

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Vladimir S. Đokić

**Efekat otvarača kalijumovih kanala pinacidila
na tonus izolovane humane umbilikalne vene
porodilja sa gestacijskim dijabetesom i
hipertenzijom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Vladimir S. Đokić

**Effect of potassium channel opener pinacidil
on the tone of human umbilical vein isolated
from women with gestational diabetes and
hypertension**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

PODACI O MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor:

Prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Doc. dr Svetlana Janković, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Radan Stojanović, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Gordana Dragović-Lukić, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Nela Puškaš, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
4. N.sar. Dr Radmila Novaković, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
5. Prof. dr Zdenko Tomić, Medicinski fakultet Univerzitet u Novom Sadu

Iskreno se zahvaljujem:

Mentoru, prof. dr Ljiljani Gojković-Bukarici, koja mi je omogućila da se bavim naukom, koja me uvela u svet kalijumovih kanala i koja je svojim znanjem, iskustvom i kreativnošću učestvovala u svim fazama izrade ove disertacije. Takođe, kao rukovodilac nacionalnog projekta, omogućila je finansiranje eksperimentalnog rada i bez nje ova disertacija ne bi ugledala svetlost dana.

Komentoru, doc. dr Svetlani Janković na pre svega prijateljskoj, iskrenoj i stručnoj podršci koja potiče još iz mojih studentskih dana. Na entuzijazmu, poverenju i osmehu uvek kada bih došao na kliniku po novi preparat za eksperimente.

Prof. dr Milici Labudović-Borović i doc. dr Jeleni Rakočević na tome što su me upoznale sa imunohistohemijom, na velikoj pomoći prilikom eksperimenata i na inspirativnim idejama i dovitljivim rešenjima prilikom publikovanja rezultata.

Jeleni Stanišić i Milanu Kostiću za izvođenje dela eksperimentalnog rada.

Članovima komisije na dragocenim savetima, podršci i strpljenju.

Mileni Zabunović, na tome što sam imao sreću da radim sa njom nekoliko godina, na prijateljstvu, podršci, bodrenju i na besprekornoj tehničkoj pomoći pri eksperimentalnom radu.

Ostalim članovima naše laboratorije Jovani, Nataši i Milošu za podršku i savete.

Članovima Instituta što su mi omogućili da se potpuno posvetim pisanju teze.

Mojoj sestri Vanji na pomoći oko engleskog jezika prilikom publikovanja rezultata, na velikoj podršci i na tome što je uvek bila tu za mene.

Mojim roditeljima i babi na безусловnoj ljubavi, razumevanju i podršci.

Mojim prijateljima Nikoli, Matiji, Stefanu, Goranu, Slaviši, Borisu, Zoranu, Milošu zato što postoje.

I posebno mojoj sestričini Idi za vedrinu koju je unela u moj život.

Vladimir Đokić

*Mojim roditeljima,
Zorici i Srboljubu,
posvećujem ovaj rad sa zahvalnošću i ljubavlju.*

Efekat otvarača kalijumovih kanala pinacidila na tonus izolovane humane umbilikalne vene porodilja sa gestacijskim dijabetesom i hipertenzijom

REZIME

Humana umbilikalna vena je specifičan krvni sud koji se nalazi pod uticajem brojnih metaboličkih, vaskularnih i hemodinamskih promena tokom čitavog fetalnog života. Pinacidil je otvarač kalijumovih kanala (K kanala) čije je mesto vezivanja lokalizovano na SURx subjedinici K_{ATP} kanala. Osim toga, postoje i mnogi dokazi da pinacidil, primenjen u visokim dozama ($\geq 100 \mu\text{M}$), pored K_{ATP} kanala deluje i na druge podtipove K kanala, uključujući K_v i BK_{Ca} kanale, kao i da ima dejstva nezavisna od K kanala.

U brojnim istraživanjima pokazano je da dijabetes melitus i hipertenzija uzrokuju promene u ekspresiji i funkciji K kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama različitih krvnih sudova i kod različitih vrsta. Sa druge strane, opisano je da gestacijski dijabetes melitus (GDM) i trudnoćom izazvana hipertenzija (PIH) uzrokuju različite morfološke i ultrastrukturalne promene na humanim umbilikalnim venama.

Ciljevi ovog istraživanja su bili: 1) da se ispita da li se ekspresija subjedinica nekoliko podtipova K kanala (K_{ATP} , BK_{Ca} i K_v) na humanim umbilikalnim venama zdravih porodilja razlikuje u odnosu na porodilje sa GDM i PIH; 2) da se ispita postoje li razlike u efikasnosti i potentnosti pinacidila u izazivanju vazodilatacije prekontrahovanih venskih segmenata zdravih porodilja i porodilja sa GDM i PIH; 3) da se definišu podtipovi K kanala uključeni u vazodilatatorne efekte pinacidila u svim grupama; 4) da se utvrdi da li pinacidil ima dejstva nezavisna od aktivacije K kanala.

Ukupno 72 porodilje su bile uključene u studiju. Njih 40 je bilo zdravo, 16 je imalo GDM i 16 PIH. Nakon preparacije i izolacije humanih umbilikalnih vena iz pupčanika, venski segmenti su ili bili čuvani u 10% formaldehidu za imunohistohemijsko bojenje, zamrzavani na -70°C za Western blot analizu ili montirani u kupatilo za izolovane organe u cilju sprovođenja farmakoloških eksperimenata. Humana umbilikalna vena je kontrahovana serotoninom. Rastuće koncentracije pinacidila ($0.1 - 1000 \mu\text{M}$) dodavane su u kupatilo na kumulativan način. Za proveru umešanosti različitih tipova K kanala u vazorelaksaciji izazvanoj pinacidilom sledeći antagonisti dodavani su u kupatilo 20 minuta pre serotonina: glibenkamid (GLB) – specifični blokator K_{ATP} kanala; iberiotoksin – selektivni antagonista BK_{Ca} kanala; 4-aminopiridin (4-AP) – neselektivni antagonista K_v kanala; margatoksin – specifični antagonista $K_{v1.2}$ i $K_{v1.3}$ kanala i friksotoksin – specifični antagonista $K_{v4.2}$ i $K_{v4.3}$ kanala. Za ispitivanje mehanizama dejstva pinacidila nezavisnih od K kanala druga kontrakcija prouzrokovana je rastvorom visoke koncentracije K^+ ($100 \text{ mM } K^+$).

GDM je značajno antagonizovao relaksaciju humanih umbilikalnih vena izazvanu pinacidilom, dok je u hipertenzivnim venama vazodilatatorni odgovor ostao nepromenjen. Ekspresija Kir6.1 subjedinice, koja formira poru K_{ATP} kanala, bila je statistički značajno smanjena u oba patološka stanja u poređenju sa zdravim trudnoćama, ukazujući na redukovanu ekspresiju ovih kanala tokom GDM i PIH. Ekspresija SUR2B subjedinice K_{ATP} kanala ostala je nepromenjena. Smanjeni funkcionalni odgovor venskih segmenata na pinacidil tokom GDM u skladu je sa smanjenom ekspresijom K_{ATP} kanala, a očuvanje ovog odgovora u hipertenziji može se objasniti dodatnim K_{ATP} -nezavisnim dejstvima pinacidila. Tako je iberiotoksin značajno antagonizovao vazodilatatorni odgovor pinacidila u PIH, ali ne i na venskim segmentima tokom normalne trudnoće i dijabetesa. Ovakav rezultat sugerše da tokom hipertenzije dolazi do ushodne regulacije BK_{Ca} kanala. Zbog toga što ekspresija $BK-\alpha$ subjedinica, koje formiraju poru BK_{Ca} kanala, ostaje ista u svim eksperimentalnim grupama, pretpostavka je da je ova ushodna regulacija funkcionalne prirode i najverovatnije je posledica promenjene interakcije sa regulatornim subjedinicama.

4-AP i margatoksin antagonizovali su relaksaciju humanih umbilikalnih vena izazvanu pinacidilom u normalnoj trudnoći, što je potvrdilo učešće K_v kanala u njegovom mehanizmu dejstva. Tokom GDM i PIH do antagonizma nije došlo, što ukazuje na oštećenje funkcije K_v kanala u ovim stanjima. Molekularna analiza K proteina pokazala je očuvanu ekspresiju $K_v1.2$ subjedinice u oba patološka stanja, a smanjenu ekspresiju $K_v1.3$ subjedinice K_v kanala u PIH grupi. Ovo je u skladu sa gubitkom antagonizma margatoksina u hipertenziji. Gubitak antagonizma margatoksina tokom dijabetesa verovatno je posledica smanjenja aktivnosti K kanala zbog hiperglikemije i povećanog oksidativnog stresa.

Primena rastvora visoke koncentracije K^+ potvrdila je prisustvo K-nezavisnih mehanizama dejstva pinacidila. Statistički značajno smanjenje maksimalnih odgovora na pinacidil na venskim segmentima u oba patološka stanja ukazuje da su i K-nezavisni mehanizmi dejstva pinacidila oštećeni.

Rezultati ovog istraživanja doprineli su razumevanju patogeneze PIH i vaskularnih komplikacija tokom GDM, a dalja istraživanja na ovom polju mogu doprineti potpunom rasvetljenju patogeneze oba patološka stanja i potencijalno obezbediti nove lekove za tretman dijabetesa i hipertenzije.

