слабије, за разлику од пинацидила, инхибише калцијумски тип активације, указује да у његовом механизму деловања не учествује у значајној мери блокирање калцијумских канала. С друге стране, пинацидил подједнако антагонизује

спонтану ритмичку активност и контракције изазване електричном стимулацијом и калцијумом, односно оне типове активације који у већој мери зависе од екстрацелуларног калцијума и отварања волтажних калцијумских канала. На основу свега изнетог, може се рећи да миноксидил, за разлику од пинацидила, не блокира у значајној мери калцијумске канале. У прилог овоме говоре експерименти где су Jokanović i saradnici (2012) испитивали ефект миноксидила у присуству дуплог калцијума у медијуму. У тим експериментима, поменути аутори су нашли да је релаксантни ефекат миноксидила значајно редукован у присуству двоструко веће концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  у медијуму.

Јони  $\text{Ca}^{2+}$  имају главну функцију у контракцији и релаксацији, како попречно-пругастих, тако и глатких мишића, укључујући и утерус. Инфлукс  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелију је главни фактор који доводи до појачане ритмичке контрактилности утеруса пацова, што су Jokanović i saradnici (2010) показали додавањем калцијума (0.1ml 20%  $\text{CaCl}_2$ , односно 0,018 mM) у De Jalon-ов медијум, као извор екстрацелуларног калцијума, након постигнуте стабилне спонтане ритмичке активности утеруса. Поменути аутори су закључили да накнадно додавање  $\text{Ca}^{2+}$  (без активирања интраћелијских резервоара  $\text{Ca}^{2+}$ ) доводи до контракције глатких мишића као и интрацелуларни  $\text{Ca}^{2+}$  који се ослобађа из ћелијских депоа. Поред тога, податак да миноксидил, за разлику од пинацидила који подједнако антагонизује спонтану ритмичку активност и контракције изазване електричном стимулацијом и калцијумом, слабије инхибише калцијумски тип активације, указује да у његовом механизму деловања не учествује у значајној мери блокирање калцијумских канала. С друге стране, пинацидил вероватно инхибише оне типове активације који у већој мери зависе од екстрацелуларног калцијума и отварања волтажних калцијумских канала.

За миноксидил је показано и на другим моделима да је у стању да отвори калијумске канале. Тако на пример, Wang (2003) је нашао да активација  $\text{K}_{\text{ATP}}$  доводи до стимулације активности  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ - котранспортера и повећава величину абсорпције  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{K}^+$  у Henleovoj петљи и тиме доприноси антидиуретичком дејству миноксидила. Ефект миноксидила („атипичан  $\text{K}_{\text{ATP}}$  отварач калијумских канала) и бимакалина (бензопиренски тип отварача  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) испитиван је на респираторном тракту заморца у *in vitro* и *in vivo* условима, као и на изолованој вени порте пацова и заморца. Ова истраживања на изолованој трахеји заморца разјаснила су фармаколошки профил миноксидила, односно да се он разликује од класичног  $\text{K}_{\text{ATP}}$  отварача као што је бимакалин, јер је на поменутом моделу слабо отварао  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канале или са њима имао различиту интеракцију. Коначан закључак Kar-Heinza i saradnika (2000), али и других аутора, Goldsteina i saradnika (2001, 2005), је постојање различитих  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала у глатким мишићима респираторног тракта и крвним судовима. На бази закључака поменутих аутора, логично је што су Jokanović i saradnici (2010, 2012) разлике у релаксантном ефекту пинацидила и миноксидила на различитим

типовима активације глатког мишића утеруса пацова објаснили постојањем различитих субтипова  $K_{ATP}$  канала у овом глатком мишићу. Захваљујући дискусији горе наведених аутора и ми можемо претпоставити да су разлике у степену инхибиторног ефекта на различитим типовима активације вероватно засноване на постојању различитих субтипова  $K_{ATP}$ , или на укључивању различитих врста калијумских канала.

***Испитивање инхибиторног ефекта пинацидила у присуству метиленског плавила (MP) на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова***

У нашем раду већ смо поменули експерименте у којима је метиленско плавило антагонизовало релаксантни ефект растућих концентрација пинацидила на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова. Тако на пример, у присуству метиленског плавила ( $0,9 \times 10^{-6}$  mol/L), ни највећа примењена концентрација пинацидила од 100  $\mu$ M (коју глибенкламид није антагонизовао) није изазвала 50% инхибицију поменутог типа активације. С друге стране, у контролним експериментима, пинацидил је у овој концентрацији изазвао комплетну инхибицију спонтане ритмичке активности изолованог утеруса пацова.

Такође, метиленско плавило је комплетно на истом моделу антагонизовало и релаксантни ефект пентоксифилина (Kordić-Vojinović i sar., 2011; Milovanović i sar., 2013). Будући да је метиленско плавило (блокатор гванилат циклaзе) смањило инхибиторни ефекат пинацидила, могуће је да је у његовој релаксацији глатког мишића утеруса укључен и cGMP и то сигналним путем независним од присуства NO. Због тога, са великом извесношћу можемо закључити да се релаксантно дејство пинацидила одвија кроз два најважнија пута, од којих је један отварање  $K_{ATP}$  канала, а други активирање cGMP сигналног механизма.

У складу са нашим резултатима је и податак да метиленско плавило антагонизује релаксантни ефекат Na-нитропрусида (NaNP) на изолованим крвним судовима. Метиленско плавило је антагонизовало релаксантни ефекат NaNP-а на концентрацијски и ендотел независан начин, при чему је овај ефекат израженији код нормотензивних него код хипертензивних пацова (Orešćanin i sar., 2004, 2006).

Насупрот нашим резултатима у којима смо показали да метиленско плавило антагонизује релаксантни ефекат пинацидила, Milovanović i saradnici (1985) нису нашли да метиленско плавило антагонизује релаксантне ефекте нитроглицерина и Na-азида на изолованом утерусу пацова. Ова разлика у резултатима може се протумачити претпоставком да Na-азид и нитроглицерин делују на друге форме гванилатне циклaзе у односу на пинацидил. У нашим већ наведеним експериментима са пентоксифилином такође смо показали да је метиленско плавило у стању да антагонизује његов релаксантни ефект на изолованом утерусу пацова. Пентоксифин се иначе

широко примењује као вазодилататор код проблема са циркулацијом и вазоспазма (Sonkin i sar., 1992).

Као и у експериментима са пинацидилом, у присуству метиленског плавог ни највиша концентрација пентоксифилина није довела до потпуног престанка контракција. Интересантно је и да је инхибиција коју је изазивао пентоксифин у присуству метиленског плавила била краткотрајна. Наиме, додавање пентоксифилина инхибирало је контракције утеруса, али инхибиција је брзо нестајала и амплитуде записа контракција су се увећавале (Kordić-Bojinović i sar., 2011). Постоје подаци да у ћелији постоје сигнални путеви који укључују NO-независну cGMP продукцију и доводе до релаксације (Cirino i sar., 2003; Bonartsev i sar., 2005; Stojnić i sar., 2007). Могуће је да је метиленско плавило деловало на ове сигналне путеве и да је тако пентоксифин у интеракцији са метиленским плавилом довео до знатно слабијег релаксантног дејства. Већ смо напоменули да се пентоксифин наводи као блокатор фосфодиестеразе (Calogero i sar., 1998), који повећавањем нивоа cAMP-а може довести до релаксације глатког мишића, па и тај пут не треба искључити. Будући да је метиленско плавило (блокатор гванилатне циклазе) у знатној мери антагонизовало инхибиторни ефекат пентоксифилина, могуће је да је у релаксацију мишића укључен и cGMP и то сигналним путем независним од присуства NO (Kordić-Bojinović i sar., 2011).

Антагонизовање релаксантног ефекта пинацидила са метиленским плавилом у нашим експериментима, такође се може објаснити учешћем cGMP пута и/или NO у механизму релаксантног ефекта пинацидила, поред иначе познате његове улоге у отварању  $K_{ATP}$  канала. Метиленско плавило инхибира стварање cGMP тиме што спречава интеракцију NO са гванилатном циклазом.

Трудноћу карактерише релаксација утеруса, која је резултат дејства многих ендокриних и паракриних фактора, укључујући и азот-оксид - NO, за кога се иначе не зна тачан механизам релаксантног дејства на утерусу. Показано је да азот- оксид инхибира материчну контрактилну активност на сличан начин код гравидних жена и код оних у порођају, вероватно и укључивањем калијумових канала. Калијумови канали могу бити активирани механизмима који обухватају директно дејство NO или преко cGMP, што је показано у нашим експериментима са испитивањем интеракције пинацидил/метиленско плавило. Коришћењем селективних блокатора (CTX и апамина) за калцијум-зависне калијумове канале,  $IK_{Ca}$  (CTX) и  $SK_{Ca}$  (апамин), утврђено је да азотним оксидом (донор NO- натријум нитропрусид) изазвана релаксација модулише  $SK_{Ca}$  канале, односно преинкубација са апамином значајно је смањила релаксацију проузроковану SDP-ом. Ове изнете чињенице указују да модулатори калијумских канала могу да се искористе као потенцијални токолитици.

Недавно објављена истраживања доводе у везу азот-оксид са отварањем калијумских канала, тј. да у релаксацији изазваној NO донорима (натријум-нитропрусид), али и пентоксифилином, учествује у извесној мери и отварање калијумских канала.

***Испитивање инхибиторног ефекта пинацидила у присуству 10  $\mu$ M L-аргинина, L-NAME и индометацина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова***

У нашим експериментима истраживали смо и ефекат растућих концентрација пинацидила на спонтану ритмичку активност утеруса у присуству 10 $\mu$ M L-аргинина, очекујући да ће он потенцирати релаксантни ефект овог отварача калијумских канала. Наиме, Hoffman i saradnici (2003) су показали да L-аргинин, као прекурсор NO, изазива концентрацијски-зависну инхибицију контрактилне активности утеруса у високим концентрацијама L-аргинина (1mM) чак и до 80%. Ова инхибиција се највероватније одвија преко cGMP-независног пута.

L-аргинин у ћелији служи као супстрат за ензим NO синтазу и може да повећа концентрацију азотног оксида, који доводи до релаксације мишићних ћелија. На хуманим и анималним моделима који немају способност стварања NO због дисфункције ендотела је показано да L-аргинин враћа изгубљену способност вазодилатације зависне од ендотела. Због свега наведеног, логично је што смо били убеђени да ће L-аргинин потенцирати релаксантно дејство пинацидила. Међутим, наши резултати су показали да L-аргинин антагонизује релаксантни ефект пинацидила. Овај антагонистички утицај L-аргинина је најочљивији при примени концентрације пинацидила од 10<sup>-5</sup> M, када је његово релаксантно дејство смањено за око 55% у односу на контролу. Могуће објашњење ове појаве је да је примена L-аргинина створила погодне услове за настанак снажног оксидационог једињења, пероксинитрита. Наиме, при нормалним физиолошким условима, каталитичка активност супероксидизмутазе (SOD) штити ћелије, катализом реакције претварања O<sub>2</sub><sup>-</sup> у водоник-пероксид и кисеоник. Међутим, висок ниво NO, компетира за ову дисмутациону реакцију, што води настанку пероксинитрита. Значи, O<sub>2</sub><sup>-</sup> лимитира физиолошку функцију NO. Највероватније је да је примењена концентрација L-аргинина недовољна да инхибира спонтану ритмичку активност утеруса, али је довољна да повећа ниво NO изнад физиолошког и тако створи погодне услове за настанак токсичног једињења пероксинитрита. Пероксинитрит и продукти његове деградације могу да допринесу оштећењу ћелије. Повезују се са појавом пероксида липида и нитрификацијом тирозина, што ремети њихове важне функције.

У експериментима на бубрежним и мезентеричним артеријама такође је утврђено да L-аргинин испољава антагонистички ефекат на релаксацију изазвану натријум-нитропрусидом. Изузетак се јавља код хипертензивних животиња са очуваним ендотелом, где је скоро исти релаксантни

ефекат L-аргинина и NaNP-a (Orešćanin i sar., 2004, 2008; Orešćanin i Milovanović, 2006). Наведени аутори ове резултате објашњавају могућношћу да натријум-нитропрусид остварује своје дејство преко пероксинитрита, а не преко S-нитрозотиола.

Наши резултати у којима претретман са L-NAME није статистички значајно мењао релаксантни ефект пинацидила на спонтаној ритмичкој активности изолованог утеруса пацова указују да се његово дејство на утерусу остварује независно од присуства азотног оксида (Kordić-Bojinović i sar., 2010).

У жељи да разјаснимо прецизан механизам релаксантног деловања пинацидила, испитивали смо у којој мери је укључен циклооксигеназни пут. У ту сврху смо испитивали његов инхибиторни ефект у присуству индометацина (0.1 и 1  $\mu\text{g/ml}$ ). У нашим експериментима показали смо да претретман са индометацином није статистички значајно потенцирао релаксантни ефект пинацидила на спонтаним ритмичким контракцијама изолованог утеруса пацова. Ови наши резултати су показали да у условима инхибиције COX ензима, индометацин не утиче на ефекте пинацидила, бар кад је у питању овај тип активације. С друге стране, у нашим већ цитираним резултатима, истакли смо да индометацин може да потенцира релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтаним ритмичким контракцијама изолованог утеруса (Kordić-Bojinović i sar., 2011). *Због тога се на основу ових резултата може закључити да инхибиција COX ензима игра извесну улогу у релаксантном ефекту протамина, али не и пинацидила, на поменутом типу активације.*

***Утицај претретмана са различитим блокаторима (ТЕА, 4АР и глибенкламид) калијумских канала (ВКК) на релаксантни ефект растућих концентрација пинацидила на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом***

Пинацидил концентрацијски зависно релаксира спонтано активни утерус (двофакторска анализа варијансе, two-way ANOVA, статистички значајан ефекат концентрације пинацидила,  $p < 0.001$ ). Када се утеруси претретирају са ТЕА, 4АР и глибенкламидом, концентрацијска зависност се задржава, без ефекта на релаксацију изазвану пинацидилом (нема статистички значајног ефекта претретмана у двофакторској анализи варијансе). Регресиони карактер правих се задржава и описује ефекат пинацидила и након претретмана, при чему су све регресионе праве сличне (поређење F-тестом није дало никакву статистички значајну различитост).

С обзиром да је модел дозне зависности утицаја пинацидила на релаксацију утеруса било могуће статистички значајно и сигмоидално фитовати ( $\text{Chi}^2/\text{df} < 0.01$ ), ефекти претретмана су фитовани и на овај начин и поређени F-тестом. Међутим, овај начин обраде је показао да се

ефекат релаксације код спонтано активних утеруса претретираних са ТЕА не може статистички значајно екстраполирати на овај начин јер модел није статистички значајан ( $\text{Chi}^2/\text{df}=0.0816$ ). С друге стране, претретмани са 4АР и глибенкламидом се статистички значајно сигмоидално фитију ( $\text{Chi}^2/\text{df} < 0.05$ ). Међутим, поређење F-тестом је показало да су без обзира на значајност модела све криве међусобно сличне (нема значајног ефекта поређењем F-тестом). С обзиром на сличност и на непостојање статистичке значајности модела,  $\text{ED}_{50}$  вредности нису ни дате, нити поређене.

У експериментима у којима смо испитивали утицај блокатора калијумских канала: глибенкламида/GLB (блокатор отварања  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала), 4-аминопиридина/4АР (блокатор  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ ) и тетраетиламонијума/ТЕА (блокатор волтажно-зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала) на релаксантни ефект пинацидила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом, показали смо да у механизму његовог деловања отварање различитих типова калијумских канала нема подједнак значај. Генерално, може се рећи да у релаксантном ефекту пинацидила на оба типа активације отварање  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала није од пресудног значаја, као што је то случај са другим типовима калијумских канала. С друге стране, претретман са 4АР (блокатор  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ ) и ТЕА (блокатор волтажно-зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала) на калцијумском типу активације смањује релаксантни ефекат пинацидила (статистички значајна разлика  $\text{ED}_{50}$  вредности у односу на сам пинацидил), највише због његове ефикасности у нижим концентрацијама, док претретман са 4АР доводи до смањења релаксантног ефекта у вишим концентрацијама пинацидила, тако да се у присуству 4АР није могао постићи његов максимални релаксантни ефекат. На основу изнетог, може се рећи да у механизму релаксантног деловања пинацидила на испитиваним типовима активације није значајније заступљено отварање  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала. Међутим, отварање  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  и волтажно зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала има изванредан значај, али у различитом степену, у механизму релаксантног ефекта пинацидила на контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом. Додатна потврда о укључивању  $\text{NO}/\text{cGMP}$  пута и калцијумских канала у механизму релаксантног ефекта пентоксифилина су наши већ описани резултати у присуству ВКК (GLB, ТЕА и 4АР), у којима смо показали да отварање калијумских канала не игра пресудну улогу у механизму његовог деловања, посебно  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канали.

Обзиром да смо у нашим експериментима испитивали и евентуални антагонистички ефект блокатора калијумских канала из различитих група, као што су дериват сулфонил урее (глибенкламид, GLB), дериват кватернерних амонијумових једињења (тетраетил-амонијум/ТЕА), дериват аминопиридина (4-аминопиридин/4-АР) на релаксантни ефект пентоксифилина, протамина и пинацидила, навешћемо у овом делу тезе које врсте калијумских канала они блокирају. Треба напоменути да способност блокаде калијумских канала имају супстанце које



такође имају хемијски разноврсну структуру, укључујући неорганске катјоне ( $Ba^{2+}$ ,  $Cs^{+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), кватернерна амонијумова једињења (тетраетил-амонијум, тетрабутил-амонијум, тетраметил-амонијум), аминопиридине (4-аминопиридин/4-AP), деривате сулфонил урее (глибенкламид и толбутамид), антиаритмике класе III (амиодарон, бретилијум, бетанидин, клофилиум, соталол, ибутилид, дофетилид), па чак и неке природне токсине (апамин, лиуротоксин, карибдотоксин и ибериотоксин). Осим по хемијској структури и јачини деловања, ВКК се међусобно разликују и по специфичности за различите типове/субтипове  $K^{+}$  канала. Антиаритмици класе III у свом механизму деловања укључују и блокаду  $K_{ir}$  канала у срцу, што доводи до продужења акционог потенцијала и фазе реполаризације.

Познато је да деривати сулфонил урее (глибенкламид и толбутамид) који се користе као орални антидијабетици, осим што блокирају  $K_{ATP}$  канале у бета- ћелијама Langerhansovih острваца панкреаса, селективно инхибирају  $K_{ATP}$  канале у глатким мишићима крвних судова, срца и утеруса (Kažić i Ostojić, 2009; Kažić i sar., 2009).

**Кватернерни амонијумови јони (QA)** су група неселективних блокатора  $Ca^{2+}$  - зависних  $K^{+}$  канала јер поред волтажне зависне  $K^{+}$  канала, једнако добро блокирају и лиганд зависне КК. Најважније једињење из ове групе је тетраетил-амонијум (ТЕА), неселективни блокатор  $ВК_{Ca}$  канала и делимични блокатор  $K_{ATP}$  канала. Од QA блокатора КК (тетраетил-амонијум, тетрабутил-амонијум, тетраметил-амонијум) у експериментима се највише користи тетраетил -амонијум (ТЕА). Место везивања ТЕА, као и 4-аминопиридина, је између сегмената S5-S6  $\alpha$  субјединице у пори. Смештајући се у пору он проузрокује физички блок. Калцијум-зависни калијумови канали и то  $ВК_{Ca}$  у глатким мишићима су најосетљивији КК на дејство ТЕА (0.1–1mM). У нешто вишим милимоларним концентрацијама (0.3–10 mM), ТЕА је у стању да блокира и АТР-зависне калијумове канале ( $K_{ATP}$ ). Треба напоменути да су ове релативно високе концентрације неселективне, јер блокирају мускаринске и никотинске рецепторе преузимања холина, као и спонтане ритмичке контракције.

**Аминопиридини**, чији је типичан представник 4-аминопиридин/4-AP, првенствено у нижим концентрацијама блокирају  $K_v$  канале, док у милимоларним концентрацијама антагонизују и  $K_{ATP}$  канале. Аминопиридини, који су селективнији и јачи од QA, пре свега антагонизују волтажне зависне калијумове канале,  $K_v$ . Међутим, у одређеном опсегу (милимоларне концентрације) блокирају и АТР-зависне калијумове канале ( $K_{ATP}$ ), што указује на извесну њихову неселективност. 4-аминопиридин (4-AP) је типичан представник ове групе и релативно је селективан за касно и пролазно исправљачке калијумове канале. Аминопиридини ослобађају неуротрансмитер у току симпатичке стимулације када долази до повишења тонууса крвних судова. Ова активност је везана за блокаду калијумових канала на пресинаптичким нервним

завршецима, а не на васкуларним глатким мишићним ћелијама, јер се ради о концентрацијама мањим од 10 $\mu$ М које на њих немају дејство (Кажић и Остојић, 2009; Кажић и сар., 2009).

Претретман са ТЕА, 4АР и глибенкламидом, утиче на степен релаксације изазване пинацидилем контракција изолованог утеруса пацова изазваних калцијумом. Основни релаксантни ефекат исказан дозном зависношћу преко линеарне регресије се мења тако да се линеарност после третмана са ТЕА и 4АР губи. Стога су криве дозне зависности релаксације утеруса под утицајем пинацидила код ових претретмана фитоване и сигмоидално.

Претретман са ТЕА на контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом доводи до губитка линеарности ефекта (регресиони фит није статистички значајан), али не прелази ни у сигмоидални (сигмоидални фит није статистички значајан), што указује на промену опсега доза у оквиру којих пинацидил делује, као и на недостатак класичног односа доза-ефекат. После претретмана са ТЕА, ниске дозе концентрације пинацидила немају ефекат на релаксацију (10<sup>-8</sup>–10<sup>-6</sup>), док је са вишим концентрацијама релаксација прилично смањена (ефекат претретмана (Т) и интеркација (Р x Т) у ANOVA).

И претретман са 4АР доводи до губитка линеарности дозне зависности пинацидила (модел линеарне регресије није статистички значајан), али се кинетика трансформише у сигмоидални облик. Претретман са 4АР смањује релаксантни ефекат пинацидила и помера ED<sub>50</sub> вредности ка вишим.

У односу на сам пинацидил, претретман са глибенкламидом на Са<sup>2+</sup>-индуковане контракције утеруса довео је до почетне стимулације активности након апликовања пинацидила, а релаксација настаје тек са концентрацијом пинацидила од 10<sup>-4</sup>. Линеарни карактер криве остаје, али се екстраполација може урадити и преко сигмоидалног модела, који јасно показује вишеструко повећање ED<sub>50</sub> вредности (p<0.001). У сваком случају, претретман глибенкламидом доводи до значајног смањења релаксантног ефекта пинацидила.

У горе описаним експериментима показали смо да глибенкламид антагонизује релаксантни ефекат пинацидила на спонтану ритмичку активност, као и на Са<sup>2+</sup> тип активације изолованог утеруса пацова. Међутим, из приказаних концентрацијски-зависних кривих може се видети да глибенкламид снажније инхибира релаксантни ефекат пинацидила на контракције изолованог утеруса пацова изазване Са<sup>2+</sup> него спонтану ритмичку активност утеруса. С друге стране, и друга два испитивана блокатора калијумских канала (4-АР и ТЕА), али у вишим еквимоларним концентрацијама, у сличном степену антагонизују релаксантни ефект пинацидила на испитиваним типовима активације изолованог утеруса. 4-АР и ТЕА, као и глибенкламид, снажније инхибишу релаксантни ефекат пинацидила на контракције изолованог утеруса пацова изазване Са<sup>2+</sup> него спонтану ритмичку активност утеруса.

С обзиром да су сва три блокатора  $K^+$  канала у сличном степену антагонизовала инхибиторни ефект пинацидила на овим типовима активације, из наших резултата може се закључити да је у ефекту пинацидила заступљено отварање све три врсте  $K^+$  канала, што је делом у супротности са већ увреженим схватањем да у механизму релаксантног ефекта пинацидила лежи углавном отварање  $K_{ATP}$  –зависних канала.

Због тога је тип калијумских канала на које пинацидил делује још увек релативно нејасан и циљ даљег истраживања. Тако на пример, неки експерименти су дали за право својим ауторима да претпоставе да пинацидил у утерусу и панкреасу своје ефекте остварује деловањем односно отварањем  $K_{ATP}$  калијумских канала (Mandi and Sarkar, 2005). Међутим, у другим истраживањима изнета је претпоставка да се релаксантни ефекат пинацидила може приписати и отварању  $Ca^{2+}$ - зависног калијумског канала (Khan i sar., 1998).

У нашим експериментима смо показали да, не само глибенкламид, већ и 4-AP и ТЕА, антагонизују релаксантни ефекат пинацидила на спонтану ритмичку активност, као и на  $Ca^{2+}$  типу активације изолованог утеруса пацова. При том, сва три ВКК су снажније инхибисали релаксантни ефекат пинацидила на контракције изолованог утеруса пацова изазване  $Ca^{2+}$  него спонтану ритмичку активност утеруса. На основу наших резултата, може се закључити да је у ефекту пинацидила заступљено отварање све три врсте  $K^+$  канала, а не само  $K_{ATP}$  или  $Ca^{2+}$ -зависног КК.

Глибенкламид, који је један од првих блокатора калијумских канала уведених у клиничку праксу, доводи до продужене деполаризације спречавајући излазну струју калијума одговорну за реполаризацију ћелијске мембране. На тај начин продужава деполаризацију и отварање волтажних калцијумских канала. Због оваквог ефекта, глибенкламид се користи као антидијабетик, пошто улазак калцијума у ћелије панкреаса подстиче ослобађање инсулина. Са друге стране, показано је да глибенкламид доводи до инхибиције контракција артеријских мишићних елемената, вероватно блокирајући волтажно-зависне  $Ca^{2+}$  КК (Crosbie, 2000).

Анализа концентрацијски - зависних кривих за пинацидил у присуству GLB, ТЕА и 4-AP на различитим типовима активације изолованог утеруса пацова упућује на закључак да се максимални инхибиторни ефект, постигнут са високим концентрацијама пинацидила ( $> 1 \mu M$ ), који је иначе неосетљив на поменуте ВКК, посебно глибенкламид, вероватно не одвија само преко  $K_{ATP}$ , већ и механизмима који нису у вези са калијумским каналима. У прилог овом закључку говори и чињеница да 4-AP и ТЕА такође нису у стању да антагонизују максимални инхибиторни ефекат пинацидила, као што то могу при примени нижих концентрација овог лека. Novaković i saradnici (2007) су на основу својих експеримената у којима је испитиван релаксантни ефекат пинацидила на изоловани утерус активиран са ниским (20 mM) и високим концентрацијама (40 mM, 80 mM) KCl раствора установили, слично као и ми у нашим

експериментима, да је контракција са 20 mM KCl била сензитивна на глибенкламид. Овај блокатор калијумских канала је значајно померио у десно концентрацијски - зависну криву за пинацидил, што указује да пинацидил инхибише контракције изолованог утеруса пацова изазване KCl кроз отварање  $K_{ATP}$  канала. Ови налази не одступају од налаза на глатким мишићима пулмонарне артерије заморца (Eltze, 1989) и мезентеричне артерије пса (Masuzawa i sar., 1990). Међутим, пинацидил је инхибисао и контракције глатког мишића утеруса пацова изазване са 40 mM и 80 mM KCl, што је наша додатна потврда, али и других аутора, да се механизам дејства пинацидила не одвија само кроз калијумске канале (Novaković i sar., 2007; Kordić-Bojinović i sar., 2012; Milovanović i sar., 2012). Сличне резултате су добили и други аутори на утерусу пацова (Piper i sar., 1990), мезентеричној артерији пса (Masuzawa i sar., 1990), трахеји заморца (Nielsen-Kudsk i sar., 1988) и аорти зеца (Cook, 1989). Насупрот томе, пинацидил није у стању да антагонизује контракције на изолованом хуманом гравидном и негравидном утерусу изазване високо концентрованим раствором калијума (Morrison i sar., 1993; Kostrzewska i sar., 1996), вероватно због различитих концентрација (0.01 - 10  $\mu$ M) пинацидила, али и могуће species селективности пинацидила.

Експерименти у којима смо показали да глибенкламид доводи до паралелног померања концентрацијски – зависне криве за пинацидил у десно, без антагонизовања максималне инхибиције, је потврда да су  $K_{ATP}$  канали укључени у релаксантни ефекат пинацидила на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова. Некомпетитивна природа антагонизма између глибенкламида и пинацидила сугерише да постоје неки додатни механизми деловања пинацидила, односно компликованија схема деловања пинацидила на спонтану контрактилност од поједностављеног објашњења утицаја само на  $K_{ATP}$  канале.

У литератури се пинацидил углавном наводи као отварач  $K_{ATP}$  канала, мада он може да делује и на отварање  $ВК_{Ca}$  канала (Khan i sar., 1998; Stockbridge i sar., 1991). Могуће је да када се ради о спонтаној ритмичкој активности изолованог утеруса пацова, коју смо користили као један од типова активације, пинацидил утиче више на отварање  $ВК_{Ca}$  канала него на друге калијумске канале. Релаксација хуманог утеруса, али и других глатких мишића, изазвана пинацидилом, једним делом се одвија и кроз активацију  $ВК_{Ca}$  канала (Khan i sar., 1998; Gojković i Kažić, 1994; Novaković i sar., 2007; Jokanović, 2011; Drakul i sar., 2012; Sokolović i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2012).

Међутим, не може се занемарити наш резултат са померањем у десно концентрацијски - зависне криве за пинацидил у присуству глибенкламида и тиме логична потврда да су  $K_{ATP}$  канали укључени у релаксантни ефекат пинацидила на спонтане контракције глатких мишића утеруса пацова. На изолованом хуманом гравидном утерусу,  $K_{ATP}$  канал није био осетљив на директну апликацију АТФ или глибенкламида, иако је пинацидил на интактном препарату инхибисао

контракције хуманог утеруса (Khan i sar., 1998). Такође, установљене су велике разлике између  $EC_{50}$  вредности пинацидила неопходних за релаксацију глатког мишића утеруса и  $EC_{50}$  вредности добијених за активацију појединачног  $VK_{Ca}$  канала.  $EC_{50}$  вредност за пинацидилом посредовану активацију  $VK_{Ca}$  је била 50 пута већа од концентрације која је довела до релаксације. Разлог за ове разлике лежи у вишеструком месту деловања пинацидила на  $K_{ATP}$  и  $VK_{Ca}$  канале (Jokanović i sar., 2010). Да ли пинацидил, поред  $K_{ATP}$  канала, делује и на  $VK_{Ca}$  канале, или утиче на ослобађање  $Ca^{2+}$  посредством укључивања путева другог гласника ( $IP_3$ ), мора се још увек истраживати, имајући у виду недостатак електрофизиолошких података о  $K_{ATP}$  каналима. Додатно могуће разјашњење пружају налази Zhang i Bolton (1996) о постојању два типа  $K_{ATP}$  осетљивих калијумских канала у глатким мишићима вене порте пацова, што би евентуално могло да објасни некомпетитивни антагонизам пинацидила и глибенкламида. У прилог овој хипотези су експерименти са „patch clamp“ техником. Њима су идентификована два типа  $K^+$  канала, од којих активност једног типа, означеног као LK, није могла бити стимулирана пинацидилом, али га је глибенкламид могао блокирати. Активност овог подтипа се смањивала током времена, али се могла и регенерисати кратком апликацијом Mg-АТР или дифосфатних нуклеотида, као што је урацил- дифосфат (UDP), уз присуство  $Mg^{2+}$ . Други подтип је обележен као МК и његова активност се смањивала ако је раствор у коме је био изолован „patch“ техником био без нуклеотида, али брзо се активирао по додавању UDP или АТР и није захтевао присуство  $Mg^{2+}$  јона. Пинацидил је повећавао активност овог подтипа, а глибенкламид га је блокирао, уз присуство UDP или АТР. Дакле, на LK подтип  $K_{ATP}$  канала пинацидил није имао утицаја, а глибенкламид га је блокирао. Да ли би такав случај могао бити и са  $K_{ATP}$  каналима у ткиву глатке мускулатуре утеруса, без обзира што се морфолошки разликују од типа  $K_{ATP}$  у глаткој мускулатури крвних судова, свакако треба у будућности истражити, сматрамо ми, Kordić-Bojinović i saradnici (2012), али и Jokanović i saradnici (2010).