Ključne reči: humana umbilikalna vena, kalijumovi kanali, pinacidil, gestacijski dijabetes, hipertenzija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Medicinska farmakologija

Effect of potassium channel opener pinacidil on the tone of human umbilical vein isolated from women with gestational diabetes and hypertension

ABSTRACT

Human umbilical vein is an uncommon blood vessel that is influenced by numerous metabolic, vascular and hemodynamic factors during entire fetal life. Pinacidil is potassium channel (K channel) opener whose binding site is well characterized and it is located on the SURx subunit of K_{ATP} channel. There are studies suggesting that pinacidil, especially in high doses ($\geq 100 \mu\text{M}$), in addition to K_{ATP} channels opens other subtypes of potassium channels, including BK_{Ca} and K_v channels, and that pinacidil also has K channel-independent mechanisms of action.

Many studies have revealed alterations in the expression and function of K channels during diabetes mellitus and hypertension in vascular smooth muscle cells in other vascular beds and in different species. On the other hand, it has been described that gestational diabetes mellitus (GDM) and pregnancy-induced hypertension (PIH) cause various morphological and ultrastructural abnormalities in human umbilical veins.

The aims of this research were: 1) to analyze is the expression of several K channels (K_{ATP} , BK_{Ca} and K_v) subunits in human umbilical veins from normal pregnancy different in comparison to GDM and PIH groups; 2) to test if there are differences in the potency and efficiency of pinacidil in inducing vasorelaxation of precontracted vein segments from normal pregnancy and GDM and PIH; 3) to define types of K channels involved in pinacidil-induced vasodilation on isolated human umbilical veins in all groups; 4) to determine if pinacidil possess K channel-independent mechanisms of actions.

A total of 72 patients were engaged in the study. Out of them 40 were healthy, 16 had GDM and 16 PIH. After the isolation and preparation, human umbilical vein segments were either immersed in 10% formalin for immunohistochemical staining, frozen at -70°C for Western blot analysis or mounted in the organ bath for pharmacological experiments. Human umbilical veins were precontracted with serotonin. The increasing concentrations of pinacidil (0.1 – 1000 μM) were added to the bath cumulatively. To test the roles of several types of K channels in pinacidil-induced vasorelaxation, following antagonists were added to the bath 20 minutes before serotonin: glibenclamide (GLB) – a specific blocker of K_{ATP} channels; iberiotoxin – a selective blocker of BK_{Ca} channels; 4-aminopyridine (4-AP) – a nonselective blocker of K_v channels; margatoxin – a selective blocker of $K_v1.2$ i $K_v1.3$ channels and phrixotoxin – a selective blocker of $K_v4.2$ i $K_v4.3$ channels. In order to examine K-independent actions of pinacidil the second contractions were produced by K^+ -rich Krebs-Ringer solution (100 mM K^+).

GDM significantly antagonized pinacidil-induced relaxation of human umbilical veins compared to normal pregnancy, while in PIH segments vasodilator response to pinacidil remained unchanged. Expression of pore-forming Kir6.1 subunit of K_{ATP} channel was significantly decreased in both pathological conditions when compared to normal pregnancy, suggesting reduced expression of these channels during GDM and PIH. The expression of SUR2B was not significantly different between the groups. The reduced response to pinacidil in GDM is concordant with the decreased expression of K_{ATP} channels, while its preservation during PIH can be explained using K_{ATP} channel-independent mechanisms of pinacidil action. Iberitoxin significantly reduced vasodilator response to pinacidil in PIH, but not in normal pregnancy and GDM. These results suggest that hypertension induces upregulation of the BK_{Ca} channels. In the present study, an unaltered expression of $BK-\alpha$ subunits, that form a pore of these channels, indicates that noted upregulation in PIH is not caused by an increase in the number of BK_{Ca} channels but it is rather functional. It most likely occurs due to changes in interaction with auxiliary subunits.

4-AP and margatoxin antagonized vasorelaxation induced by pinacidil in normal pregnancy and thus confirmed the involvement of K_v channels in its effect. The absence of this antagonism in both pathological conditions implies that in the course of GDM and PIH the function of K_v channels in vascular smooth muscle cells was damaged. Molecular analysis of K_v proteins has shown preserved expression of $K_v1.2$ subunit in both pathological conditions, while the expression of $K_v1.3$ subunit of K_v channels was reduced in PIH. This is in agreement with loss of the margatoxin antagonism during PIH. The absence of margatoxin antagonism during GDM is probably consequence of reduced K_v channel activity due to hyperglycemia and elevated oxidative stress.

The use of K^+ -rich solution confirmed the existence of K-independent actions of pinacidil. Statistically significant suppression of the maximal responses to pinacidil on vein segments from both pathological conditions indicates that the K-independent mechanisms of pinacidil action are also affected during GDM and PIH.

Results of this research have contributed to better understanding of the pathogenesis of PIH and vascular complications during GDM. Further investigations in this field may completely clarified pathogenesis of both pathological conditions and provide new tools in the therapy of diabetes mellitus and hypertension.

Keywords: human umbilical vein, potassium channels, pinacidil, gestational diabetes, hypertension

Scientific field: Medicine

Major in: Medical Pharmacology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. HUMANA UMBILIKALNA VENA	1
1.1.1. Pupčana vrpca	1
1.1.2. Humana umbilikalna vena – struktura i funkcija	3
1.2. GESTACIJSKI DIJABETES MELITUS	5
1.3. TRUDNOĆOM IZAZVANA HIPERTENZIJA	7
1.4. KALIJUMVI KANALI (K KANALI)	9
1.4.1. Struktura i podela K kanala	11
1.4.2. K kanali i regulacija vaskularnog tonusa	13
1.4.3. Funkcija endotela i endotelni K kanali	14
1.5. PODTIPOVI K KANALA U VASKULARNOM GLATKOM MIŠIĆU	17
1.5.1. Kir kanali	17
1.5.2. K_{ATP} kanali i otvarači K kanala	20
1.5.2.1. Otvarači K kanala	23
1.5.3. K_v kanali	24
1.5.4. K_{Ca} kanali	29
1.5.4.1. BK_{Ca} kanali	31
1.5.4.2. SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali	35
1.5.5. K_{2P} kanali	37
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	39
3. MATERIJAL I METODE	40
3.1. Etičnost	40
3.2. Klinički uzorci, rukovanje i upravljanje tkivom	41
3.3. Molekularna analiza subjedinica K kanala	41
3.3.1. Western blot analiza	41
3.3.2. Imunohistohemija	42
3.4. Ispitivanje vazorelaksantnog dejstva pinacidila	43
3.5. Supstance i rastvori	45
3.6. Statistika	46

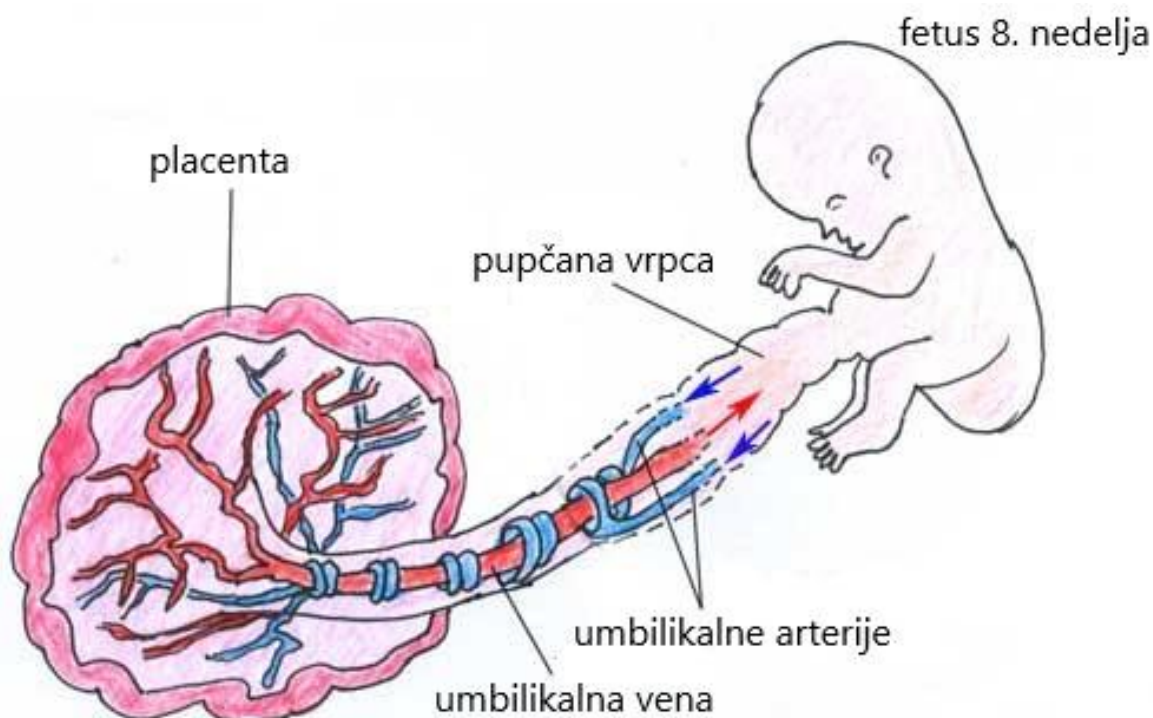
4. REZULTATI	47
4.1. Karakteristike pacijentkinja	47
4.2. Molekularna analiza subjedinica K kanala	48
4.2.1. Western blot analiza	48
4.2.2. Imunohistohemijsko bojenje	50
4.3. Efekti pinacidila na venskim segmentima prekontrahovanim serotoninom	55
4.4. Efekti pinacidila na humane umbilikalne vene u prisustvu 100 mM K ⁺	60
5. DISKUSIJA	62
6. ZAKLJUČCI	71
7. LITERATURA	73

1. UVOD

1.1. HUMANA UMBILIKALNA VENA

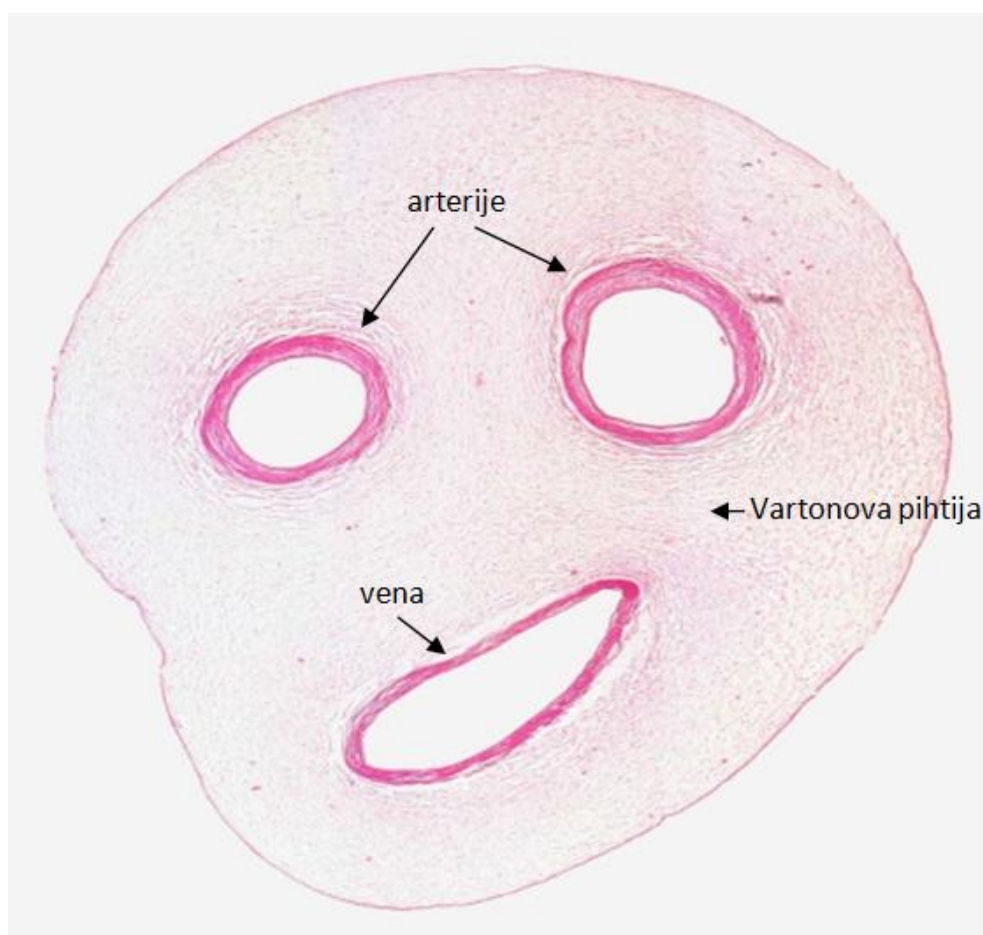
1.1.1. Pupčana vrpca

Aristotel (384-322 p.n.e.) je prvi definisao pupčanik kao vezu između majke i nerođenog deteta. Pupčanik predstavlja vrpca koja obezbeđuje put za neometan protok krvi od placente ka fetusu i obratno (Gill i sar., 1984). Rudimentarna pupčana vrpca se razvija u periodu od 4. do 8. nedelje gestacije, a krvotok u njoj se uspostavlja u 5. nedelji gestacije (Slika 1). Desna umbilikalna vena obliteriše do kraja 6. nedelje, a rezultat toga je postojanje samo jedne – leve humane umbilikalne vene. U vreme porođaja pupčana vrpca ima prosečnu dužinu od oko 50-60 cm. Normalna dužina pupčanika varira u rasponu od 30 cm do 100 cm. Preterano dugačke vrpce mogu biti udružene sa prolapsom, uvrtnjem pupčanika oko vrata fetusa, zapetljavanjem, distresom i smrću fetusa. Sa druge strane, veoma kratki pupčanici povezani su sa odloženim spuštanjem fetusa, preranim odvajanjem placente, restrikcijom rasta fetusa, kongenitalnim malformacijama, fetalnim distresom i smrću (Spurway i sar., 2015).



Slika 1. Pupčana vrpca i fetoplacentalna cirkulacija (izvor slike: <https://moodle.digital-campus.org/>).

Pupčana vrpca povezuje plod i horionsku ploču. Ona se pruža od fetalnog pupka do mesta gde se pripaja za placentu. Izgrađena je od specifične vrste vezivnog tkiva – sluznog vezivnog tkiva, u kome su smeštene dve umbilikalne arterije i jedna umbilikalna vena (Slika 2). Sluzno vezivno tkivo, poznato i kao Vartonova (*Wharton*) pihitija, je želatinozna masa koja obezbeđuje pupčaniku izuzetnu elastičnost i omogućava njegovo uvijanje tokom pokretanja ploda, bez uticaja na protok krvi kroz njegove krvne sudove (Blanco i sar., 2011). Dve humane umbilikalne arterije kroz koje se krv vraća u placentu namotavaju se oko vene u vidu spirale. Navoji spirale su u 90% slučajeva dekstralni – u smeru kazaljke na satu. Normalan pupčanik sadrži jedan navoj na svakih 5 cm dužine vrpce. Stepennavijanja umbilikalnih arterija može da utiče na placentalni krvni protok. Hiponamotane vrpce povezane su sa smanjenim protokom krvi kroz venu i neželjenim posledicama po trudnoću kao što su carski rez, povećanje pH i poremećaji srčanog ritma fetusa. Sa druge strane, hipernamotane pupčane vrpce udružene su sa prevremenim porođajem i intrauterinom restrikcijom rasta fetusa (Di Naro i sar., 2001; Moshiri i sar., 2014).



Slika 2. Histološka struktura pupčanika (izvor slike: embryology.med.unsw.edu.au).

Fetoplacentalna cirkulacija predstavlja sistem niskog pritiska i niskog otpora. Karakteristika fetoplacentalnih krvnih sudova je da nemaju inervaciju, kao ni *vasa vasorum* i limfatike, čime je naglašen uticaj mehaničkih faktora, faktora lokalne sredine i vazoaktivnih supstanci dopremljenih sistemskom cirkulacijom u regulaciji njihovog tonusa (Wareing, 2014). Fetoplacentalni krvni sudovi pokazali su se kao odličan model za proučavanje fizioloških mehanizama koji leže u osnovi vaskularnog remodelovanja. Osim njihovog značaja u istraživanju fizioloških adaptivnih procesa, njihova primena u proučavanju patoloških stanja mogla bi da omogući da se identifikuju rani markeri oboljenja i/ili da se razviju efikasni tretmani za terapiju različitih stanja koja ugrožavaju zdravlje i fetusa i majke (Haas, 2014).

1.1.2. Humana umbilikalna vena – struktura i funkcija

Humana umbilikalna vena specifičan je i redak krvni sud koji obezbeđuje dopremanje oksigenisane krvi bogate hranljivim materijama od placente ka fetusu. Prečnik humane umbilikalne vene iznosi oko 4.1 mm u 20. nedelji i povećava se do 8.3 mm u 38. nedelji gestacije. Idući od placentalnog ka fetalnom kraju vene njen dijametar se smanjuje za oko 1 mm. Površina zida humane umbilikalne vene je 30% veća od zbirne površine humanih umbilikalnih arterija (Spurway i sar., 2015). Saturacija umbilikalne venske krvi kiseonikom iznosi 80-88%, pO_2 44-46 mmHg, pCO_2 33-34 mmHg i pH 7.425-7.430 u sredini gestacije. Kako se bliži porođaj, saturacija kiseonikom iznosi 67-75%, pO_2 30-34 mmHg, pCO_2 36-37 mmHg i pH 7.38-7.41. Iako se saturacija krvi kiseonikom u humanoj umbilikalnoj veni smanjuje sa napredovanjem gestacije, ukupna količina kiseonika se održava, zbog povećanja koncentracije hemoglobina (Acharya i sar., 2016).