Могући узрок некомпетитивне релације пинацидил – глибенкламид може бити „pacemaker“ иницијација и одржавање спонтане ритмичке контрактилности путем „gap junction“ , на које пинацидил нема утицаја. Ова чињеница могла би да објасни зашто су за инхибицију овог типа контракција миометријума биле потребне највеће дозе пинацидила. Али, могуће објашњење некомпетитивне природе антагонизма глибенкламида и пинацидила можда лежи и у паралелном утицају пинацидила на  $VK_{Ca}$  и  $K_{ATP}$  канале, или у могућности да постоје два подтипа  $K_{ATP}$  канала: пинацидил – осетљив и пинацидил – неосетљив, који учествују у механизму деловања пинацидила, посебно на спонтану активност утеруса (Jokanović i sar., 2010; Sokolović i sar., 2012; Kordić-Bojinović i sar., 2010, 2012). Неопходна су будућа електрофизиолошка истраживања и експерименти са специфичним блокаторима у циљу

прецизнијег дефинисања улоге типова/подтипова калијумских канала на спонтану ритмичку активност глатког мишића утеруса.

У вези са дискусијом наших резултата са пинацидилом и миноксидилом, вреди напоменути најважније чињенице које доприносе бољем разумевању „неочекиваних“ резултата у нашем раду, о којима смо опширно дискутовали. Због тога треба рећи да је најдоминантнији и најбоље проучени калијумски канал- $\text{VK}_{\text{Ca}}$  канал, како у гравидном, тако и у негравидном утерусу, а њихова експресија се знатно разликује у трудноћи и у току порођаја. Показан је губитак  $\text{Ca}^{2+}$  осетљивости и смањење проводљивости калијума у  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  каналима у току порођаја, када се прекида миоетријско мировање које је иначе карактеристично за нормалну трудноћу.

За АТР-зависне калијумске канале, као што је показано и нашим експериментима, постоје опречна мишљења. Наиме, ефекти пинацидила и левкромакалима на спонтану и окситоцином индуковану активност гравидног хуманог миоетријума могу бити блокирани глибенкламидом, али не и толбутамидом. Међутим, Khan i saradnici (1988, 2001) наводе да нема директних електрофизиолошких података који би потврдили постојање ових канала у људском миоетријуму. Разлози за поменуте контраверзе можда леже у следећем: 1.  $\text{K}_{\text{АТР}}$  канали су присутни у миоетријуму, али су са врло малом густином; 2.  $\text{K}_{\text{АТР}}$  канали можда захтевају прво дејство дифосфатних нуклеотида, како би повећали њихову каналску активност и 3.  $\text{K}_{\text{АТР}}$  канали су повезани са метаболичким стањем ћелије, па се можда могу уочити када је ћелија метаболички измењена.

У нашем раду на различитим типовима активације изолованог утеруса пацова, јасно смо показали да инхибиторни ефекат максимално примењене концентрације пинацидила (100  $\mu\text{M}$ ) остаје скоро исти под било каквим условима, укључујући и присуство глибенкламида. Осим нас, само су још Piper i saradnici (1990), Novaković i saradnici (2007) и Jokanović (2011), на негравидном утерусу пацова забележили неефективност глибенкламида при примени високих концентрација пинацидила, али без комплетног објашњења овог феномена. Такође, у нама приступачној литератури нисмо нашли за сада одговарајуће објашњење механизма деловања пинацидила у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  и вишим. Може се логично претпоставити да се у тим случајевима, осим отварања калијумских канала, укључују и други механизми деловања пинацидила, попут блокаде калцијумских канала или други, можда неспецифични механизми деловања. Додатна објашњења за наведену чињеницу могу се наћи у изнетим претпоставкама да се релаксантно деловање пинацидила на глатким мишићима крвних судова остварује веома различитим механизмима: индиректно, редуцијом ослобађања неуротрансмитера (Quast, 1993) и ослобађања  $\text{Ca}^{2+}$  из интрацелуларних депоа (Greenwood i Weston, 1993; Erne i Hermsmeyer, 1991), инхибицијом рецептор - посредованог активирања  $\text{Ca}^{2+}$  осетљивости (Anabuki i sar., 1990) и инхибицијом синтезе  $\text{IP}_3$  (Itoh i sar., 1992). Недавно је изнета и претпоставка, на основу

результата на хуманој радијалној артерији, да стимулација измене  $\text{Na}^+$  -  $\text{Ca}^{2+}$  игра улогу у ефекту пинацидила који је независан од калијумских канала (Stojnić i sar., 2007).

У експериментима са пинацидилем (али и протамином и пентоксифилином) користили смо и друге блокаторе калијумских канала, укључујући ТЕА и 4-АР, због недовољно доказа да овај ОКК укључује  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канале, а што је разлог да га неки сврставају у ткз. „атипичне“ отвараче  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала, као што је то миноксидил.

Напоменули смо да смо глибенкламид, који је познат и као један од најселективнијих блокатора  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (Alexander i sar., 2006), користили са циљем да утврдимо учешће  $\text{K}_{\text{ATP}}$  канала у релаксантном дејству пинацидала, али, као што смо већ описали и код пентоксифилина и протамина, на различите типове активације негравидног утеруса пацова.

За све испитиване релаксанте користили смо и ТЕА, који је добро познати блокатор  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  канала, али се такође зна да он инхибира и неке типове волтажно-зависних  $\text{K}^+$  канала. У глатким мишићима миометријума пацова уз  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  канале су присутне и три врсте волтажно-зависних  $\text{K}^+$ -канала. То су 4-АР сензитивни, А-тип канала који се брзо инактивирају и исправљачки  $\text{K}^+$  канали са одложеним деловањем (two delayed rectifier  $\text{K}^+$  currents), које блокирају и ТЕА и 4-АР. Иако постоје индикације да  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  учествују врло мало или нимало у контроли базалне контрактилне активности миометријума пацова, односно да главну улогу имају волтажно-зависни  $\text{K}^+$  канали, показано је да код хуманог миометријума ТЕА утиче на контрактилност миометријума, што указује да  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  канали велике проводљивости могу активно учествовати у одржавању потенцијала ћелијске мембране код хуманог миометријума (Orešćanin-Dušić i sar., 2009). То значи да евентуално антагонизовање релаксантног ефекта пинацидила, пентоксифилина и протамина на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова са ТЕА, може упућивати и на значајну улогу  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  канала.

У поглављу дискусије о пентоксифилину доста детаљно смо говорили о механизму релаксантног деловања миноксидила, који је од стране неких аутора назван „атипичан отварач калијумских канала“ и о улози отварања калијумских канала, посебно  $\text{K}_{\text{ATP}}$  подтипа, у механизму деловања ова два вазодилататора. У том поглављу смо закључили да за разлику од пентоксифилина, у механизму релаксације миноксидила значајну улогу игра отварање  $\text{K}_{\text{ATP}}$ . Отварање других врста калијумских канала (волтажно-зависних  $\text{K}^+$  канала, 4АР је њихов селективни блокатор и  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  и волтажно-зависних  $\text{Ca}^{2+}$  канала, ТЕА је неспецифични блокатор) игра извесну, али не и главну улогу у механизму релаксантног деловања пентоксифилина. Међутим, већ поменути аутори (Jokanović i sar., 2010, 2011; Sokolović i sar., 2012; Milovanović i sar., 2012) у својим експериментима установили су да сва три блокатора  $\text{K}^+$  канала (GLB, 4АР и ТЕА) која смо ми испитивали, не само у експериментима са пинацидилем, већ и са пентоксифилином и протамином, у извесној мери блокирају инхибиторни ефект миноксидила на

спонтану ритмичку активност негравидног утеруса пацова, што није био сасвим случај у нашим експериментима при испитивању улоге калијумских канала у механизму релаксантног деловања пентоксифилина, протамина и пинацидила. Посебно отварање  $K_{ATP}$  није узимало значајног удела у релаксантном ефекту ових наших испитиваних супстанција.

Глибенкламид, као блокатор  $K_{ATP}$  канала, је најјачи антагонистички ефекат на релаксантни ефект миноксидила (нарочито на концентрације мање од 10 mmol/L) испољио у концентрацији 3  $\mu$ mol/L (више концентрације нису ефикасније, што указује на специфичност његовог ефекта), док су се код 4AP (селективни блокатор волтажно-зависних  $K^+$  канала) и ТЕА (неспецифични блокатор  $ВК_{Ca}$  и волтажно-зависних  $Ca^{2+}$  канала) тек концентрације 3 mmol/L показале као најефикасније. Међутим, поново напомињемо да релаксантни ефект највеће коришћене концентрације миноксидила од 10 mmol/L није било могуће антагонизовати ни једним од наведених блокатора, што је у корелацији са нашим резултатима за ова три ВКК и пинацидил.

Резултати експеримента наведених аутора са применом различитих блокатора калијумских канала указују да у механизму релаксантног ефекта миноксидила, за разлику од наших резултата са пентоксифилином, али у извесној мери и са протамином и пинацидилом, у већој мери играју улогу  $K_{ATP}$  него  $ВК_{Ca}$  и волтажно-зависни  $Ca^{2+}$  канали, посебно кад су у питању ниске концентрације овог вазодилатора. За разлику од миноксидила, комплетна инхибиција спонтане ритмичке активности изолованог утеруса пацова добијена са пинацидилом није се могла антагонизовати са глибенкламидом, што је додатни доказ да у механизму његовог релаксантног ефекта, поред отварања калијумских канала (али не  $K_{ATP}$ ), учествују и други механизми који можда не учествују у релаксацији изолованог утеруса пацова изазваној миноксидилом.

Јони натријума и хлора не узимају учешће у деловању пинацидила, јер се хиперполаришући ефекат овог ОКК одржава и у раствору са ниским концентрацијама  $Na^+$  и  $Cl^-$ , а зависи само од екстрацелуларне концентрације  $K^+$  (Itoh i sar., 1992). Познато је да различити ОКК имају различито понашање и захтевају специфичне услове за активацију калијумских канала, посебно  $K_{ATP}$  канал (Kosić i sar., 2006). Чини се да пинацидил има јединствену природу међу њима и његов механизам деловања није тако добро разјашњен као за левкромакалим или никорандил.

Многа истраживања сугеришу да се ефекат пинацидила на глатке мишиће остварује  $K_{ATP}$  каналима (Jahangir i Terzić, 2005), што ми у нашим експериментима на изолованом утерусу пацова нисмо сасвим потврдили. Такође, постоје подаци да пинацидил (али и протамин и пентоксифилин у нашим експериментима) отвара и  $ВК_{Ca}$  канале (Khan i sar., 1998), што смо ми потврдили нашим резултатима.

Међутим, за разлику од неких резултата горе наведених аутора у којима је испитиван релаксантни ефект миноксидила, али и пинацидила, у присуству глибенкламида, који сугеришу



да отварање  $K_{ATP}$  канала игра значајну улогу у механизму њиховог релаксантног ефекта, у нашим експериментима то нисмо могли да потврдимо, већ да активација других субтипова КК, као што су  $VK_{Ca}$  и волтажно-зависни  $Ca^{2+}$  канали, учествују са другим факторима у механизму релаксантног ефекта пинацидила, али и протамин-сулфата и делом пентоксифилина, на спонтану ритмичку активност, као и на  $Ca^{2+}$  типу активације изолованог утеруса пацова. У експериментима са пентоксифилином, глибенламид, као отварач  $K_{ATP}$ , је чак потенцирао релаксантни ефект пентоксифилина на овим типовима активације. С друге стране, у објашњењу механизма релаксантног деловања пинацидила, осим горе наведеног, на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова са или без присуства глибенкламида, треба укључити и друге механизме деловања (сGMP пут) и то на основу наших описаних резултата са метиленским правилом. Детаљно смо у овом раду дискутовали о разлозима зашто глибенкламид примењен у широком распону концентрација није у стању да антагонизује максимални инхибиторни ефект пинацидила на спонтаној ритмичкој активности изолованог утеруса пацова постигнут са концентрацијом од 100  $\mu$ M. С друге стране, глибенкламид је антагонизовао релаксантни ефект нижих концентрација пинацидила, који се остварује кроз отварање  $K_{ATP}$  канала, али на калцијумском типу активације.

У модулирању ефекта отварања калијумских канала, поред досадашњих фактора које смо дискутовали, а који су били поента наших истраживања у овој доктоској тези, вреди напоменути да се на основу најновијих истраживања може рећи да ендогени  $H_2O_2$  има удела у том процесу. Наиме, Arriah i saradnici (2009, 2012) тврде да  $H_2O_2$ , оксидацијом тиолне интрацелуларне групе канала, доводи до његове активације, а тиме и релаксације глатког мишића. Телијски антиоксидативни одбрамбени систем се активира активацијом одбрамбеног механизма глутатион пероксидазе (GSHPx), али не и каталазног (CAT) одбрамбеног механизма. Интрацелуларни редокс механизам репарира оксидациона места и поново успоставља деактивацију Kv канала, успостављајући контрактилност. Ови резултати горе цитираних аутора показују да Kv могу да се мењају у временски-зависном оквиру са реверзибилним редокс-зависним интрацелуларним променама.

На основу наших резултата испитивања улоге отварања калијумских канала у механизму релаксације пентоксифилина, протамин-сулфата и пинацидила, али и резултата Јокановић i saradnika (2011) и Sokolović i saradnika (2012) са миноксидилом, може се извући очигледан закључак да вазодилататори у свом механизму деловања укључују различите врсте калијумских канала, као и да модулација калијумских канала није иста код различитих типова активације глатког мишића.

Сматрамо да је вредно напоменути, уз констатацију да наше тврдње не искључују неопходну истраживачку сумњу и скромност, да смо нашим експериментима у оквиру овог докторског рада допринели остваривању нашег постављеног циља- утврђивања улоге отварача калијумских канала у спречавању нежељених контракција утеруса, уз најаву развоја новог специфичног токолитика. Поред свега овога, ипак, један од највећих изазова је могућност примене отварача калијумових канала као лекова за спречавање превременог порођаја и побачаја, али и других поремећаја контрактилности утеруса. Међутим, свесни смо чињенице да је трновит пут до развоја новог лека из групе ОКК, али и нове индикације, као и да овде прича није једноставна, јер су у овим глатким мишићним ћелијама рецептори и јонски канали значајно под утицајем промена у нивоима хормона, пре свега естрогена и прогестерона. Такође, многе промене се дешавају на нивоу утеруса, па самим тим и на нивоу миометријума, у току еструсног циклуса, кроз гравидитет, у току партуса и постпартуса. Све ове чињенице имали смо у виду при планирању истраживања, свесни чињенице да овде још нема апликативних резултата, тј. конкретно нових токолитика који су везани за отварање калијумових канала. Због тога се надамо да ће наша у овом раду презентирана истраживања представљати добар темељ за наставак студирања утицаја ОКК, али и других вазодилататора, осим пентоксифилина и протамина, са неразјашњеним механизмом деловања на миометријум, у *in vivo* условима, на животињама, а касније и на људима, која ће дати коначан одговор да ли отварачи калијумских канала могу да буду лекови за спречавање патолошке контрактилности утеруса.