Pritisak u umbilikalnoj veni se povećava tokom gestacije i iznosi 4.5 mmHg u 18. nedelji, a oko 6.5 mmHg u vreme porođaja. Pokretanje krvi kroz venu omogućavaju gradijenti pritiska uzrokovani fetalnim srčanim kontrakcijama, fetalnim disanjem i longitudinalnim distorzijama umbilikalnih arterija, kao i kontrakcije medijalnog glatko-mišićnog sloja same vene (Ville i sar., 1994). Dodatno, humana umbilikalna vena pokazuje i fenomen vazomocije – spontanog ritmičnog oscilovanja zida krvnog suda, što takođe daje svoj doprinos održavanju krvnog protoka (Garcia Huidobro i sar., 2007). U zidu vene, za razliku od umbilikalnih arterija, prisutna je unutrašnja elastična lamina. Tunika medija humane umbilikalne vene se sastoji od više slojeva vaskularnih glatkih mišićnih ćelija orijentisanih u različitim pravcima (cirkularni, longitudinalni i kosi). Ovakav raspored glatkih mišićnih ćelija, zajedno sa gumolikim svojstvima Vartonove pihtije, doprinosi zaštiti venskog protoka od stresa uzrokovanim pokretima fetusa (Koech i sar., 2008). Na kraju, važno je naglasiti da humana umbilikalna vena nije samo pasivni sprovodni krvni sud, već je

sposobna i da prilagođava svoj vaskularni tonus pod dejstvom različitih faktora lokalne sredine, kao što je npr. slučaj u vazodilataciji izazvanoj hipoksijom (Mildenberger i sar., 1999).

1.2. GESTACIJSKI DIJABETES MELITUS

Prema Nacionalnom vodiču dobre kliničke prakse Ministarstva zdravlja Republike Srbije gestacijski dijabetes melitus (GDM) se definiše kao bilo koji stepen poremećaja tolerancije glukoze koji je prvi put otkriven u trudnoći. Prevalencija GDM značajno varira od 1 do 14% u zavisnosti od ispitivane populacije. Faktori rizika za nastanak GDM su starija životna dob, pozitivna porodična anamneza na dijabetes, gojaznost i ishrana bogata zasićenim masnim kiselinama. GDM je poznati faktor rizika brojnih neželjenih ishoda trudnoće uključujući preeklampsiju, carski rez, fetalnu makrozomiju, povećan broj porođajnih trauma i neonatalnih metaboličkih abnormalnosti, kao što su neonatalna hipoglikemija, hipokalcemija i hipomagnezijemija (Lee i sar., 2018). Žene sa istorijom GDM su u povećanom riziku za razvoj dijabetes melitusa tip 2 (Rayanagoudar i sar., 2016). Dodatno, GDM je povezan sa neželjenim posledicama u potomstvu. Novorođenčad majki sa GDM su sklona razvoju gojaznosti, intoleranciji glukoze, dijabetes melitusa tip 2 i hipertenziji kasnije u životu. Ovo ukazuje da poremećaji u fetalnom okruženju, kao što su ograničenost kiseonika, preterano dopremanje nutritijenata i izmenjena hormonska ravnoteža, indukuju dugotrajne alteracije u strukturi i funkciji ključnih organa uključenih u održavanje metaboličke homeostaze, rezultujući nastankom bolesti u odraslom dobu (Ma i sar., 2012).

Tokom trudnoće u telu majke dolazi do niza fizioloških promena kako bi se zadovoljili povećani energetske zahtevi rastućeg fetusa. Ovde spadaju adaptacije kardiovaskularnog sistema, bubrega, hematološke promene, adaptacije respiratornog sistema i metabolizma. Jedna od najvažnijih metaboličkih adaptacija jeste promena insulinske senzitivnosti. Tokom gestacije, insulinska senzitivnost se menja zavisno od zahteva trudnoće. U ranoj gestaciji, insulinska senzitivnost se povećava u cilju skladištenja glukoze u masno tkivo radi obezbeđivanja zaliha za povećane energetske potrebe u kasnijoj trudnoći (Di Cianni i sar., 2003). Međutim, kako trudnoća napreduje, talas lokalnih i placentalnih hormona, uključujući estrogen, progesteron, leptin, kortizol, placentalni laktogen i placentalni faktor rasta uzrokuje stanje insulinske rezistencije. Posledično, nivo glukoze u krvi raste, povećava se koncentracijski gradijent glukoze između majke i fetusa i olakšava se njen transport kroz placentu. Blago stanje insulinske rezistencije takođe izaziva povećanu produkciju endogene glukoze i otapanje masnih rezervi, što rezultuje daljim porastom glukoze u krvi, kao i porastom koncentracije masnih kiselina (Mirghani Dirar i Doupis, 2017). Istraživanja na životinjama sugerišu da, u cilju održavanja homeostaze glukoze, dolazi do kompenzatorne hipertrofije i hiperplazije β -ćelija pankreasa, kao i povećanja glukozom-stimulisane sekrecije insulina. Značaj placentalnih hormona u ovim procesima oslikava se činjenicom da se insulinska senzitivnost majki vraća na normalne nivoe već nekoliko dana nakon porođaja. Ipak, opisane metaboličke adaptacije ne dešavaju se adekvatno u svim trudnoćama, što kao rezultat ima

GDM (Plows i sar., 2018). Tačan mehanizam nastanka GDM još uvek je nedovoljno razjašnjen i smatra se izuzetno kompleksnim. Pretpostavlja se da su u patogenezu GDM najverovatnije umešani genetski i epigenetski faktori, kao i faktori sredine. U većini slučajeva se smatra da β -ćelije pankreasa nisu u mogućnosti da zadovolje povećane potrebe za insulinom i povećane metaboličke zahteve trudnoće. Ovo rezultuje insulinskom rezistencijom, hiperglikemijom i povećanim dopremanjem glukoze do fetusa. Osim navedenog, postoje dokazi da poremećaj diferencijacije adipocita i odlaganja glukoze u masno tkivo, blaga hronična inflamacija masnog tkiva, glukoneogeneza, oksidativni stres i placentalni faktori učestvuju u razvoju GDM (Berberoglu, 2019).

Prema dijagnostičkim kriterijumima IADSPG (*International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups*) i Nacionalnom vodiču dobre kliničke prakse za dijabetes Republike Srbije, sve žene, bez ranije postavljene dijagnoze dijabetesa, potrebno je testirati između 24. i 28. nedelje gestacije. Primenjuje se test opterećenja glukozom (OGTT) sa 75 g glukoze, a merenje se sprovodi nakon 1h i 2h. Vrednosti glikemije našte ≥ 5.1 mmol/l, glikemije nakon 1h ≥ 10 mmol/l i glikemije nakon 2h ≥ 8.5 mmol/l, dovoljni su za postavljanje dijagnoze. Preporuka je da se trudnice sa visokim rizikom od nastanka GDM testiraju pre 24. nedelje (Di Biase i sar., 2018).

Ciljne vrednosti glikemije u terapiji GDM prema preporukama Američke asocijacije za dijabetes (*American Diabetes Association* (ADA), 2019) su: glikemija našte ≤ 5.3 mmol/l; 1h postprandijalno ≤ 7.8 mmol/l; 2h postprandijalno ≤ 6.7 mmol/l. Terapija inicijalno obuhvata promenu životnih navika, uvođenje fizičke aktivnosti i higijensko-dijetetskog režima. Istraživanja pokazuju da, u zavisnosti od ispitivane populacije, 70% do 85% žena uspešno kontroliše GDM na ovaj način. Kod ostalih neophodna je primena farmakoterapije. Insulin je lek izbora u terapiji GDM s obzirom na to da ne prolazi kroz placentu. Oralni antidijabetici, uključujući glibenklamid i metformin, pokazali su se u kliničkim studijama kao prihvatljive alternative za insulin u terapiji GDM. Međutim, dodatne kliničke studije su neophodne, a naročito podaci o dugoročnoj bezbednosti ovih lekova po fetus (Ryu i sar., 2014; Mladenović i sar., 2016).

1.3. TRUDNOĆOM IZAZVANA HIPERTENZIJA

Normalna trudnoća povezana je sa povećanjem srčane frekvence, povećanjem volumena plazme i povećanjem udarnog volumena srca, kao i sa smanjenjem vaskularne rezistencije i kasnijim gestacijskim smanjenjem krvnog pritiska. Ove hemodinamske promene osiguravaju kritično dopremanje krvi i nutritivenata do rastućeg fetusa (Tanbe i Khalil, 2010). U 5-10% trudnoća kod žena se razvija hipertenzija. Hipertenzija u trudnoći je češća kod prvorođanke, vrlo mladih trudnica, trudnica starijih od 40 godina, žena sa genetskom predispozicijom, u slučaju multipariteta, gojaznosti i dijabetesa. Hipertenzivni poremećaji u trudnoći povezani su sa brojnim neželjenim ishodima i povećanim maternalnim i fetalnim mortalitetom. Neželjeni ishodi trudnoće uključuju intrauterini zastoj rasta fetusa, prevremeni porođaj, malu telesnu masu na rođenju i nastanak hroničnih bolesti i kod majke i kod deteta kasnije u životu (Olaya-C i sar., 2016).

Krvni pritisak u trudnoći se smatra povišenim ako je sistolni krvni pritisak ≥ 140 mmHg i/ili dijastolni krvni pritisak ≥ 90 mmHg, nakon najmanje dva merenja, uz minimum 15 minuta razmaka, na istoj ruci (Magee i sar., 2014). Hipertenzija u trudnoći se, prema Američkom udruženju ginekologa i akušera, deli na blagu (140-159/90 ili do 109 mmHg) i tešku ($\geq 160/110$ mmHg). Dodatno, ona se svrstava u jednu od sledeće 4 glavne grupe: hroničnu hipertenziju koja prethodi trudnoći, gestacijsku hipertenziju, preeklampsiju/eklampsiju i hroničnu hipertenziju sa superponiranom preeklampsijom (Tanbe i Khalil, 2010).

Razvoj hipertenzije bez proteinurije posle 20. nedelje gestacije, kod prethodno normotenzivnih trudnica, definiše se kao gestacijska hipertenzija. Ona se označava i kao prolazna hipertenzija jer se krvni pritisak najčešće vraća u normalu u roku od 12 nedelja nakon porođaja. Gestacijska hipertenzija se u otprilike 15-25% slučajeva komplikuje preeklampsijom, koja je konvencionalno definisana kao razvoj gestacijske hipertenzije sa proteinurijom (> 0.3 g/l u 24 h urinu) kod trudnica nakon 20. nedelje gestacije. Pojava generalizovanih konvulzija, koje se ne mogu pripisati drugim uzrocima, kod žena sa preeklampsijom predstavlja eklampsiju. Sva tri navedena poremećaja zajedno se označavaju terminom „Trudnoćom izazvana hipertenzija“ (PIH) (engl. *pregnancy-induced hypertension*) (Rouse i sar., 2016). Samo porodilje sa ovim hipertenzivnim poremećajima bile su uključene u ovo istraživanje.

Kao i u slučaju gestacijskog dijabetesa tačan mehanizam nastanka PIH nedovoljno je razjašnjen i najverovatnije je posledica kumulacije brojnih faktora maternalnog, fetalnog i placentalnog porekla. Preovlađuje teorija po kojoj genetska predispozicija, imunološki, dijetetski i faktori sredine ometaju normalan razvoj placente i uzrokuju njenu abnormalnu implantaciju sa defektnom trofoblastnom invazijom spiralnih arterija uterusa (Georgei Granger, 2010; Gao i sar.,

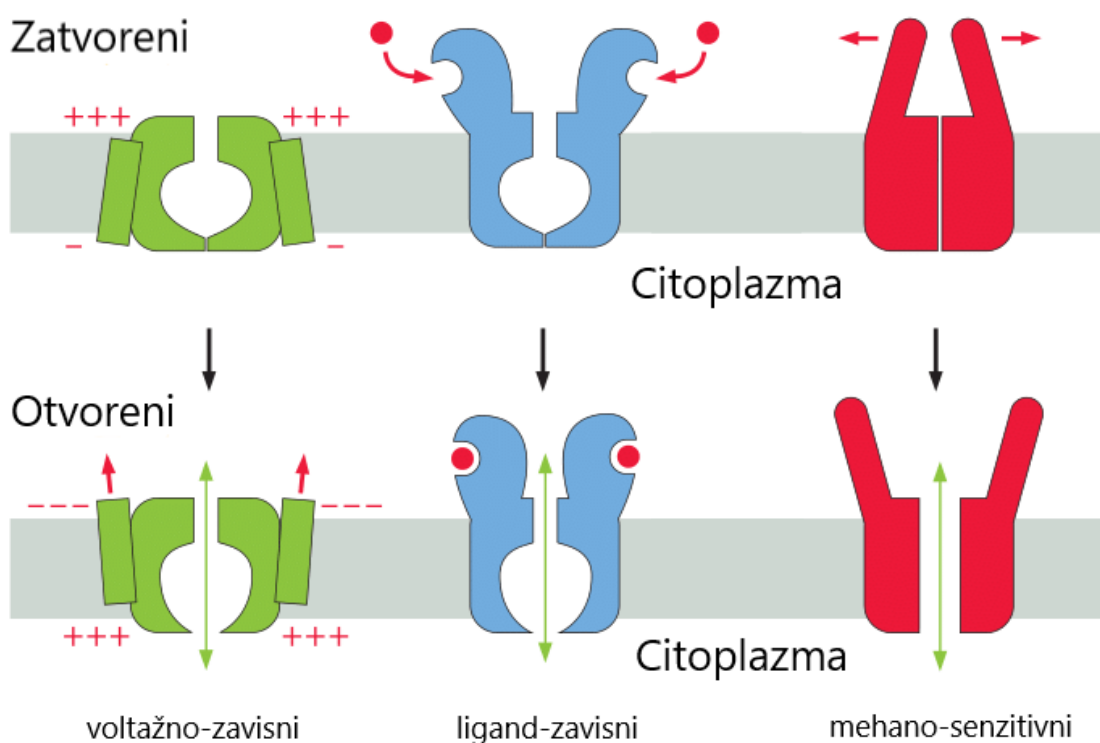
2016). Dolazi do neadekvatne placentalne perfuzije i njene ishemije/hipoksije, što uzrokuje endotelnu disfunkciju i oslobađanje niza biološki aktivnih faktora kao što su faktori rasta, inflamatorni citokini, slobodni radikali, hipoksijski-inducibilni faktori i drugi. Ovi faktori dovode do smanjenja vazodilatatornih medijatora. Stvara se stanje gde dominiraju vazokonstriktorni medijatori, što uzrokuje nastanak vazokonstrikcije, povećanje sistemskog vaskularnog otpora i hipertenziju (Brennan i sar., 2014). Ostali činioci koji bi mogli imati ulogu u patogenezi hipertenzije u trudnoći uključuju povećan maternalni inflamatorni odgovor, alteracije maternalnog lipidnog metabolizma i abnormalnosti pupčane vrpce (Olaya-C i sar., 2016).

Odluka o terapiji hipertenzije u trudnoći zavisi od stanja pacijentkinje i zahteva individualni pristup. Antihipertenzivnu terapiju je potrebno, kada god je to moguće, započeti promenom životnih navika (fizička aktivnost i dijeta). Vežbanje je povezano sa redukcijom gestacijske hipertenzije i manjim rizikom za pojavu preeklampsije/eklampsije (Yoder i sar., 2009). Prema ESC/ESH (*European Society of Cardiology/European Society of Hypertension*) preporukama iz 2018. godine, terapiju hipertenzije treba započeti kada su vrednosti krvnog pritiska $\geq 140/90$ mmHg. Kao lekovi prvog izbora za terapiju PIH preporučuju se metildopa, labetalol i antagonisti kalcijuma (Veličković Radovanović i sar., 2011).

1.4. KALIJUMOVI KANALI

Jonski kanali su proteinski molekuli koji formiraju pore u ćelijskoj membrani i membranama ćelijskih organela i dozvoljavaju pasivan protok jona u pravcu njihovog elektrohemijskog gradijenta. Zbog toga što protok jona kroz membrane za rezultat ima nastanak električnih struja, jonski kanali imaju ključne uloge u generisanju membranskog potencijala i u mnogim ćelijskim aktivnostima kao što su signalna transdukcija, oslobađanje neurotransmitera, mišićna kontrakcija, sekrecija hormona, regulacija volumena, rast, motilitet i apoptoza (Kim, 2014). Otvaranje i zatvaranje jonskih kanala je kontrolisano brojnim faktorima, kao što su membranski potencijal, ligandi (hormoni ili neurotransmiteri), sekundarni glasnici (Ca^{2+} , ciklični nukleotidi), svetlost, temperatura i mehaničke promene. Prema vrsti stimulusa koji ih aktivira jonski kanali se klasifikuju na:

- *voltažno-zavisne* – aktivira ih promena transmembranskog potencijala,
- *ligand-zavisne* – aktivira ih vezivanje ekstracelularnih i intracelularnih liganada ili sekundarnih glasnika kao što su npr. neurotransmiteri, Ca^{2+} ili MgADP,
- *mehano-senzitivne* – aktivira ih mehanički nadražaj, i
- *ostale* – aktivira ih svetlost, temperatura, promena pH ravnoteže, itd. (Slika 3).



Slika 3. Podela jonskih kanala prema vrsti stimulusa koji ih aktivira (izvor slike: <http://book.bionumbers.org>).

Osim prema načinu aktivacije jonski kanali se klasifikuju i prema vrsti jona koje sprovode, prema strukturi, kao i prema obrascu ekspresije (Gojković-Bukarica, 2009; Shad i sar., 2018).

Jonski kanali su sastavljeni ili od pojedinačnog proteina (npr. CFTR – transmembranski regulatorni protein za cističnu fibrozu, hloridni kanal), ili, mnogo češće, od kompleksa nekoliko proteinskih subjedinica od kojih je svaka kodirana različitim genom. Do sada je identifikovano više od 400 gena za jonske kanale (Hille, 2001). Pokretni delovi jonskih kanala koji kontrolišu prolazak jona nazivaju se kapije ili vratnice (engl. *gate*), a proces prelaska jonskih kanala iz otvorenog u zatvoreno stanje, i obrnuto, poznat je kao *gating*. (Ascroft, 2000). Kao odgovor na stimulus vratnice menjaju konformaciju, što dovodi do strukturnih promena drugih delova kanala i rezultira njihovim otvaranjem. Po prestanku delovanja stimulusa, dešava se nova promena konformacije kanala, vratnice se zatvaraju i kanal neko vreme postaje neosetljiv na dalju stimulaciju. Ovaj proces se naziva *desenzitizacija* kada su u pitanju ligand-zavisni kanali, odnosno *inaktivacija* u slučaju voltažno-zavisnih kanala (Gojković-Bukarica, 2009).