# Закључци

### **Закључци о експериментима са пентоксифилином**

1. Пентоксифилин је изазвао концентрацијски-зависну инхибицију спонтане ритмичке активности, као и калцијумом (са 0.018 и 0.36 mM) и ацетилхолином индуковане контракције изолованог утеруса пацова. Степен релаксантног дејства пентоксифилина зависио је од типа активације глатког мишића утеруса.
2. Најснажнији релаксантни ефекат пентоксифилин показује на спонтано активним утерусима (најмања ED<sub>50</sub>), док је веома слаб на утерусима стимулираним Ach. Релаксантни ефекат је јасно изражен и код Ca<sup>2+</sup> (0.018 mM) стимулираних утеруса. Активација двоструком количином калцијума (0.36 mM) смањује релаксантни ефекат пентоксифилина тако да и при највишим употребљеним концентрацијама не долази до потпуне релаксације, што указује да он у извесној мери делује као калцијумски антагонист.
3. Обзиром да за разлику од метиленског плавила, L-аргинин не антагонизује релаксантни ефекат пентоксифилина на контракције изолованог утеруса пацова (осим делимично на спонтану ритмичку активност, не мењајући његов максимални инхибиторни ефекат), може се закључити да је у механизам релаксантног дејства пентоксифилина на глатки мишић утеруса највероватније укључен и сигнални пут са cGMP, независан од NO.
4. Претретман са 4AP (блокатор BK<sub>Ca</sub>) значајно смањује релаксантни ефекат пентоксифилина на спонтану ритмичку активност, нарочито у опсегу нижих доза (што је статистички исказано F-тестом), али не мења релаксантни ефекат највише дозе пентоксифилина. На калцијумском типу активације, TEA (блокатор волтажно-зависних Ca<sup>2+</sup> канала) смањује релаксантни ефекат пентоксифилина (статистички значајна разлика ED<sub>50</sub> вредности у односу на сам пентоксифилин), највише због његове ефикасности у нижим дозама, док претретман са 4AP доводи до смањења релаксантног ефекта у вишим концентрацијама пентоксифилина, тако да се у присуству 4AP није могао постићи његов максимални релаксантни ефекат (F-тест; p<0.05). С друге стране, претретман глибенкламидом, блокатором K<sub>ATP</sub> канала, чак доводи до статистички значајног повећања релаксантног ефекта пентоксифилина, јер се због продужене деполаризације спречава излазна струја калијума одговорна за реполаризацију ћелијске мембране.
5. Наши резултати са испитивањем релаксантног ефекта пентоксифилина у присуству блокатора калијумских канала ВКК (GLB, 4AP, TEA) указују да у механизму његовог деловања калијумски канали, посебно K<sub>ATP</sub> канали, код оба испитивана типа активације, не играју тако значајну улогу као што је то у случају пинацидила или протамина.

**Генерални закључак:** Добијени резултати сугеришу да у механизму релаксантног деловања пентоксифилина, који зависи од типа активације глатког мишића утеруса, није заступљено отварање АТР калијумских канала. Међутим, отварање  $VK_{Ca}$  и *voltažno-zavisnih*  $Ca^{2+}$  калијумских канала има известан значај, али у различитом степену, у механизму релаксантног деловања пентоксифилина на спонтану ритмичку активност и контракције проузроковане са калцијумом. Обзиром да релаксантни ефект пентоксифилина зависи и од концентрације калцијума у медијуму (слабији ако је контрактилна активност изазвана са 0.36 mM у односу на 0.018 mM), може се рећи да и пентоксифин, у извесној мери, делује као калцијумски антагонист. Наши резултати су додатна потврда о доминацији NO/cGMP сигналинских путева којима пентоксифин проузрокује релаксацију глатких мишићних ћелија утеруса (јер метиленско плавило значајно антагонизује његов ефект) у односу на отварање калијумских канала, посебно АТР-зависних калијумских канала. Ови резултати указују да би пентоксифин могао да буде потенцијални токолитички лек.

### **Закључци о експериментима са протамин-сулфатом**

1. Протамин-сулфат (PS) у растућим концентрацијама, од 10 до 400  $\mu\text{g/ml}$ , проузроковао је концентрацијски-зависну инхибицију испитиваних типова активације изолованог утеруса пацова, која зависи од типа активације и био је јаче изражен на спонтаној ритмичкој активности него на контракцијама изолованог утеруса проузрокованим калцијумом. Најслабији релаксантни ефект протамин-сулфат је испољио на контракције проузроковане ацетилхолином.
2. На основу експеримената са испитивањем инхибиторног ефекта протамин-сулфата у присуству GLB, 4-AP и ТЕА, може се закључити да његов релаксантни ефект само делом зависи од отварања калијумских канала. У експериментима на спонтано активним утерусима, само је претретман са ТЕА делимично антагонизовао релаксантни ефекат протамин-сулфата, што значи да код релаксације на овом типу активације нису укључени АТР калијумски канали, а само делимично  $VK_{Ca}$ . С друге стране, код  $Ca^{2+}$ -индукованог типа активације утеруса, само претретман са вишим концентрацијама глибенкламида ( $2 \times 10^{-6}\text{M}$ ), а ТЕА и 4AP само делимично (што зависи од начина обраде резултата), антагонизују релаксантни ефекат протамин-сулфата.
3. Претретман са метиленским плавилом (спречавањем интеракције NO са гванилатном циклазом и инхибицијом синтезе cGMP) значајно антагонизује релаксантни ефект растућих

концентрација протамин-сулфата, што значи да у механизму његовог релаксантног дејства на глатки мишић утеруса учествује и сигнални пут са cGMP.

4. Познато је да је индометацин неселективни инхибитор циклооксигеназе (COX 1 и COX 2), који је у стању да спречи превремени порођај, редуковањем материчних контракција кроз инхибицију синтезе простагландина у утерусу. Претретман са индометацином, сам по себи, у садашњим експериментима, није мењао активност изолованог утеруса пацова. Међутим, индометацин је значајно потенцирао релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова, док је његов ефект на активност индуковану калцијумом смањивао.

**Генерални закључак:** Протамин-сулфат (PS) изазива концентрацијски-зависну релаксацију, која зависи од типа активације изолованог утеруса, делом путем калијумских канала и, у извесној мери, преко адренергичких рецептора и посредством азот-моноксид (NO)-зависних путева. Ефект претретмана са индометацином, неселективним инхибитором COX 1 и COX 2, на релаксантни ефект протамин-сулфата, зависи од типа активације. С једне стране, индометацин је значајно потенцирао релаксантни ефект протамин-сулфата на спонтану ритмичку активност, а с друге стране, смањивао је његов ефект на контракције изолованог утеруса пацова индуковане калцијумом.

#### **Закључци о експериментима са пинацидилом**

1. Пинацидил (10nM-0.1mM) изазива концентрацијски-зависну инхибицију различитих типова активације изолованог утеруса пацова. Степен инхибиторног ефекта пинацидила зависи од типа активације.
2. Генерално се може рећи да овај отварач калијумских канала проузрокује снажнији релаксантни ефект на спонтаној ритмичкој активност и контракцијама изолованог утеруса пацова индукованим калцијумом или електричном стимулацијом (скоро у подједнаком степену) него на контракције индуковане ацетилхолином, окситоцином и калијум-хлоридом. Највише концентрације пинацидила су биле неопходне за инхибицију тоничних контракција изазваних високом концентрацијом раствора KCl од 80 mM, нешто ниже за инхибицију контракција изазваних ацетилхолином, окситоцином и 40 mM калијум-хлоридом (n=6), док су најниже концентрације пинацидила биле довољне за инхибицију контракција индукованих са окситоцином и 20 mM KCl (најмања ED<sub>50</sub>).

3. Метиленско плавило антагонизује релаксантни ефекат пинацидила на спонтану ритмичку активност глатког мишића изолованог утеруса пацова, што говори да је у механизму његовог дејства делом укључен и сигнални пут са cGMP, независан од NO - учешће cGMP пута у механизму релаксантног ефекта пинацидила.
4. L-аргинин антагонизује релаксантни ефект пинацидила, најочљивије са концентрацијом од  $10^{-5}$  M, када је његово релаксантно дејство смањено за око 55% у односу на контролу. Могуће објашњење ове појаве је да је примена L-аргинина створила погодне услове за настанак снажног оксидационог једињења, пероксинитрита.
5. У експериментима у којима смо испитивали утицај блокатора калијумских канала: глибенкламида/GLB (блокатор отварања  $K_{ATP}$  канала), 4-аминопиридина/4AP (блокатор  $ВК_{Ca}$ ) и тетраетиламонијума/TEA (блокатор волтажно-зависних  $Ca^{2+}$  канала) на релаксантни ефект пинацидила на спонтану ритмичку активност и контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом, показали смо да у механизму његовог деловања отварање различитих типова калијумских канала нема подједнак значај.
6. Генерално, може се рећи да у релаксантном ефекту пинацидила на оба типа активације, отварање  $K_{ATP}$  канала није од пресудног значаја, као што је то случај са другим типовима калијумских канала. С друге стране, претретман са 4AP (блокатор  $ВК_{Ca}$ ) и TEA (блокатор волтажно-зависних  $Ca^{2+}$  канала) на калцијумском типу активације смањује релаксантни ефекат пинацидила (статистички значајна разлика  $ED_{50}$  вредности у односу на сам пинацидил), највише због његове ефикасности у нижим концентрацијама, док претретман са 4AP доводи до смањења релаксантног ефекта у вишим концентрацијама пинацидила, тако да се у присуству 4AP није могао постићи његов максимални релаксантни ефекат.
7. У механизму релаксантног деловања пинацидила на испитиваним типовима активације није значајније заступљено отварање  $K_{ATP}$  канала. Међутим, отварање  $ВК_{Ca}$  и волтажно-зависних  $Ca^{2+}$  канала има извештан значај, али у различитом степену, у механизму релаксантног ефекта пинацидила на контракције изолованог негравидног утеруса пацова изазване калцијумом.
8. Пинацидил је инхибисао спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова (малим делом посредством активације  $K_{ATP}$  канала), као и контракције проузроковане електричном стимулацијом, (КК), али и калијум – независним механизмима, који су повезани са интрацелуларном концентрацијом  $Ca^{2+}$  и/или cGMP путем.  $Ca^{2+}$  - индуковану контрактилност пинацидил је инхибисао већим делом путем активације  $ВК_{Ca}$ .

9. Инхибиторни ефекат високих концентрација пинацидила (100 $\mu$ M) на различитим типовима активације изолованог утеруса пацова остаје исти под било каквим условима, укључујући и присуство глибенкламида. Међутим, некомпетитивна природа антагонизма између глибенкламида и пинацидила сугерише на сложенији механизам дејства пинацидила на спонтану контрактилност изолованог утеруса од поједностављеног тумачења његовог дејства само на  $K_{ATP}$  канале. Наши резултати пружају чврсту основу за тврдњу да пинацидил у нижим концентрацијама, од 1 $\mu$ M и мањим, делује хиперполаризацијом сарколеме услед отварања  $K_{ATP}$  канала. У вишим концентрацијама, овај „отварач калијумских канала“ изазива додатну релаксацију (независну од  $K_{ATP}$  канала) кроз укључивање cGMP сигналног механизма, који може да инхибише синтезу и/или промет  $IP_3$ , а тиме у крајњој инстанци и да утиче на интрацелуларну концентрацију  $Ca^{2+}$ .

10. Способност пинацидила да комплетно релаксира негравидни утерус пацова преконтрахован са раствором богатим  $K^+$  сугерише да  $K^+$  канал - независни механизми учествују у његовом релаксантном ефекту. MB, за разлику од L-NAME, је сигнификантно антагонизовао релаксантни ефект пинацидила на спонтану ритмичку активност, што имплицира да cGMP пут игра значајну улогу у механизму његовог дејства. Инхибиција COX ензима са индометацином не игра значајну улогу у релаксантном ефекту пинацидила, као што је то у случају протамина, на поменутом типу активације.

### **Генерални закључак**

*Пинацидил је инхибисао спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова (малим делом посредством активације  $K_{ATP}$  канала), као и контракције проузроковане електричном стимулацијом, (КК), али и калијум – независним механизмима, који су повезани са интрацелуларном концентрацијом  $Ca^{2+}$  и/или cGMP путем.  $Ca^{2+}$  - индуковану контрактилност пинацидил је инхибисао већим делом путем активације  $VK_{Ca}$ .*

*Садашњи подаци показују да пинацидил испољава снажне релаксантне карактеристике у негравидном утерусу пацова у еструсној фази, због чега може да се узме у обзир као могући агенс за лечење дисменореје и токолизу. Сличан општи закључак се може извући и за пентоксифилин или протамин. На еквимоларној основи, пинацидил је испољио јачи релаксациони потенцијал од пентоксифилина и протамина. Могућност утицаја на активност калијумских канала у утерусу, али и другим механизмима независним од њих (NO/cGMP пут или блокирање  $Ca^{2+}$  канала), уз приступ селективној контроли миометријске активности, као и развој високо специфичних агониста калијумских канала, може имати потенцијалну*



*терапијску вредност, не само у регулацији дисменореје, већ и у спречавању превременог порођаја и побачаја.*

СКРАЋЕНИЦЕ

АТР – аденозин-трифосфат  
 МЛСК – киназа лаких ланаца миозина  
 МЛС – лаки ланци миозина  
 сАМР – циклични аденозин- монофосфат  
 Р<sub>i</sub> – фосфорна група  
 РКС – протеин киназа С  
 К<sub>v</sub> – волтажно- зависни К<sup>+</sup> (К<sub>v</sub>) канали  
 ВК<sub>Ca</sub> – Са<sup>2+</sup> - активисани К<sup>+</sup> канали велике проводљивости  
 К<sub>ir</sub> – улазно-исправљачки К<sup>+</sup> канали  
 К<sub>АТР</sub> – АТР-сензитивни К<sup>+</sup> канали  
 4-АР – 4-аминопиридин  
 АДР – аденозин-дифосфат  
 СУР – рецептор за сулфониуреу  
 РКА – протеин киназа А  
 DAG – диацилглицерол  
 ИТР – инозитол 1,4,5-трифосфат  
 NO – азот-моноксид  
 РGI<sub>2</sub> – простациклин  
 NOS – NO-синтаза  
 СОХ – ензим циклооксигеназа  
 SOD – супероксид дисмутаза  
 ОКК – отварачи калијумских канала  
 ВКК-блокатори калијумских канала  
 Fe – фенилефрин  
 Ach – ацетилхолин  
 РЕНТ- пентоксифилин  
 PS- протамин-сулфат  
 PIN – пинацидил  
 GLB- глибенкламид  
 4-АР- 4-аминопиридин  
 ТЕА- тетраетиламонијум

MP (MB) – метиленско плавило  
 IND – индометацин  
 L-arg – L-аргинин  
 L-NAME –NG-нитро-L-аргинин-метил естар  
 MnSOD – магнезијум супероксид дисмутаза  
 NT – нормотензивни пацови  
 HT – спонтано хипертензивни пацови  
 SD – стандардна девијација

# **ЛИТЕРАТУРА**

1. Aaronson PI, Sarwar U, Gin S, Rockenbauch U, Connolly M, Tillet A, Watson S, Liu B, Tribe RM. A role for voltage-gated, but not Ca<sup>2+</sup>-activated, K<sup>+</sup> channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. *Br J Pharmacol*. 2006 April; 147(7): 815–824.
2. Ackerman MJ, Clapham DE, Ion channels- basic science and clinical disease. *N Engl J Med*. 1997 May 29 ; 336 (22) :1575- 86.
3. Adams, Nehrhoff, Spate, Linke, Schulze, Baur, Gielen, Hambrecht & Schuler (2002) Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: an in vitro and in vivo study. *Cardiovasc Res* 54, 95-104.
4. Adelman JP, Shen KZ, Kavanaugh MP, Warren RA, Wu YN, Lagrutta A, Bond CT; North RA. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*. 1992 Aug ;9(2):209-16.
5. Aghdasi B, Zhang JZ, Wu Y, Reid MB, Hamilton SL:Multiple classes of sulfhydryls modulate the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel. *J Biol Chem*, 1997, 272,3739–3748.
6. Aguilar Bryan I, Clement JP 4th , Gonzales G, Kunjilwar K, Babenko A , Bryan J. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol Rev*. 1998 Jan ;78 (1) :227-45.
7. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. 1995 Apr 21;268(5209):423-6.
8. Aiello EA, Walsh MP, Cole WC. Phosphorylation by protein kinase A enhances delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995, 268: H926-H934.
9. Albrecht U, Abu-Issa R, Rätz B, Hattori M, Aoki J, Arai H, Inoue K, Eichele G. Platelet-activating factor acetylhydrolase expression and activity suggest a link between neuronal migration and platelet-activating factor. *Dev Biol*. 1996 Dec 15;180(2):579-93.
10. Alexander S, Mathie PA, Peters JA, Guide to receptors and channels, 2nd edition, *Br J Pharmacol*, 2006 ; 147 , S1-168.
11. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to receptors and channels, 2nd ed. *Br J Pharmacol*. 2006; 147 Suppl 3: S1-S180.
12. Allen & Tresini (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28, 463-499.
13. Allen SL, Boyle JP, Cortijo J, Foster RW, Morgan GP, Small RC. Electrical and mechanical effects of BRL34915 in guinea-pig isolated trachealis. *Br J Pharmacol*. 1986 Oct;89(2):395-405.
14. Allen, Lannergren & Westerblad (1995) Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. *Exp Physiol* 80, 497-527.
15. Amberg, Koh, Imaizumi, Ohya & Sanders (2003) A-type potassium currents in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C583-595.
16. Anabuki J, Hori M, Ozaki H, Kato I, Karaki H. Mechanisms of pinacidil –induced vasodilatation. *Eur J Pharmacol* 1990;190:373-9.
17. Anderson GF, Navarro SP. The response of autonomic receptors to castration and testosterone in the urinary bladder of the rabbit. *J Urol*. 1988 Oct; 140(4):885-9.
18. Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H: Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol*, 1998, 509, 565–575.
19. Anđus R. K., Opšta fiziologija i biofizika: modul 5, Beograd Centar za multidisciplinarne studije Univerziteta; Biološki fakultet, 2001.
20. Anwer K, Oberti C, Perez GJ, Perez-Reyes N, McDougall JK, Monga M, Sanborn BM, Stefani E, Toro L. Calcium-activated K<sup>+</sup> channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am J Physiol*. 1993 Oct;265(4 Pt 1):C976-85.