U ćelijskim membranama većine ćelija mirovni membranski potencijal (V_m) je najvećim delom određen koncentracijom K^+ jona, za koje je u bazalnim uslovima membrana najpropustljivija. Razlog za ovu propustljivost je postojanje nekoliko posebnih podtipova membranskih kalijumovih kanala (K kanala) koji su aktivni u stanju mirovanja (engl. „*K⁺ leak channels*“). Sve dok je hemijska sila (hemijski gradijent) usmerena put napolje, veća od suprotno orijentisane električne sile (električnog gradijenta), postojaće neto-difuzija K^+ jona iz ćelije. Kako sve više K^+ jona difunduje kroz membranu i iznosi pozitivan naboj napolje, negativno naelektrisanje koje zaostaje unutar ćelije raste do nivoa koji zaustavlja dalju difuziju. Dolazi do izjednačavanja koncentracijskog i električnog gradijenta i uspostavljanja ekvilibrijumskog (ravnotežnog) potencijala za K^+ (Hall i Guyton 2011; Barrett i Ganong, 2012).

Ekvilibrijumski potencijal (E_x) za bilo koji jon izračunava se pomoću Nernstove jednačine na sledeći način:

$$E_x \cong \frac{-61.5 \text{ mV}}{z} \log \frac{[X]_u}{[X]_s}$$

Intracelularna (unutrašnja) koncentracija jona označena je sa X_u , a ekstracelularna (spoljašnja) sa X_s . Slovo z označava valencu jona, pa će za negativno naelektrisane jone Nernstov ravnotežni potencijal biti pozitivan, a za pozitivno naelektrisane negativan (Kibble i Halsey, 2013).

U većini ekscitabilnih ćelija joni značajni za bioelektrične fenomene su samo K^+ , Na^+ i Cl^- (u nekim tkivima poput srčanog i Ca^{2+}). Zbog toga se za izračunavanje ekvilibrijumskog-mirovnog potencijala membrane na temperaturi od $37^\circ C$ koristi Goldman-Hoćkin-Kacova jednaćina:

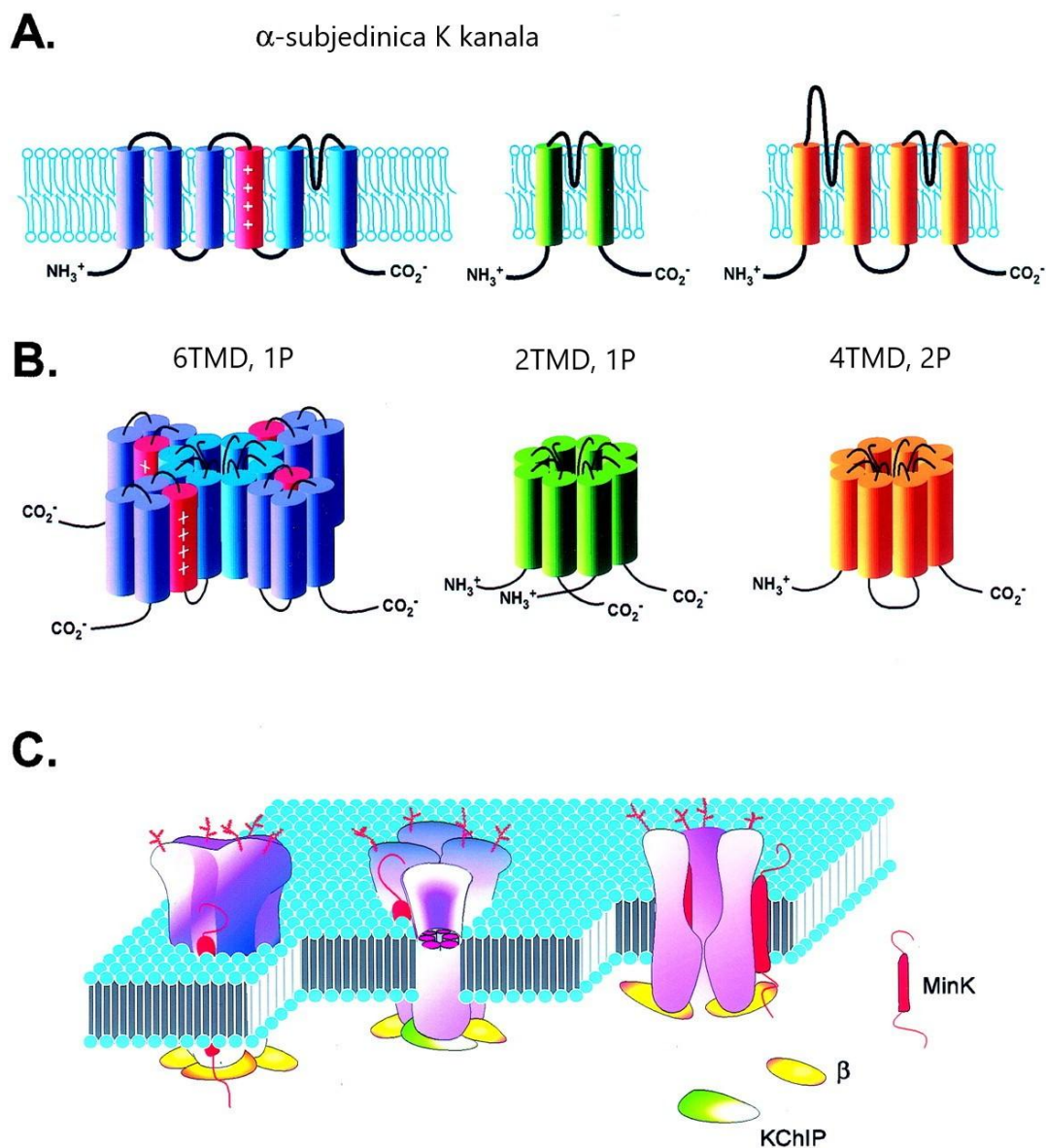
$$V_m \cong -61.5 \text{ mV} \log \frac{P_K[K]_u + P_{Na}[Na]_u + P_{Cl}[Cl]_s}{P_K[K]_s + P_{Na}[Na]_s + P_{Cl}[Cl]_u}$$

Propustljivost za jone oznaćena je sa P ; u oznaćava intracelularnu (unutrašnju), a s oznaćava ekstracelularnu (spoljašnju) koncentraciju jona (Hall i Guyton, 2011).

1.4.1. Struktura i podela K kanala

K kanali su najbrojnija grupa jonskih kanala koju kodira preko 75 gena identifikovanih u ljudskom genomu. Raznovrsnost K kanala se ogleda u različitim stimulusima koji su potrebni da bi došlo do njihovog otvaranja: promena intracelularne koncentracije Ca^{2+} , vezivanje određenih liganada i/ili vrednost membranskog potencijala. Osim razlika u načinu aktivacije, K kanali pokazuju i određene strukturne razlike. Tako npr. ligand-zavisni K kanali sadrže citoplazmatske ili ekstracelularne domene za vezivanje liganada, dok voltažno-zavisni K kanali poseduju integrisane membranske domene uključene u voltažnu senzitivnost (MacKinnon, 2003; Felipe i sar., 2006).

Prototipski K kanal je kompleks od četiri α subjedinice koje su grupisane tako da formiraju poru kroz membranu (Slika 4 A, B i C). Dva transmembranska heliksa i kratka petlja između njih (nazvana P-petlja) su zaštitni znak ovih kanala. P-petlja sadrži aminokiselinsku sekvencu treonin-valin-glicin-tirozin-glicin koja predstavlja selektivni filter koji je najodgovorniji za selektivno propuštanje jona K^+ kroz kanal. Ovakva kanonska arhitektura sa dva transmembranska heliksa i petljom je esencijalna i univerzalna odlika K-kanala, ali svaka subfamilija kanala se karakteriše daljim, različitim osobinama. Pored α subjedinica u sastav K kanala ulaze i različite pomoćne, regulatorne subjedinice kao što su β , MinK, KChiP i druge (Slika 4C) (Lu i sar., 2001; Senyon 2002; Ptacek i Fu; 2004).



Slika 4. Podela K kanala na osnovu broja transmembranskih domena (TMD) u sastavu α subjedinice i pora (P) koje one formiraju (izvor slike: Nerbonne i sar., 2001).

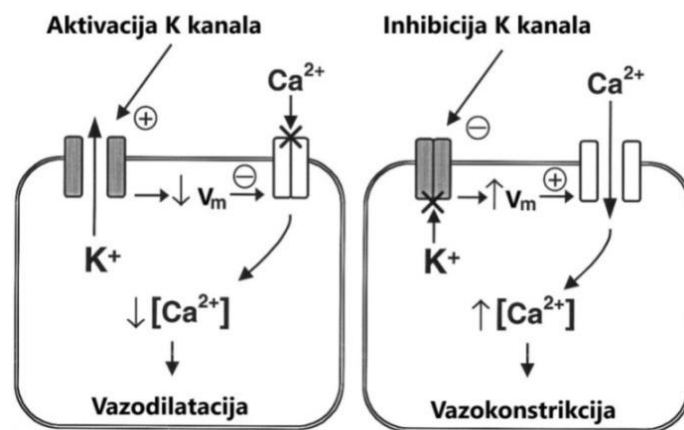
K kanali su grupisani u familije na osnovu njihove strukture, kao i fizioloških i farmakoloških osobina. Ovi kanali su klasifikovani u tri grupe, na osnovu broja transmembranskih domena (TMD) koji ulaze u sastav α subjedinice: K kanali sa dva, četiri i šest TMD (Felipe i sar., 2006; Protić i sar., 2013). U okviru svake familije, jonski kanali sa 65% identičnih aminokiselinskih sekvenci su dalje grupisani u subfamilije (Jenkinson, 2006). Standardna nomenklatura za K kanale je predložena od strane NC-IUPHAR-a (*Nomenclature and Drug Classification International Union of Basic and Clinical Pharmacology on Receptor*) i prikazana je u Tabelama 1, 3, 4 i 5 (Alexander i sar., 2019).

1.4.2. K kanali i regulacija vaskularnog tonusa

Vaskularni tonus ima značajnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska i distribuciji krvnog protoka u tkivima i organima tela, a određen je kontraktilnom aktivnošću vaskularnih glatkih mišićnih ćelija. Regulacija kontraktilne aktivnosti vaskularnih glatkih mišićnih ćelija rezultat je kompleksnog međudejstva vazodilatatornih i vazokonstriktornih stimulusa različitog porekla. Jonski kanali u njihovoj membrani i u membrani endotelnih ćelija imaju centralnu ulogu u ovim procesima (Jackson, 2000; Pinterova i sar., 2011).

Vaskularne glatke mišićne ćelije u zidu krvnog suda obezbeđuju njegov strukturni integritet, a svojom kontraktilnošću regulišu vaskularni tonus i krvni pritisak. Pri bazalnom tonusu vaskularne glatke mišićne ćelije su u polukontrahovanom stanju i mogu se dalje kontrahovati, dovodeći do smanjenja dijametra krvnog suda i povećanja krvnog pritiska. Obrnuto, njihova relaksacija dovodi do povećanja dijametra krvnog suda i smanjenja krvnog pritiska (Christensen i Mulvany, 2001). Koncentracija jona Ca^{2+} u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama glavna je determinanta koja određuje njihovo kontraktilno stanje. Vazokonstriktori izazivaju povećanje intracelularnog Ca^{2+} , a isto tako povećavaju i senzitivnost kontraktilnog aparata vaskularnih glatkih mišićnih ćelija na Ca^{2+} . Vazodilatatori izazivaju suprotne efekte. Stoga, fino štimovanje intracelularne koncentracije jona Ca^{2+} je imperativ za preciznu regulaciju organske i tkivne perfuzije (Nelson i sar., 1990; Cheng i sar., 2019).

Intracelularna koncentracija jona Ca^{2+} u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama tesno je regulisana V_m . Pošto je V_m vaskularnih glatkih mišićnih ćelija uglavnom zavisao od jona K^+ , K kanali imaju veoma značajan uticaj na njihovu kontraktilnost i prema tome, na dijametar krvnih sudova i krvni pritisak (Sorensen i sar., 2012). Hiperpolarizacija membrane vaskularnih glatkih mišićnih ćelija rezultat je efluksa jona K^+ zbog otvaranja K kanala. Ovaj efekat je praćen zatvaranjem voltažno-zavisnih Ca^{2+} (L-Ca) kanala što dovodi do smanjenja koncentracije intracelularnog Ca^{2+} i vazodilatacije. Suprotno, blokada funkcije K kanala dovodi do depolarizacije membrane i vazokonstrikcije (Slika 5) (Ko i sar., 2008).

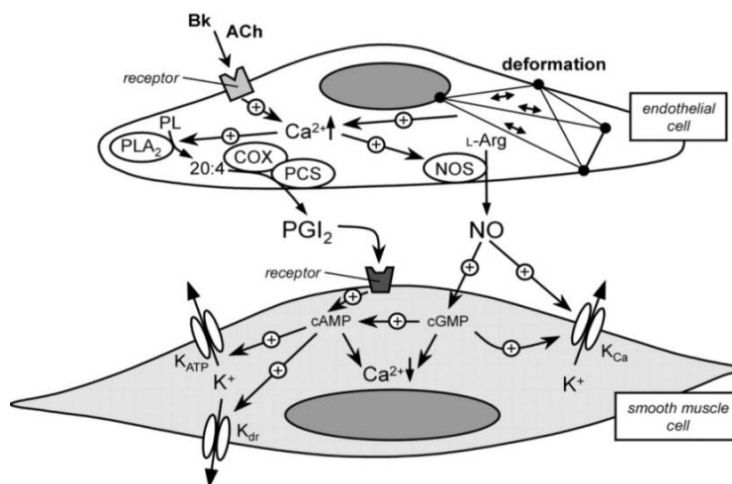


Slika 5. K kanali i regulacija vaskularnog tonusa (adaptirano iz: Jackson, 2000).

U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama V_m (-45 mV) je primarno određen izlaskom jona K^+ kroz nekoliko tipova K kanala na plazma membrani, uključujući voltažno-zavisne (K_v) kanale, Ca-zavisne (K_{Ca}) kanale koji brzo sprovode jone (BK_{Ca}), ulazno-ispravljačke (K_{ir}) kanale, ATP-senzitivne (K_{ATP}) kanale i K kanale sa dve pore (K_{2P}). Pošto ekvilibrijumski potencijal za K^+ jone iznosi oko -89 mV, otvaranje K kanala izaziva hiperpolarizaciju membrane. Ekscitacija vaskularnih glatkih mišićnih ćelija praćena depolarizacijom membrane usled ulaska Na^+ ili Ca^{2+} , ili izlaska Cl^- dovodi do otvaranja L-Ca kanala, povećanja intracelularne koncentracije Ca^{2+} i aktivacije ćelijske kontraktilne mašinerije. Depolarizacija takođe dovodi i do otvaranja K_v kanala, a odgovarajući porast intracelularne koncentracije Ca^{2+} u kombinaciji sa depolarizacijom uzrokuje otvaranje BK_{Ca} kanala. Otvaranje ovih kanala proizvodi kompenzatorne hiperpolarizujuće struje koje redukuju verovatnoću otvaranja L-Ca kanala i suprotstavljaju se vazokonstrikciji (Nelson i Quayle, 1995; Werner i Ledoux, 2014).

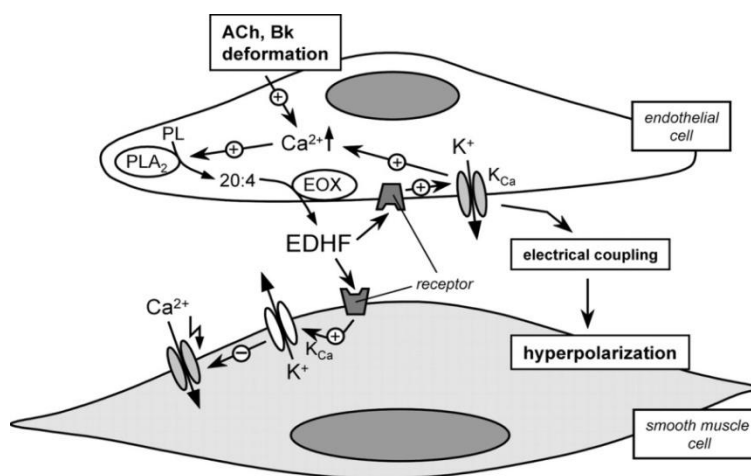
1.4.3. Funkcija endotela i endotelnih K kanala

Endotelne ćelije sintetišu i oslobađaju vazoaktivne medijatore kao odgovor na razne neurohumoralne supstance i fizičke stimulse. Najbolje opisani endotel-zavisni relaksantni faktori (EDRF) su azot-oksid (NO) i prostaciklin. Bazalnu sintezu ovih medijatora izrazito povećavaju receptor-zavisni agonisti, npr. bradikinin i acetilholin, kao i receptor-nezavisni mehanizmi, poput hipoksije, jakog stresa i oštećenja ćelije. Izuzev Ca^{2+} -nezavisnog oslobađanja azot-oksida izazvanog jakim stresom, porast intracelularnog Ca^{2+} zajednički je činilac endotelne produkcije reaktantnih faktora, imajući u vidu da su i fosfolipaza A2 (glavni enzim za sintezu prostaciklina) i NO-sintaza Ca^{2+} -zavisni enzimi (Slika 6) (Garland i sar., 1995).



Slika 6. Shematski prikaz puteva koji vode do oslobađanja NO i prostaciklina i njihov efekat na tonus glatkih mišićnih ćelija (izvor slike: <http://physiologyonline.physiology.org/>).

U poslednjih 20-25 godina prikupljeni su brojni dokazi koji potvrđuju da, kao dodatak NO i prostaciklinu, postoji i treći vazodilatatorni put koji značajno doprinosi endotel-zavisnoj relaksaciji. Njegov relaksantni efekat može biti odmaskiran kombinovanom blokadom ciklooksigenaze (sprečava stvaranje prostaciklina) i NO-sintaze. Relaksacija izazvana ovim faktorom dešava se sekundarno pri hiperpolarizaciji vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, a inhibira je depolarizacija membrane (npr. porast ekstracelularne koncentracije K^+ jona). Posledično, termin endotel-zavisna hiperpolarizacija (EDH) je pripisan ovom faktoru (Hecker, 2000). Identitet endotel-zavisnog hiperpolarizujućeg faktora (EDHF) predmet je debate tokom mnogo godina, ali kako trenutno izgleda, EDHF predstavlja skup mehanizama i supstanci koji se razlikuje u zavisnosti od vrste i od vaskularnog odeljka (Slika 7). Otkriće fenomena EDH značajno je povećalo interes ispitivanja uloge endotelnih K kanala u regulaciji vaskularnog tonusa (Busse i sar., 2002).