21. Appiah I, Milovanovic S, Radojicic R, Nikolic-Kokic A, Orescanin-Dusic Z, Slavic M, Trbojevic S, Skrbic R, Spasic M, Blagojevic D: Hydrogen peroxide affects contractile activity and anti-oxidant enzymes in rat uterus. *British Journal of Pharmacology*. 2009, 158 (8) 1932-1941.
22. Appiah Isabella, Nikolic-Kokic A, Orescanin-Dusic Z, Radojicic R, Milovanovic S, Spasic M, Blagojevic D: Reversible Oxidation of Myometrial Voltage-Gated Potassium Channels with Hydrogen Peroxide, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, Article ID 105820, 1-7.
23. Ardanaz & Pagano (2006) Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 237-251.
24. Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Cell Signal*. 1990; 2 (3) : 197-214.
25. Atkison NS, Robertson GA, Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science*. 1991 Aug 2;253(5019):551-5.
26. Balon (1999) Integrative biology of nitric oxide and exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 27, 219-253.
27. Barlow, El-Mowafy & White (2000) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> opens BK(Ca) channels via the PLA<sub>2</sub>-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H475-483.
28. Bauer & Schwarz (2001) Physiology of EAG K<sup>+</sup> channels. *J Membr Biol* 182, 1-15.
29. Beech DJ, Bolton TB. Properties of the cromakalim-induced potassium conductances in smooth muscle cells isolated from rabbit portal vein, *Br J Pharmacol* 1989, 98: 851-864.
30. Beech DJ, Zhang H, Nakao K, Bolton TB. Single channel and whole-cell K<sup>+</sup> currents evoked by levromakalim in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *Br J Pharmacol* 1993, 110: 583-590.
31. Bergdahl A., Swärd K. Cavoloae-associated signalling in smooth muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2004, 82: 289-299.
32. Bergendi, Benes, Durackova & Ferencik (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65, 1865-1874.
33. Besana, Barbuti, Tateyama, Symes, Robinson & Feinmark (2004) Activation of protein kinase C epsilon inhibits the two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TASK-1, inducing repolarization abnormalities in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem* 279, 33154-33160.
34. Blanks A.M., Zhao Z.H., Shmygol A., Bru-Mercier G., Astle S., Thornton S. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. *J Physiol*, 2007, 581 (Pt3): 915-926.
35. Blatz & Magleby (1986) Single apamin-blocked Ca-activated K<sup>+</sup> channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323, 718-720.
36. Bocksteins, Raes, Van de Vijver, Bruyns, Van Bogaert & Snyders (2009) Kv2.1 and silent Kv subunits underlie the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured small mouse DRG neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1271-1278.
37. Bolton TB, Kitamura K. Evidence that ionic channels associated with the muscarinic receptor of smooth muscle may admit calcium. *Br J Pharmacol*. 1983 Feb;78(2):405-16.
38. Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T, Benham CD. Patch and whole-cell voltage-clamp studies on single smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1986;8 Suppl 8:S20-4.
39. Bolton TB. Cholinergic mechanisms in smooth muscle. *Br Med Bull*. 1979 Sep;35(3):275-83.
40. Bonnet P, Gebremedhin D, Rush NJ, Harder DR. Effects of hypoxia on a potassium channel in cat cerebral arterial muscle cells. *Z Kardiol*. 1991 ;80 Suppl 7 : 25- 7.
41. Bradding & Wulff (2009) The K<sup>+</sup> channels K(Ca)<sub>3.1</sub> and K(v)<sub>1.3</sub> as novel targets for asthma therapy. *Br J Pharmacol* 157, 1330-1339.
42. Brainard, Korovkina & England (2007) Potassium channels and uterine function. *Semin Cell Dev Biol* 18, 332-339.

43. Bray KM , Quast U. A specific binding site for K<sup>+</sup> channel openers in rat aorta. *J Bioal Chem* 1992;267 :11689-92.
44. Bray KM, Newgreen DT, Small RC, Southerton JS, Taylor Sg, Weir SW, Weston AH 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 Jun ; 91(2) :421-9.
45. Bray KM, Weston AH, Duty S, Newgreen DT, Longmore J, Edwards G , Brown TJ. Differences between the effects of cromakalim and nifedipine on agonist –induced responses in rabbit aorta. *Br J Pharmacol.*1991 Feb ;102(2):337-44.
46. Braz *J Biol*, 2002, 62, 609–614.
47. Brookes, Yoon, Robotham, Anders & Sheu (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C817-833.
48. Brown & Borutaite (1999) Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 66, 17-25.
49. Burdyga T. & Wray S. Action potential refractory period in ureter smooth muscle is set by Ca sparks and BK channels. *Nature*, 2005, 436: 559–562.
50. Burgen AS. Drug receptors. *Br Med Bull.* 1979 Sep;35(3):269-73.
51. Burke-Wolin, Abate, Wolin & Gurtner (1991) Hydrogen peroxide-induced pulmonary vasodilation: role of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Am J Physiol* 261, L393-398.
52. Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, Salkoff L, mSlo, a complex mouse gene encoding „maxi“ calcium –activated potassium channels. *Science.* 1993 Jul 9; 261 (5118): 221-4. by estrogen in guinea pig heart. *Int J Cardiol.* 2006 Jun 7 ; 110 (1) :22-6.
53. Calogero, A.E., Fishel, S., Hall, J., Ferrara, E., Vicari, E., Green, S., Hunter, A., Burrello, N., Thornton, S., Agata, D.R. () Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Human Reproduction*, 1998, 13(4): 911-5
54. Camello-Almaraz, Gomez-Pinilla, Pozo & Camello (2006) Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C1082-1088.
55. Carl A, Sanders KM, Ca<sup>2+</sup>- activated K channels of canine colonic myocytes. *Am J Physiol.* 1989 Sep;257(3 Pt 1):C470-80
56. Char – Chang Shieh, Michael Coghlan, James P. Sullivan and Murali Gopalakrishnan . Potassium Channels. Molecular Defects, Disease, and Therapeutic Opportunities. *Pharmacological Reviews* Vol . 52, Issue 4, 557-594, 2000.
57. Cheuk JM, Hollingsworth M, Hughes SJ, Piper IT, Maresh MJ, Inhibition of contractions of the isolated human myometrium by potassium channel openers. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 ; Mar ; 168 (3 Pt 1) : 953-60
58. Chien Ek, Zhang Y, Furuta H, Hara M . Expression of adenosine triphosphate – sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues : overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonylurea – binding regulatory subunit. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 May , 180 (5) : 1121-6.
59. Choi JW, Im MW, Pai SH. Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 3:257-63.
60. Clement JP 4th, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan I, Bryan J. Association and stoichiometry of K (ATP) channel subunits. *Neuron.* 1997 May; 18 (5) : 827-38
61. Coghlan MJ, Carroll WA, Gopalakrishnan M. Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: update from a decade of progress. *J Med Chem.* 2001; 44: 1627–53.
62. Cole WC, Clement-Chomienne O. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003;14:94–103.

63. Constantinople, Disney, Maffie, Rudy & Hawken (2009) Quantitative analysis of neurons with Kv3 potassium channel subunits, Kv3.1b and Kv3.2, in macaque primary visual cortex. *J Comp Neurol* 516, 291-311.
64. Cook DI, Hales Cn. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B- cells. *Nature*.1984 Sep 20- 26 ; (5983) : 271-3.
65. Cook NS. Effect of some potassium channel blockers on contractile responses of the rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989 Feb;13(2):299-306. .
66. Covarrubias, Bhattacharji, De Santiago-Castillo, Dougherty, Kaulin, Na-Phuket & Wang (2008) The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem Res* 33, 1558-1567.
67. Crosbie AE, Vuylsteke A, Ritchie AJ, Latimer RD, Callingham BA. Inhibitory effects of glibenclamide on the contraction of human arterial conduits used in coronary artery bypass surgery. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:333-40.
68. Crozatier B. Central role of PKCs in vascular smooth muscle cell ion channel regulation. *J Mol Cell Biol* 2006, 41: 952-955.
69. Cui, Kagan, Qin, Mathew, Melman & McDonald (2001) Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *J Biol Chem* 276, 17244-17251.
70. Curley M, Cairns MT, Friel AM, McMeel OM, Morrison JJ, Smith TJ. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium. *Mol Hum Reprod*. 2002 Oct;8(10):941-5.
71. Dabertrand F., Morel J-L, Sorrentino V., Mironneau J., Mironneau C. & Macrez N. Modulation of calcium signalling by dominant negative splice variant of ryanodine receptor subtype 3 in native smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 2006, 40: 11–21.
72. Dai, Hall & Hell (2009) Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* 89, 411-452.
73. Davies M, McCurrie JR, Wood D. Comparative effects of K<sup>+</sup> channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1996; 297:249-256.
74. Davies, Quintanilha, Brooks & Packer. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, 107, 1198-1205.
75. Deng Z., Liu P., Claxton D.F., Lane S., Callen D.F., Collins F.S., Siciliano M.J. *Genomics*, 1993, 18:156-159.
76. Dessy C, Matsuda N, Hulveshorn J, Sougnez CL, Selke FW, Morgan KG. Evidence for involvement of the PKC-alpha isoform in myogenic contractions of the coronary microcirculation. *Am J Physiol* 2000: 279: H916-H923.
77. Devedeux D, Marque C, Mansour S, Germain G, Duchêne J. Uterine electromyography: a critical review. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Dec;169(6):1636-53.
78. Dixon BS, Sharma RV, Dickerson T, Fortune J. Bradykinin and angiotensin II: activation of protein kinase C in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1994, 266: C1406-C1420.
79. Doyle, Morais Cabral, Pfuetzner, Kuo, Gulbis, Cohen, Chait & MacKinnon (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.
80. Drakul D, Sokolović D, Škrbić R, Stojiljković M and Milovanović RS. The effect of pinacidil on the isolated renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *6 th European Congress of Pharmacology held in Granada, July 17<sup>th</sup> -20 th, 2012*.
81. Droge W . Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82: 47–95
82. Drummond, Cai, Davis, Ramasamy & Harrison (2000) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86, 347-354.
83. Duty S, Weston AH. Potassium channel openers. Pharmacological effects and future uses. *Drugs*. 1990 dec;40(6):785-91.

84. Eglén RM. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem.* 2005;43:105-36.
85. Eltze M. Glibenclamide is a competitive antagonist of cromakalim, pinacidil and RP 49356 in guinea-pig pulmonary artery. *Eur J Pharmacol.* 1989 Jun 20;165(2-3): 231-9.
86. Erne P, Hermsmeyer K. Modulation of intracellular calcium by potassium channel openers in vascular muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1991 Dec;344(6):706-15.
87. Erulkar SD, Ludmir J, Ger B, Nori RD. Expression of different potassium channel in cells isolated from human myometrium and leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 May;168(5):1628-39.
88. Escande D, Thuringer D, Le Guern S, Courteix J, Laville M, Caverio I. Potassium channel openers act through an activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in guinea-pig cardiac myocytes. *Pflugers Arch.* 1989 Sep ;414(6):669-75.
89. Etxeberria, Aivar, Rodriguez-Alfaro, Alaimo, Villace, Gomez-Posada, Areso & Villarroel) Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels. *FASEB J*, 2008, 22, 1135-1143.
90. Feissner, Skalska, Gaum & Sheu (2009) Crosstalk signaling between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS. *Front Biosci* 14, 1197-1218.
91. Fernando M. F. Abdalla, Elisabeth Maróstica, Zuleika P. Picarelli, Lygia C. Abreu, Maria Christina W. Avellar, and Catarina S. Porto. Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology* Volume 213, Issue 2, 15 January 2004, Pages 139-148.
92. Forstermann J. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*, 2010, 459, 923-939.
93. Frampton J, Buckley MM, Fitton A. Nicorandil. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in angina pectoris. *Drugs.* 1992 Oct;44(4):625-55.
94. Fukuto C. Chemistry of nitric oxide: biologically relevant aspects. *Adv Pharmacol*, 1995, 34, 1-15.
95. Gao & Lee Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A<sub>2</sub> production. *Br J Pharmacol*, 2001, 134, 1639-1646.
96. Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br J Pharmacol*, 2005; 146(8): 1061-8.
97. Ghatta, Nimmagadda, Xu & O'Rourke C. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* (2006) 110, 103-116.
98. 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: 525-531.
99. Gibbs, Romero, Hillier, Eschenbach & Sweet (1992) A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 166, 1515-1528.
100. Giles RW, van der Wall H, Frater C. An unusual anatomic variant of viable myocardium after infarction. *Clin Nucl Med.* 1992 Aug ;17(8):674.
101. Gil-Longo & Gonzalez-Vazquez (2005) Characterization of four different effects elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat aorta. *Vascul Pharmacol* 43, 128-138.
102. Gimple G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system : structure , function, and regulation. *Physiol rev.* 2001 Apr ;81 (2) 629-83.
103. Gojkovic L, Kazic T. A comparison of the relaxant effects of pinacidil in rabbit renal and mesenteric artery. *Gen Pharmacol.* 1994 Dec;25(8):1711-7.
104. Gojković-Bukarica L, Kažić T. Differential effects of pinacidil and levromakalim on the contractions elicited electrically or by noradrenaline in the portal vein of the rabbit. *Fundam Clin Pharmacol* 1999;13:527-34.
105. Goldstein, Bayliss, Kim, Lesage, Plant & Rajan C. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 200, 57, 527-540.



106. Goldstein, Bockenbauer, O'Kelly & Zilberberg P. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2, 2011, 75-184.
107. Gomez-Cabrera, Borrás, Pallardo, Sastre, Ji & Vina D. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, 2005, 567, 113-120.
108. Gómez-Viquez L, Guerrero-Serna G, García U, Guerrero-Hernández A. SERCA pump optimizes Ca<sup>2+</sup> release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells. *Biophys J*. 2003 Jul;85(1):370-80.
109. Gopalakrishnan M, Buckner SA, Shieh CC, Fey T, Fabiyi A, Whiteaker KL, Davis-Taber R, Milicic I, Daza AV, Scott VES, Castle NA, Printzenhoff D, London B, Turner SC, Carroll WA, Sullivan JP, Coghlan MJ and Brune ME. In vitro and in vivo characterization of a novel naphthylamide ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opener, A-151892. *Br J Pharmacol*. 2004 September; 143(1): 81–90.
110. Gordeeva, Zvyagilskaya & Labas S. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry (Mosc)*, 2003, 68, 1077-1080.
111. Graier & Hecker (2008) Endothelial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a bad guy turning good? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1691-1693.
112. Greenwood IA, Weston AH. Effects of rubidium on responses to potassium channel openers in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol*. 1993 Aug;109(4):925-32.
113. Gruss, Bushell, Bright, Lieb, Mathie & Franks (2004) Two-pore-domain K<sup>+</sup> channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol* 65, 443-452.
114. Guyton A.C., Hall J.E., *Medical Physiology*, W.B. Saunders company (Savremena administracija), 2003, poglavlje 8: 87-94; poglavlje 81: 929-944.
115. Guyton AC, Hall J. *Medicinska Fiziologija*, Savremena administracija, Beograd 1999: 214-220.
116. Hall M.H., Danielian P., Lamont R. F. The Importance of Preterm Birth. In *Preterm Labor*, ед. Elder M. J., Romero R., Lamont R. F., Churchill Livingstone, London, 1997, 1-28.
117. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*, Third edition, Oxford University Press, Inc. New York, 1999.
118. Halliwell & Gutteridge T. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol*, 1988, 7, 7-13.
119. Halliwell (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
120. Halliwell, Clement & Long (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486, 10-13.
121. Hamada Y, Nakaya Y, Hamada S, Kamada M, Aono T. Activation of K<sup>+</sup> channels by ritodrine hydrochloride in uterine smooth muscle cells from pregnant women. *Eur J Pharmacol*. 1994 Dec 15;288(1):45-51.
122. Hara Y, Kitamura K, Kuriyama H. Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea pig. *Br J Pharmacol*. 1980 Jan;68(1):99-106.
123. Hartmann H.A., Kirsch G.E., Drewe J.A., Tagliatela M., Joho R.H., Brown A.M. Exchange of conduction pathways between two related K<sup>+</sup> channels. *Science (Wash DC)* 1991, 251: 942-944.
124. Hayabuchi Y, Davies NW, Standen NB. Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C $\epsilon$ . *J Physiol* 2001b, 530: 193-205.
125. Hayabuchi Y, Standen NB, Davies NW. Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K<sup>+</sup> channels of rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 2001a, 281: H2480-H2489.
126. Hemmens & Mayer (1998) Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol* 100, 1-32.
127. Henry, Lepoivre, Drapier, Ducrocq, Boucher & Guissani (1993) EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 7, 1124-1134.
128. Hille & Schwarz (1978) Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol* 72, 409-442.

129. Hinescu ME, Popescu LM, Gherghiceanu M, Faussone-Pellegrini MS Interstitial Cajal-like cells in rat mesentery and ultrastructural and immunohistochemical approach. *J Cell Mol Med*, 2008, 1:260-270.
130. Hinkle ED, Wiersma W, Jurs GS (1994). *Applied Statistics for Behavioral Sciences*. Houghton Mifflin Company: Boston.
131. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP- regulated potassium channel. *Nature*. 1993 Mar 4;362(6415):31-8.
132. Hodgkin & Huxley J. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 1952, 117, 500-544.
133. Hoffman E.P, DuBois D.C, Hoffman R.I, Almon R.R. Expression profiling and pharmacogenomics of muscle and muscle disease. *Current Opinions in Pharmacology*. 3: 309-316, 2003
134. Hollingsworth M, Amédée T, Edwards D, Mironneau J, Savineau JP, Small RC, Weston AH. The relaxant action of BRL 34915 in rat uterus. *Br J Pharmacol*. 1987 Aug;91(4):803-13.
135. Hong, Puil & Mathers (1994) Effect of halothane on large-conductance calcium-dependent potassium channels in cerebrovascular smooth muscle cells of the rat. *Anesthesiology* 81, 649-656.
136. Houdeau E, Boyer PA, Rousseau A, Rousseau JP. Coexpression of neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in pelvic plexus neurones innervating the uterus and cervix in the rat. *Cell Tissue Res*. 1997 May;288(2):285-92.
137. Houdeau E, Rossano B, Prud'homme MJ. Regional and muscle layer variations in cholinergic nerve control of the rat myometrium during the oestrous cycle. *Auton Neurosci* 2003;104:1-9.
138. Hughes SJ, Hollingsworth M. Cellular localization of the inhibitory action of relaxin against uterine spasm. *Br J Pharmacol*. 1995;116:3028-34.
139. Ignarro, Buga, Wood, Byrns & Chaudhuri (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9265-9269.
140. Iida & Katusic (2000) Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke* 31, 2224-2230.
141. Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP – sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* . 1997 may; 16(5) . 1011-7
142. Itoh T, Seki N, Suzuki S, Ito S, Kajikuri J, Kuriyama H. Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-triphosphate in rabbit mesenteric artery. *J Physiol (Lond)* 1992; 541:307-28.
143. Jaggar, Porter, Lederer & Nelson () Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278, C235-256.
144. Jahangir A, Terzic A. K<sub>ATP</sub> channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:99-112
145. Ji T. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44, 142-152.
146. Jokanović D, Kordić-Bojinović J, **Stanković D**, Čutura N, Oreščanin-Dušić Z and Milovanović RS. The effect of potassium channel opener pinacidil on the contractile activity of non-pregnant rat uterus. *2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation*, Kragujevac, 17-20 September, 2009.
147. Jokanović D, Stanković, Kordić-Bojinović J, Oreščanin-Dušić Z, Nikolić-Kokić A, Slavić M, Mihajlo Spasić, Duško Blagojević and Milovanović RS. The effect of pinacidil on the various type activation of the isolated rat uterus. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma 2010), Copenhagen, Denmark, 17 - 23 July 2010.
148. Jokanović D: Magistarski rad: „Uticaj otvarača kalijumskih kanala na različite tipove aktivacije izolovanog uterusa”, Medicinski fakultet Foča, Univerzitet Istočno Sarajevo, 2011.

149. Jovanović A, Gojković LJ, Kažić T, Grbović L, Tulic I. Relaxation of human uterine artery in response to pinacidil : predominant role for ATP – dependent potassium channels. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1994;327:344-54.
150. Jun-Jie Y., Lao F., Fu P.P., Wamer W.G., Zhao Y., Wang P.C., Qiu Y., Sun B., Zing G., Dong J., Liang Z-J., Chen C. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*, 2008, 1-11.
151. Kajioka S, Nakashima M, Kitamura K, Kuriyama H. Mechanisms of vasodilatation induced by potassium – channel activators. *Clin Sci (Lond)*. 1991 Aug , 81 (2) : 129-39.
152. Kalezić I, Rodić V, Kitanović S, Milovanović G, Zgradić I and Milovanović S. The Effects of Ritodrine, on a receptors in smooth uterine muscle and heart atria of rats. *Arch Toxicol Kinet Xenobiot Metab* 1993; 1:112-118..
153. Kamphius J, Smit P, Thien T. (1994.): Vascular effects of pentoxifylline in humans *J Cardiovasc Pharmacol.*, 24(4):648-54.
154. Kaputlu I, Sadan G. (1994): Pentoxifylline induced vasodilatation is not endothelium-dependent in rabbit aorta *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*, 5(3-4):295-304.
155. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*. 1997 Jun;49(2):157-230.
156. Karasu (2000) Time course of changes in endothelium-dependent and -independent relaxation of chronically diabetic aorta: role of reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol* 392, 163-173.
157. Kažić T, Bukarica LjG. Potassium channels and new drug development. *Med Pregl* 1998, LI (11-12): 481-488.
158. Kažić T, Ostojić M. *Klinička kardiovaskularna farmakologija*, Beograd: Integra septembar, 2009: 44-47
159. Keating & Sanguinetti (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104, 569-580.
160. Ketchum KA , Joiner WJ , Sellers AJ , Kaczmarek LK , Goldstein SA . A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem . *Nature* . 1995 Aug 24 ;376 (6542) :690-5
161. Khan RN, Matharoo-Bell B, Arulkumaran S, Ashford ML. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol*. 2001 Mar ;86 (2) :255-64.
162. Khan RN, Morrison JJ, Smith SK, Ashford ML. Activation of large-conductance potassium channels in pregnant human myometrium by pinacidil. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 May;178(5):1027-34.
163. Khan RN, Smith SK, Morrison JJ, Ashford ML. Properties of large- conductance K<sup>+</sup> channels in human myometrium during pregnancy and labour. *Proc Biol Sci*. 1993 Jan 22;251(1330):9-15.
164. Khan, Kovacic, Kolbanovskiy, Desai, Frenkel & Geacintov D. The decomposition of peroxynitrite to nitroxyl anion (NO<sup>-</sup>) and singlet oxygen in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 20009, 7, 2984-2989.
165. Khan, Tabb, Garfield, Jones, Fomin, Samson & Grover N. Expression of the internal calcium pump in pregnant rat uterus. *Cell Calcium* ,1993, 14, 111-117.
166. Kim BK, Ozaki H, Lee SM, Karaki H. Increased sensitivity of rat myometrium to the contractile effect of platelet activating factor before delivery. *Br J Pharmacol*. 1995 Aug;115(7):1211-4.
167. Kim NR, Han J, Kim EY. Altered delayed rectifier K<sup>+</sup> current of rabbit coronary arterial myocytes in isoproterenol-induced hypertrophy. *Korean J Physiol Pharmacol* 2001, 5: 33-40.
168. Kleinhaus AL, Kao CY. Electrophysiological actions of oxytocin on the rabbit myometrium. *J Gen Physiol*. 1969 Jun;53(6):758-80.
169. Knaus, Eberhart, Glossmann, Munujos, Kaczorowski & Garcia (1994) Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cell Signal* 6, 861-870.
170. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *J. Smooth Muscle Res.* (2008) 44 (2): 65-81.

171. Kobrinsky, Stevens, Kazmi, Wray & Soldatov (2006) Molecular rearrangements of the Kv2.1 potassium channel termini associated with voltage gating. *J Biol Chem* 281, 19233-19240.
172. Kocić I, Gruchala M, Petruszewicz J. Selective inhibition of pinacidil effects by estrogen in guinea pig heart. *Int J Cardiol.* 2006 Jun 7 ; 110 (1) :22-6.
173. Kordić-Bojinović J, Jokanović D, Stanković D, Janković S, Milovanović S. Influence of modulators of relaxant effect of pentoxifylline in isolated rat uterus. *Ser J Exp Clin Res* 2010; 11 (3): 99-104.
174. Kordić-Bojinović J, Oreščanin-Dušić Z, Slavić M, Radojičić R, Spasić M, Milovanović SR, Blagojević D. Effect of indometacin pretreatment on protamine sulfate-mediated relaxation of the isolated rat uterus: the role of the antioxidative defense system. *Pharmacol Rep.* 2011;63(4):1019-28.
175. Kordić-Bojinović J, Sokolović D, Drakul D, Blagojević D, Čutura N Soldo V and Milovanović RS. The role of potassium channels and nitricoxide (NO) in the mechanism of relaxing effects of pentoxifylline on the isolated rat uterus *6 th European Congress of Pharmacology held in Granada, July 17<sup>th</sup> -20 th, 2012.*
176. Kostrzevska A, Laudanski T, Batra S. Inhibition of contractile responses of human myometrium and intramyometrial arteries by potassium channel openers. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:886-91.
177. Kovasc RJ, Nelson MT. ATP- sensitive K<sup>+</sup> channels from aortic smooth muscle incorporated into planar lipid bilayers. *Am J Physiol.* 1991 Aug ;261 (2 Pt 2) : H 604-9.
178. Krapivinsky G, Krapivinsky L, Wickman K, Clapham DE. G beta gamma binds directly to the G protein – gated K<sup>+</sup> channel, IKACH. *J Biol Chem .* 1995 Dec 8; 270 (49) : 29059-62.
179. Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S i Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005, 57: 509-526.
180. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature .* 1993 Mar 11; 362 (6416): 127-33.
181. Kume H, Takai A, Tokuno H, Tomita T. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup>- channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature.* 1989 Sep 14;341(6238). 152-4.
182. Kupittayanant S, Luckas MJM & Wray S. Effects of inhibiting the sarcoplasmic reticulum on spontaneous and oxytocin-induced contractions of human myometrium.. *BJOG,* 2002, 109: 289–296.
183. Kupittayanant S., Burdyga R., Wray S. The effects of inhibiting Rho-associated kinase with Y27632 on force and intracellular calcium in human myometrium. *Pflügers Arch.*, 2001, 443:112-114.
184. Kuriyama H, Suzuki H. The effects of acetylcholine on the membrane and contractile properties of smooth muscle cells of the rabbit superior mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1978 Dec;64(4):493-501.
185. La Lanne C, Mironneau C, Mironneau J, Svineau I P 1984. Contractions of rat uterine smooth muscle induced by acetylcholine and angiotenzin II in Ca<sup>2+</sup> free medium. *Br J Pharmacol* 84:317-326.
186. Lacy, O'Connor & Schmid-Schonbein (1998) Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 16, 291-303.
187. Lai & Jan (2006) The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 7, 548-562.
188. Latorre & Miller (1983) Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol* 71, 11-30.
189. Le Guennec, Ouadid-Ahidouch, Soriani, Besson, Ahidouch & Vandier (2007) Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2, 189-202.
190. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 2006, 21: 69-78.
191. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G , Barhanin J. A pH -sensitive yeast outward rectifier K<sup>+</sup> channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem .* 1996 Feb 23 ; 271 (8) :4183-7.

192. Li & Aldrich (2004) Unique inner pore properties of BK channels revealed by quaternary ammonium block. *J Gen Physiol* 124, 43-57.
193. Liu S, Rasmusson RL, Campbell DL Wang S, Strauss HC. Activation and inactivation kinetics of an E- 4031-sensitive current from single ferret atrial myocytes .*Biophys J* . 1996 Jun ;70(6):2704-15.
194. Liu Y, Hudetz AG, Knaus HG, Rush NJ. Increased expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in the cerebral microcirculation of genetically hypertensive rats: evidence for their protection against cerebral vasospasm. *Circ Res* 1998, 82: 729-737.
195. Löfgren M., Eklbad E., Morano I., Arner A. Nonmuscle myosin motor of smooth muscle. *J. Gen. Physiol.*, 2003, 121(4): 301-310.
196. Logsdon, Kang, Togo, Christian & Aiyar (1997) A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 272, 32723-32726.
197. Long, Campbell & Mackinnon (2005a) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309, 897-903.
198. Long, Campbell & Mackinnon (2005b) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309, 903-908.
199. Lu Z, MacKinnon R. A conductance maximum observed in an inward – rectifier potassium channel. *J Gen Physiol* 1994, 104 (3): 477-86
200. Lucchesi, Belmadani & Matrougui (2005) Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens* 23, 571-579.
201. Ludwig, Weseloh, Karschin, Liu, Netzer, Engeland, Stansfeld & Pongs (2000) Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-a-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Mol Cell Neurosci* 16, 59-70.
202. MacKinnon & Miller (1989) Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* 245, 1382-1385.
203. Maljevic, Wuttke, Seeböhm & Lerche (2010) KV7 channelopathies. *Pflugers Arch* 460, 277-288.
204. Mandi G, Sarkar SN, Mishra SK, Raviprakash V. Effects of calcium channel blocker, mibefradil, and potassium channel opener, pinacidil, on the contractile response of mid-pregnant goat myometrium. *Indian J Exp Biol* 2005;43:795-801.
205. Manley BFJ (1986). *Multivariate Statistical Methods*. Chapman & Hall: London.
206. Mannhold R. KATP channel openers: structure–activity relationships and therapeutic potential. *Med Res Rev*. 2004; 24: 213–66.
207. Marcondes FK, Bianchi FI, Tanno AP: Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations.
208. Marnett, Riggins & West (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111, 583-593.
209. Marshall JM. Behaviour of uterine muscle in Na-deficient solution; effects of oxytocine. *Amer. J. Physiol.* 1963; 204:732-738.
210. Marten & Hoshi (1998) The N-terminus of the K channel KAT1 controls its voltage-dependent gating by altering the membrane electric field. *Biophys J* 74, 2953-2962.
211. Martens JR, Gelband CH. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K<sup>+</sup> channels in genetic and nongenetic mechanisms. *Circ Res* 1996, 79: 295-301.
212. Masuzawa K, Matsuda T, Asano M. Evidence that pinacidil may promote the opening of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels yet inhibit the opening of Ca<sup>2+</sup>(+)- activated K<sup>+</sup> channels in K(+)- contracted canine mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1990; 100(1):143-9.
213. Matharoo-Ball B, Ashford ML, Arulkumaran S, Khan RN. Down-regulation of the alpha- and beta-subunits of the calcium- activated potassium channel in human myometrium with parturition. *Biol Reprod*. 2003 Jun ;68 (6):2135-41.

214. Matson, P.L., Yovich, J.M., Edirisinghe, R.W., Junk, S.M., Yovich, J.L. (1995) An argument for the past and continued use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Human Reproduction*, (Suppl): 10; 67-71
215. Mayhan WG, Mayhan JF, Sun H, Patel KP. In vivo properties of potassium channels in cerebral blood vessels during diabetes Mellitus. *Microcirculation* 2004, 11: 605-613.
216. McCallum, Greenwood & Tribe (2009) Expression and function of K(v)7 channels in murine myometrium throughout oestrous cycle. *Pflugers Arch* 457, 1111-1120.
217. McDonald & Murad (1995) Nitric oxide and cGMP signaling. *Adv Pharmacol* 34, 263-275.
218. McManus OB. Calcium –activated potassium channel: regulation by calcium. *J Bioenerg Biomembr*. 1991 Aug ;23(4):537-60.
219. McManus, Helms, Pallanck, Ganetzky, Swanson & Leonard (1995) Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 14, 645-650.
220. Meera P, Wallner M, Song M, Toro L .Large conductance voltage - and calcium- dependent K+ channel, a distinct member of voltage - dependent ion channels with seven N- terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus , and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* .1997 Dec 9 ;94(25):14066-71.
221. Miguel-Velado, Moreno-Dominguez, Colinas, Ciudad, Heras, Perez-Garcia & Lopez-Lopez (2005) Contribution of Kv channels to phenotypic remodeling of human uterine artery smooth muscle cells. *Circ Res* 97, 1280-1287.
222. Miguel-Velado, Perez-Carretero, Colinas, Ciudad, Heras, Lopez-Lopez & Perez-Garcia (2010) Cell cycle-dependent expression of Kv3.4 channels modulates proliferation of human uterine artery smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 86, 383-391.
223. Miki, Nagashima, Tashiro, Kotake, Yoshitomi, Tamamoto, Gono, Iwanaga, Miyazaki & Seino (1998) Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10402-10406.
224. Milovanovic S R, Ognjanović J, Varagic VM, Bosković B. Effect of nicardipine of the isolated rat uterus and other smooth muscles of the rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 1988; 295: 1348-58.
225. Milovanović S, Radulović M, Stanimirović V, Prostran M, Varagić V.M. Comparative effects of nitrendipine and nicardipine on the activity of the isolated rat uterus. *Periodic Biol*, Vol 90, No 2, 1988 Mart; 269-272.
226. Milovanovic S, Simović M, Cvetković M, Milovanović A, Spasić M. Systemic effect of liposomal superoxide dismutase. *Jugoslavica physiol pharmacologica acta* 1988b, 24: 57.
227. Milovanović S. R., Varagić, V.M. The effect of substances affecting cAMP and cGMP metabolism on various types of activation and the spontaneous rhythmic activity of the isolated rat uterus. *Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1984; Vol. 20, 2, 143-153.
228. Milovanovic S.R. and Varagic V.M. The effect of fendiline on cAMP metabolism and activity of the isolated uterus of the rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie* 287, No. 1, 1987.,
229. Milovanovic SR, Ognjanovic J, Varagic VM, Boskovic B. Effect of nicardipine of the isolated rat uterus and other smooth muscles of the rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 1988a, 295: 1348-1358.
- 230.** Milovanović SR, Varagić VM, Kovacević V. The effect of nitro compounds on the metabolism of cGMP and the activity of the isolated rat uterus. *Jugoslav Physiol Pharmacol. Acta* 1985 (Suppl. 3); 21:12-16.
231. Milovanovic, R. S. (1984): Značaj kalcijuma i cikličnih nukleotida u raznim tipovima aktivacije glatkog mišića uterusa, doktorska disertacija, Medicinski fakultet u Beogradu, Institut za farmakologiju i toksikologiju.
232. Milovanovic RS and Kordić-Bojinović J. The effects of nicardipine and verapamil on the circular and longitudinal muscle of the isolated rat uterus. *2nd Congress of*

- Physiological Sciences of Serbia with International Participation*, Kragujevac, 17-20 September, 2009.
233. Milovanović RS, Kordić-Bojinović, J, Sokolović D, Drakul D, Oreščanin-Dušić Z, Blagojević D, Spasić M. The role of potassium channels in the mechanism of relaxing effect of pinacidil on the isolated rat uterus. *6 th European Congress of Pharmacology held in Granada, July 17<sup>th</sup> -20 th, 2012.*
  234. Milovanović SR, Kordic-Bojinović J, Djordjevic S, Drakul D, Sokolovic D, Miletić N and Blagojević: The importance of potassium channels in the mechanisms of the relaxing effect of pentoxifylline on the isolated rat uterus. *Ser J Exp Clin Res* 2013; in press.
  235. Minami K, Hirata Y, Tokumura A, Nakaya Y, Fokuzawa K. Protein kinase C-independent inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel by angiotensin II and endothelin-1. *Biochem Pharmacol* 1995, 49: 1051-1056.
  236. Minami K, Miki T, Kadowaki T, Seino S. Roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels as metabolic sensors: studies of Kir6.x null mice. *Diabetes*. 2004;53:S176–80.
  237. Miriel V.A., Mauban J.R.H., Blaustein M.P. & Wier W.G. Local and cellular Ca<sup>2+</sup> transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J Physiol*, 1999, 518: 815–824.
  238. Mironneau J., Macrez N., Morel J.L., Sorrentino V. & Mironneau C. Identification and function of ryanodine receptor subtype 3 in non-pregnant mouse myometrial cells. *J Physiol*, 2002, 538: 707–716.
  239. Mita M., Yanagihara H., Hishinuma S., Saito M., Walsh M.P. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem J.*, 2002, 364:431-440.
  240. Miyamoto, Koh, Park, Fujiwara, Sakiyama, Misonou, Ookawara, Suzuki, Honke & Taniguchi (2003) Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem* 384, 567-574.
  241. Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, 811, 60-67
  242. Monsuez JJ. Cardiac potassium currents and channels - part I: basic science aspects. *Int J Cardiol*. 1997 Oct 10 ;61 (3) : 209-19.
  243. Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414, 37-42, 2001
  244. Morano I, Chai G.X., Baltas L.G., Lamounier-Zepter V., Lutsch G., Koff M., Haase H., Walther T., Bader M. Smooth muscle contraction without smooth muscle myosin. *Nature Cell Biol.*, 2000, 2: 371-375.
  245. Morizaki N, Morizaki J, Hayashi RH, Garfield RE. A functional and structural study of the innervation of the human uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:218-28.
  246. Morrison JJ, Ashford ML, Khan RN, Smith SK. The effects of potassium channel openers on isolated pregnant human myometrium before and after the onset of labor: potential for tocolysis. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Nov; 169(5):1277-85.
  247. Murad (1994) Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 26, 19-33.
  248. Muraki K, Imaizumi Y, Kojima T, Kawai T, Watanabe M. Effects of tetraethylammonium and 4-aminopyridine on outward currents and excitability in canine tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 1990 Jul ;100(3):507-15.
  249. Murphy & Steenbergen (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 88, 581-609.
  250. Myatt (2010) Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 31 Suppl, S66-69.

251. Nakai, Oya, Kobe, Asakura, Yokota, Koshino & Araki (2000) Changes in maternal lipid peroxidation levels and antioxidant enzymatic activities before and after delivery. *J Nippon Med Sch* 67, 434-439.
252. Narishige, Egashira, Akatsuka, Katsuda, Numaguchi, Sakata & Takeshita (1993) Glibenclamide, a putative ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker, inhibits coronary autoregulation in anesthetized dogs. *Circ Res* 73, 771-776.
253. Natuzzi, Ursell, Harrison, Buscher & Riemer (1993) Nitric oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 1-8.
254. Nelson M.T., Cheng H., Rubart M., Santana L.F., Bonev A.D., Knot H.J. & Lederer W.J. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*, 1995, 270: 633-637.
255. Nelson MT i Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle; *Am. J. Physiol.* 1995; 268: C799-C822.
256. Nielsen-Kudsk JE, Meellemkjaer S, Siggaard C, Nielson CB. Effectsof pinacidil on guinea-pig airway smooth muscle contracted by asthma mediators. *Eur J Pharmacol.*1988;157(2-3):221-6.
257. Nishiwaki H, Saitoh N, Nishio H, Takeuch T, Hata F. Possible role of potassium channels in mu-receptor- mediated inhibition and muscarinic autoinhibition in acetylcholine release from myenteric plexus of guinea pig ileum. *Jpn J Pharmacol.* 2000 Apr;82(4):343-9.
258. Noack T, Edwards G, Deitmer P, Weston AH Potassium channel modulation in rat portal vein by ATP depletion : a comparison with the effects of levcromakalim (BRL 38227). *Br J Pharmacol.* 1992 Dec , 107 (4) : 945-55.
259. Noble K. & Wray S. The role of the sarcoplasmic reticulum in neonatal uterine smooth muscle: enhanced role compared to adult rat. *J Physiol*, 2002, 545: 557-566.
260. Noble K., Zhang J. & Wray S. Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *J Physiol*, 2006, 570: 29-35.
261. Noble, Matthew, Burdyga & Wray (2009) A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144 Suppl 1, S11-19.
262. Noma A. ATP- regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 1983 Sep 8-14 ;305 (5930):147-8.
263. Novaković R, Milovanović S, Protić D , Djokić J, Heinie H, Gojković – Bukarica L .The effect of potassium channel opener pinacidil on the non – pregnant rat uterus *Basic Clin Pharmacol Toxicol* . 2007 Sep ; 101 (3) : 181-6.
264. Novaković R, Milovanović SR, Heinle H, Protić D, and Gojković-Bukarica Lj. The effect of potassium channel opener pinacidil on non-pregnant rat uterus. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2007;1742-84.
265. Obladen M., Koehne P. Interventions for persisting ductus arteriosus in the preterm infants. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 2005, chapter 2: 8-9.
266. Ohkubo T., Inoue Y., Kawarabayashi T., Kitamura K. Identification and electrophysiological characteristics of isoforms of T-type calcium channel Ca(v)3.2 expressed in pregnant human uterus. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 4-6: 245-254.
267. Ohya Y, Kitamura K, Kuriyama H. Cellular calcium regulates outward currents in rabbit intestinal smooth muscle cell. *Am J Physiol.* 1987 Apr;252(4 Pt 1):C401-10.
268. Okabe K, Kitamura K, Kuriyama H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. *Pflugers Arch* 1987, 409: 561-568.
269. Oreščanin Z, Milovanović S, Spasić S, Jones D, Spasić M (2007): Different responses of mesenteric artery from normotensive and spontaneously hypertensive rats to nitric oxide and its redox congeners. *Pharmacological Report*, 59, 325-332.
270. Oreščanin Z., Milovanović, S. Spasić, S., Miletić S., Prostran M., Spasić M. (2004.): Effect of MnSOD (E. coli) on the relaxation caused by sodium nitroprusside on isolated rat renal artery, *J. Serb. Chem. Soc.* 69 (11) 973-980 .



271. Orescanin, Z., Milovanović, S.R. (2006) Effect of L-arginine on the relaxation caused by sodium nitroprusside on isolated rat renal artery. *Acta physiologica Hungarica*, 93(4): 271-83
272. Orešćanin-Dušić Z, Milovanović S, Blagojević D, Nikolić-Kokić A, Radojičić R, Spasojević I, Spasić M (2008): Diethyldithiocarbamate potentiates the effects of protamine sulphate on the isolated rat uterus. *Redox Report 2009 Vol 14 No.*
273. Orešćanin-Dušić Z, Milovanović S, Spasić M, Radojičić R, Blagojević D. Effect of protamine sulfate on the isolated mesenteric arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Arch Biol Sci* 2008;60:163-168.
274. Orešćanin-Dušić Z., Milovanović S., Spasić M., Radojičić R., Blagojević D. (2008): Effect of protamine sulfate on the isolated mesenteric arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 60 (2), 163-168.
275. Orešćanin-Dušić Z, Milovanović S, Blagojević D, Nikolić-Kokić A, Radojičić R, Spasojević I, Spasić M: Diethyldithiocarbamate potentiates the effects of protamine sulfate in the isolated rat uterus. *Redox Report*, 2009, 14, 48–54.
276. Pacher, Beckman & Liaudet (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315-424.
277. Packer C.S. Arterial muscle myosin heavy chains and light chains in spontaneous hypertension. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 117B:19-28.
278. Pallotta (1985) N-bromoacetamide removes a calcium-dependent component of channel opening from calcium-activated potassium channels in rat skeletal muscle. *J Gen Physiol* 86, 601-611.
279. Palmer, Ferrige & Moncada (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
280. Pan, Weng, Kabaleswaran, Li, Cao, Bhosle & Zhou (2008) Cortisone dissociates the Shaker family K<sup>+</sup> channels from their beta subunits. *Nat Chem Biol* 4, 708-714.
281. Papazian, Schwarz, Tempel, Jan & Jan (1987) Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237, 749-753.
282. Park WS, Kim NR, Youm JB, Warda M, Ko JH, Kim SJ, Earm YE, Han J. Angiotensin II inhibits inward rectifier K<sup>+</sup> channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase C $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 341: 728-735.
283. Park WS, Ko JH, Kim NR, Son YK, Kang SH, Warda M, Yung ID, Park YM i Han J. Increased inhibition of inward rectifier K<sup>+</sup> channels of angiotensin II in small-diameter coronary artery of isoproterenol-induced hypertrophied model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007b, 27: 1768-1775.
284. Parkington HC, Coleman HA. Excitability in uterine smooth muscle. *Frontiers Horm Res* 2001 ;27:179-200.
285. Pelleg A, Belardinelli L, Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine : basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993 ; 27 54-61.
286. Perez G, Toro L. Differential modulation of large – conductance Kca channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. *Am J Physiol.* 1994 May; 266(5 Pt 1):C1459-63.
287. Pérez GJ, Toro L, Erulkar SD, Stefani E. Characterization of large-conductance, calcium-activated potassium channels from human myometrium *Am J Obstet Gynecol.* 1993 Feb;168(2):652-60.
288. Phillips C.L., Yamakawa K., Adelstein R.S., Cloning of the cDNA encoding nonmuscle myosin heavy chain-B and analysis of human tissues with isoform-specific antibodies. *J. Muscle Res. Cell Mot.*, 1995, 16: 390-400.
289. Piper I, Minshall E, Downing JS, Hollingsworth M, Sadraei H. Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br J Pharmacol.* 1990 July;101:901-907
290. Plant TD, Henquin JC, Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse pancreatic beta- cells. *Br J Pharmacol.* 1990 Sep;101(1):115-20.
291. Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D. Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 139-165.

292. Povstyan OV, Gordienko DV, Harhun MI, Bolton TB. Identification of interstitial cells of cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium*. 2003 Apr ;33 (4) :223-39.
293. Prostran M, Varagic VM, Todorovic Z, Jezdimirovic M. The effects of physostigmine, L-arginine and N-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) on the mean arterial blood pressure of the rat. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1994; 5:151-166.
294. Quast U. Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channels? *Trends Pharmacol Sci*. 1993 Sep;14(9):332-7.
295. Quayle, Bonev, Brayden & Nelson (1995) Pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol* 269, C1112-1118.
296. Quayle, McCarron, Brayden & Nelson (1993) Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 265, C1363-1370.
297. Quayle, Nelson & Standen (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77, 1165-1232.
298. Quirk & Reinhart (2001) Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K(ca) channels. *Neuron* 32, 13-23.
299. Rajakulendran, Schorge, Kullmann & Hanna (2007) Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy. *Neurotherapeutics* 4, 258-266.
300. Rasmusson, Morales, Wang, Liu, Campbell, Brahmajothi & Strauss (1998) Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* 82, 739-750.
301. Reid (2001) Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90, 724-731.
302. Robertson BE, Bonev AD i Nelson MT. Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup>. *Am J Physiol* 1996, 271: H696-H705.
303. Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993, 265: C299-C303.
304. Robertson, Bonev & Nelson (1996a) Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Ba<sup>2+</sup>. *Am J Physiol* 271, H696-705.
305. Roden DM. Antiarthmic drugs. In Goodman and Gillman,s *The Pharmacological Basis of Therapeutic*, 11.edition,AG Gillman,TW Rall, AS Nies, P Taylor(eds), Pergamon Press 2002:933-69.
306. Rogers, Chilian, Bratz, Bryan & Dick (2007) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates redox- and 4-aminopyridine-sensitive Kv channels in coronary vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1404-1411.
307. Ross (2004) *Histologia*: Editorial Medica Panamericana.
308. Roux (2005) Ion conduction and selectivity in K(+) channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34, 153-171.
309. Sabbadini & Yost (2009) Molecular biology of background K channels: insights from K(2P) knockout mice. *J Mol Biol* 385, 1331-1344.
310. Saez C.G., Myers J.C., Shows T.B., Leinward L.A. Human nonmuscle myosin heavy chain mRNA: generation of diversity through alternative polyadenilation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, 87:116.
311. 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 Oct;12(7):479-87.
312. Sanborn BM. Cell and molecular biology of myometrial smooth muscle function. *Semin Cell Dev Biol*. 2007; 18(3): 287-8.
313. Sanborn B.M. Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial CalciumM. *J Soc Gynecol Investig* 2000, Vol. 7, No.1

314. Sausbier M, Schubert R, Voigt V. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, 2000; 87: 825-830.
315. Schubert U, Krien U, Wulfusen I. Nitric oxide donor sodium nitropruside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels. *Hypertension* 2004; 43:891-96.
316. Schulze, Gielen, Schuler & Hambrecht (2002) Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training. *Int J Cardiol* 85, 141-149.
317. Schumacher, Rivard, Bachinger & Adelman (2001) Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Nature* 410, 1120-1124.
318. Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. Voltage –sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron*. 1996 Jun ;16(6):1159-67.
319. Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD, McHale NG. Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra. *J Physiol*. 2000 Jul 15;526 Pt 2: 359-66
320. Shamgar, Ma, Schmitt, Haitin, Peretz, Wiener, Hirsch, Pongs & Attali (2006) Calmodulin is essential for cardiac IKS channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circ Res* 98, 1055-1063.
321. Shen W –K, Kurachi Y, Mechanisms of adenosine – mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995 ;70: 274-291.
322. Sherwood L. *Human Physiology: From Cells to Systems*. Cengage Learning, 2010, 293–296.
323. Shi W, Yang Y, Shi Y, Jiang C. K(ATP) channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases. *Sheng Li Xue Bao*. 2012 Feb 25;64(1):1-13.
324. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):557-94.
325. Shimano M., Nakaya Y.: Activation of Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Human Myometrium by Nitric Oxide; Department of Obstetrics and Gynecology and Nutrition, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima 2000.
326. Shimoda LA, Sylvester JT, Sham JS. Inhibition of voltage-ated K<sup>+</sup> current in rat intrapulmonary arterial myocytes by endothelin-1. *Am J Physiol* 1998, 274: L842-L853.
327. Shmigol A., Eisner D.A. & Wray S. Carboxyeosin decreases the rate of decay of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient in uterine smooth muscle cells isolated from pregnant rats. *Pflugers Arch*, 1998, 437: 158–160.
328. Shmigol A.V., Eisner D.A. & Wray S. The role of the sarcoplasmic reticulum as a Ca<sup>2+</sup> sink in rat uterine smooth muscle cells. *J Physiol*, 1999, 520: 153–163.
329. Shyng & Nichols (1997) Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *J Gen Physiol* 110, 655-664.
330. Simons M., Wang M., McBride O.W., Kawamoto S., Yamakawa K., Gdula D., Adelstein R.S., Weir L. Human non-muscle myosin heavy chain are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ. Res.*, 1991, 69: 530-539.
331. Slavić M, Appiah I, Nikolić-Kokić A , Radojičić R , Jones DR , Spasić MB , Milovanović S , Blagojević . The anti-oxidative defence system in the isolated rat uterus during spontaneous rhythmic activity , *Acts Physiol Hung* 2006 March 8; 93(4): 335-339.
332. Slavic M, Djordjevic A, Radojicic R, Milovanovic S, Orescanin-Dusic Z, Rakocevic Z, Spasic MB, Blagojevic D: Fullerol C60(OH)<sub>24</sub> nanoparticles decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction, *J Nanopart Res* (2013) 15:1650.
333. Smith R.D., Babiychuk E.B., Noble K., Draeger A. & Wray S. Increased cholesterol decreases uterine activity: functional effects of cholesterol in pregnant rat myometrium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288: C982–C988.
334. Smith, McClure, Smith, Abel & Bradley (2007) The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reprod Biol Endocrinol* 5, 41.
335. Sokolović D, Drakul D, Oreščanin-Dušić Z, Nikolić-Kokić A, Spasić M, Blagojević D and Milovanović RS. The role of potassium channels in the mechanism of relaxing effect of minoxidil on

the isolated rat uterus. *6 th European Congress of Pharmacology held in Granada, July 17<sup>th</sup> -20 th, 2012.*

336. Son YK, Park WS, Ko JH, Han J, Kim NR, Earm YE. Protein kinase A-dependent activation of inward rectifier potassium channels by adenosine in rabbit coronary smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 337: 1145-1152.
337. Song P, Rocchi D, Lazzarotti M, Crimi E, Rehder K, Brusasco V. Postjunctional effect of pinacidil on contractility of isolated bovine trachealis. *Eur Respir J.* 1996 Oct;9(10):2057-63.
338. Sonkin PL, Chen LE, Seaber AV, Hatchell DL (1992.): Vasodilatation action of pentoxifylline on microcirculation of rat cremaster muscle, *Angiology*, 43(6):462-9.
339. Standen NB, Quale JM. K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 1998, 164: 549-557.
340. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science.* 1989 Jul 14 ; 245 (4914) : 177-80.
341. Stanković D: Magistarski rad: “Značaj modulacije kalijumskih kanala u mehanizmu relaksantnog efekta pinacidila na izolovanim krvnim sudovima pacova”, Medicinski fakultet Foča, Univerzitet Istočno Sarajevo, 2012.
342. Stockbridge N, Zhang H, Weir B. Effects of K<sup>+</sup> channel agonists cromakalim and pinacidil on rat basilar artery smooth muscle cells are mediated by Ca(++)-activated K<sup>+</sup> channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Nov 27;181(1):172-8.
343. Stojiljković R.M, Osnovni principi molekularne neurobiologije , Beograd Nova prosveta , 1998.
344. Stojnic N, Gojkovic-Bukarica L, Peric M, Grbovic L, Lesic A, Bumbasirevic M, Heinle H. Potassium channel opener pinacidil induces relaxation of the isolated human radial artery. *J Pharmacol Sci.* 2007 Jun;104(2):122-9.
345. Stuehr, Pou & Rosen (2001) Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 276, 14533-14536.
346. Stuenkel EL. Single potassium channels recorded from vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1989 Sep;257(3 Pt 2):H760-9.
347. Suzuki & Takimoto (2005) Differential expression of Kv4 pore-forming and KChIP auxiliary subunits in rat uterus during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E335-341.
348. Šerban M.: Početno o ćeliji; Pokretne i nepokretne ćelije , Savremena administracija, Beograd, 1995.
349. Tabb TN, Garfield RE. Molecular biology of uterine contractility. *Clin Obstet Gynecol.* 1992 Sep;35(3):494-504.
350. Tanaka, Koike & Toro (2004) MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res* 40, 125-153.
351. Tepavcevic Snezana, Isenovic Esmā R, Varagic Vladislav M, Milovanovic Slobodan R: Sodium nitroprusside regulates the relaxation of the longitudinal muscle in the gut PHARMAZIE, (2008) vol.63 br.2 str. 151-155.
352. Teramoto (2006) Physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in smooth muscle. *J Physiol* 572, 617-624.
353. Thomas, Callwood & Paranjothy (2000) National Sentinel Caesarean Section Audit: update. *Pract Midwife* 3, 20.
354. Thomas, Chen & Keaney (2002) Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 277, 6017-6024.

355. Thomas, Maiorino, Ursini & Girotti (1990) Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem* 265, 454-461.
356. Toro, Wallner, Meera & Tanaka (1998) Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci* 13, 112-117.
357. Tremblay E , Zini S , Been-Ari Y. Autoradiographic study of the cellular localization of (3H) glibenclamide binding sites in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 1991 Jun 10;127(1):21-4.
358. Triggler DJ. The physiological and pharmacological significance of cardiovascular T-type, voltage-gated calcium channels. *Am J Hypertens.* 1998 Apr;11(4 Pt 3):80S-87S.
359. Tritthart HA , Mahnert W, Fleischhacker A, Adelwohrer N. Potassium channels and modulating factors of channel functions in the human myometrium. *Z Kardiol.* 1991;80 Supp 7:29-33.
360. Tseng –Crank J, Foster CD, Krause JD, Mertz R, Godinot N, DiChiara TJ, Reinhart PH. Cloning expression and distribution of functionally distinct Ca(2+)- activated K<sup>+</sup> channel isoforms from human brain. *Neuron.* 1994 Dec;13(6):1315-30.
361. Van Geldern EM, Heilingers JPC, Saxena PR. Hemodynamic changes and acetylcholine-induced hypotensive responses after N-nitro-L-arginine-methyl-ester in rats and cats. *Br J Pharmacol* 1991;103:1899-1904.
362. Varagić, V., Milovanović, S.R., Ognjanović, J., Bošković, B. (1988) Effect of nicardipine of the isolated rat uterus and other smooth muscles of the rat. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 295: 1348-58
363. Varagić, V.M., Milovanović, S.R., Srkalović, G. (1984) The effect of calcium-channel-blocking agents on the various types of smooth muscle activation of the isolated rat uterus. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 270(1): 79-87
364. Vassilakopoulos, Deckman, Kebbewar, Rallis, Harfouche & Hussain (2003) Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L452-457.
365. Volk KA, Matsuda J J, Shibata EF. A voltage- dependent potassium current in rabbit coronary artery smooth muscle cells . *J Physiol* . 1991 Aug ;439:751-68.
366. Wallner M, Meera P, Ottolia M, Kaczorowski GJ, Latorre R, Garcia ML, Stefani E, Toro L. Characterization of the modulation by a  $\beta$ -subunit of human maxi KCa channel cloned from myometrium. *Recept Channels* 1995, 3: 185-199.
367. Wallner M, Meera P, Toro L. Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14922-7.
368. Wang T: The effects of the potassium channel opener minoxidil on renal electrolytes transport in the loop of henle. *Pharmacol Exp Ther.* 2003 Feb;304(2):833-40. Hoffmann P., Stanke-Labesque F.: Effects of L-arginine and sodium nitroprusside on the spontaneous contractility of human non-pregnant uterus; *Human Reproduction* Vol. 18, 2003.
369. Warner, Sheng & Batinic-Haberle (2004) Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207, 3221-3231.
370. Warren, Matharoo-Ball, Shaw & Khan (2005) Hydrogen peroxide and superoxide anion modulate pregnant human myometrial contractility. *Reproduction* 130, 539-544.
371. Wei A, Solaro C, Lingle C, Salkoff L. Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron.* 1994 Sep;13(3):671-81.
372. Weik R, Neumcke B. Effects of potassium channel openers on single potassium channels in mouse skeletal muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1990 Sep 342(3):258-63.
373. Weiner, Knowles, Nelson & Stegink (1994) Pregnancy increases guanosine 3',5'-monophosphate in the myometrium independent of nitric oxide synthesis. *Endocrinology* 135, 2473-2478.

374. Wellman GC, Cartin L, Eckman DM, Stevenson AS, Saundry CM, Lederer WJ, Nelson MT. Membrane depolarization, elevated Ca<sup>2+</sup> entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *Am J Physiol* 2001, 281: H2559-H2567.
375. Welsch (2006) *Sobotta Lehrbuch Histologie*. Munchen: Elsevier.
376. Weston AH, Bray KM, Duty S, McHarg AD, Newgeen DT, Southerton JS. In vitro studies on the mode of action of pinacidil. *Drugs*. 1988;36 Suppl 7:10-28.
377. Westwood F.R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicol. Pathol* 2008, 36 (3): 375-384.
378. Wible BA, Tagliatalata M, Ficker E, Brown AM. Gating of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels localized to a single negatively charged residue. *Nature* 1994, 15; 371 (6494): 246-9.
379. Wickenden AD, Kaprielian R, Parker TG, Jones OT, Backx PH. (1997) Effects of development and thyroid hormone on K<sup>+</sup> currents and K<sup>+</sup> channel gene expression in rat ventricle. *J Physiol* 504:271–286
380. Wilson GJ, Dos Remedios CG, Stephenson DG, Williams DA: Effects of sulphydryl modification on skinned rat skeletal muscle fibres using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *J Physiol*, 1991, 437, 409–430.
381. Wray & Noble (2008) Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones. *J Neuroendocrinol* 20, 451-461.
382. Wray (2007) Insights into the uterus. *Exp Physiol* 92, 621-631.
383. Wray (2009) Intracellular regions of potassium channels: Kv2.1 and heag. *Eur Biophys J* 38, 285-292.
384. Wray S, Jones K, Kupittayanant S, Li Y, Matthew A, Monir-Bishty E, Noble K, Pierce SJ, Quenby S, Shmygol AV. Calcium ignaling and uterine contractility .*J Soc Gynecol Investig*. 2003 Jul;10(5):252-64.
385. Wray, Burdyga & Noble (2005) Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium* 38, 397-407.
386. Wray, Jones, Kupittayanant, Li, Matthew, Monir-Bishty, Noble, Pierce, Quenby & Shmygol (2003) Calcium signaling and uterine contractility. *J Soc Gynecol Investig* 10, 252-264.
387. Wray, Kupittayanant, Shmygol, Smith & Burdyga (2001) The physiological basis of uterine contractility: a short review. *Exp Physiol* 86, 239-246.
388. Xia, Fakler, Rivard, Wayman, Johnson-Pais, Keen, Ishii, Hirschberg, Bond, Lutsenko, Maylie & Adelman (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395, 503-507.
389. Yan, Wei, Zhang, Cheng & Liu (2006) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin* 27, 821-826.
390. Yang J, Jan YN, Jan LY. Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel .*Neuron* .1995 Dec; 15 (6): 1441-7.
391. Yang Z, Zhang A, Altura BT, Altura BM. Hydrogen peroxide-induced endothelium dependent relaxation of rat aorta involvement of Ca<sup>2+</sup> and other cellular metabolites. *Gen Pharmacol*, 1999; 33: 325-336.
392. Yellen (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419, 35-42.
393. Yogi A, Callera GE, Hipólito UV, Silva CR, Touyz RM, Tirapelli CR: Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive, cyclooxygenase-dependent mechanisms. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 118, 657–668.
394. Young RC. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Apr;1101:72-84.
395. Zhang HL, Bolton TB. Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 1996 May;118(1):105-14
396. Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. *Nature* 414, 43-48, 2001.

397. Žikić V., Štajn A., Saičić Z., Spasić M., Milovanović S. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. PMF Kragujevac, 2000.
398. Zografos P, Li JH, Kau ST. Comparison of the in vitro effects of K<sup>+</sup> channel modulators on detrusor and portal vein strips from guinea pigs. *Pharmacology*. 1992;45(4):216-30.