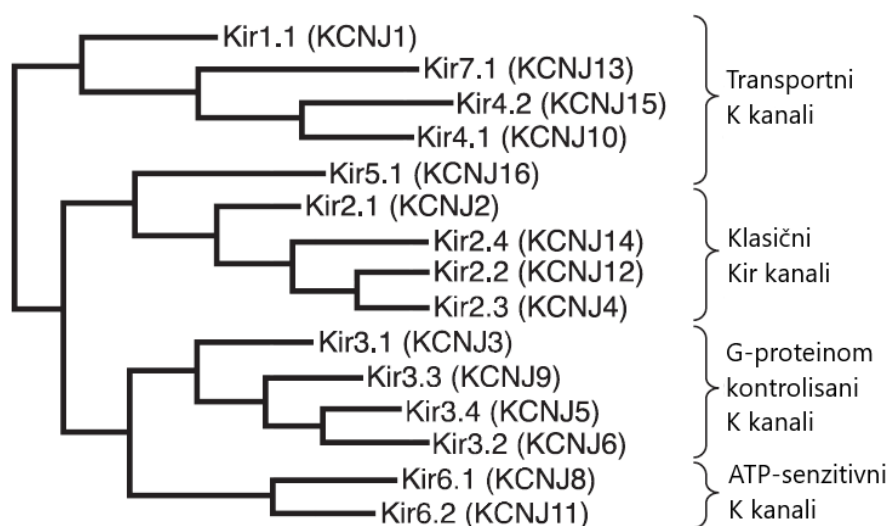
Slika 7. Shematski prikaz mehanizma endotel zavisne hiperpolarizacije (izvor slike: <http://physiologyonline.physiology.org/>).

Iako endotelne ćelije ispoljavaju sličnu kompleksnost K kanala kao vaskularne glatke mišićne ćelije, sa prisustvom K_v , K_{Ca} , K_{ir} , K_{ATP} i K_{2P} kanala, još uvek se relativno malo zna o ovim kanalima. Oni ostvaruju važne uloge u signalnim putevima endotelnih ćelija regulacijom njihovog membranskog potencijala. Zbog odsustva L-Ca kanala, hiperpolarizacija membrane endotelne ćelije usled aktivacije K kanala za rezultat ima influks Ca^{2+} u ćeliju kroz tranzitorne receptor-potencionalne kanale (engl. *transient receptor potential channels (TRPC)*). Porast intracelularnog Ca^{2+} rezultira vaskularnom relaksacijom preko stvaranja EDRF-a uključujući NO, prostaciklin i EDHF. Dodatno, endotelne ćelije su električno povezane jedna sa drugom putem neksusa, kao i sa ispod ležećim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama putem mioendotelnih spojeva. Prema tome, promene u membranskom potencijalu endotelnih ćelija se prenose na vaskularne glatke mišićne ćelije, te na taj način one posredno ostvaruju svoje uloge u regulaciji vaskularnog tonusa (Pinterova i sar., 2011).

1.5. PODTIPOVI K KANALA U VASKULARNOM GLATKOM MIŠIĆU

1.5.1. Kir kanali

Fenomen ulaznog ispravljanja (engl. *inward rectification*) prvi je opisao Kac na skeletnom mišiću 1949. godine. On je upotrebio termin „abnormalno ispravljanje“ kako bi istakao tendenciju da se sprovodljivost membrane za K^+ jone povećava tokom hiperpolarizacije, a smanjuje za vreme depolarizacije, što je u suprotnosti sa „normalnim“ odloženim ispravljanjem. Ulazno ispravljački (Kir) kanali sprovode K^+ jone u ćeliju pri membranskom potencijalu negativnijem od ekvilibrijumskog potencijala za K^+ , dok je pri pozitivnijim potencijalima izlazna K^+ struja ograničena i jedva da može da se detektuje (Hille, 2001). Objašnjenje fenomena ulaznog ispravljanja leži u činjenici da intracelularni Mg^{2+} i poliamini (spermin i spermidin) blokiraju izlazne K^+ struje. Kao nosioci pozitivnog naelektrisanja poliamini i Mg^{2+} stupaju u interakciju sa negativno naelektrisanim aminokiselinama prisutnim u transmembranskom M1 domenu i terminalnom C- kraju Kir kanala i na taj način onemogućavaju prolaz K^+ jona kroz poru (Hibino i sar., 2010). Kasnije su Kir kanali identifikovani na mnogim ekscitabilnim i neekscitabilnim ćelijama. Sedam subfamilija Kir kanala je do sada prepoznato, označenih redom od $K_{ir}1.x$ do $K_{ir}7.x$. One su dalje raspoređene u četiri funkcionalne grupe: 1) klasični Kir kanali ($K_{ir}2.x$); 2) G-proteinom modulisani K kanali ($K_{ir}3.x$); 3) ATP-senzitivni K kanali ($K_{ir}6.x$); 4) transportni K kanali ($K_{ir}1.x$, $K_{ir}4.x$, $K_{ir}5.x$ i $K_{ir}7.x$) (Slika 8) (Tabela 1) (Fujita i Kurachi, 2000).

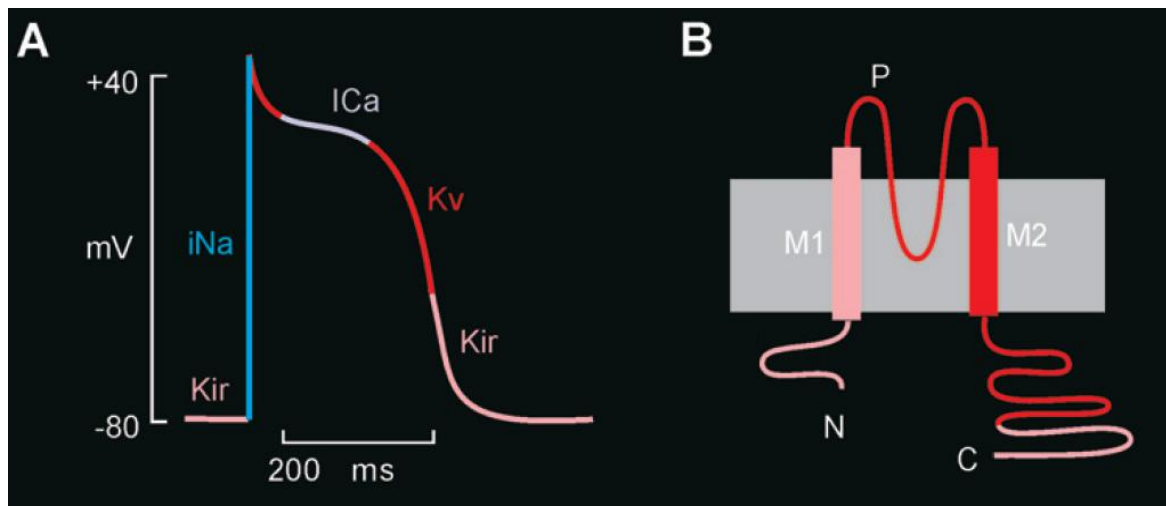


Slika 8. Kategorije Kir kanala i geni koji ih kodiraju (izvor slike: Fujita i Kurachi, 2000).

Tabela 1. Podtipovi, aktivatori i inhibitori Kir kanala

2TMD familija	Podtip	Pridružene subjedinice	Aktivatori	Inhibitori
Kir1.x	Kir1.1	-	-	tertiapin-Q, Ba ²⁺ , Cs ⁺
	Kir2.1	-	PIP ₂	spermin, spermidin, putrescin, Mg ²⁺ , Ba ²⁺ , Cs ⁺
	Kir2.2	-	-	Mg ²⁺ , Ba ²⁺ , Cs ⁺
Kir2.x	Kir2.3	-	-	Mg ²⁺ , putrescin, spermidin, spermin, Ba ²⁺ , Cs ⁺
	Kir2.4	-	Mg ²⁺	Cs ⁺ , Ba ²⁺
Kir3.x	Kir3.1	-	PIP ₂	tertiapin-Q, Ba ²⁺
	Kir3.2	-	PIP ₂	pimozid, dezipramin
	Kir3.3	-	PIP ₂	-
	Kir3.4	-	PIP ₂	tertiapin-Q
Kir4.x	Kir4.1	-	-	Ba ²⁺ , Cs ⁺
	Kir4.2	-	-	Ba ²⁺ , Cs ⁺
Kir5.x	Kir5.1	-	-	Ba ²⁺
Kir6.x	Kir6.1	SUR1, SUR2A, SUR2B	Otvarači K kanala	glibenklamid, tolbutamid
	Kir6.2	SUR1, SUR2A, SUR2B	Otvarači K kanala	glibenklamid, tolbutamid
Kir7.x	Kir7.1	-	-	Ba ²⁺ , Cs ⁺

Struktura Kir kanala odgovara strukturi prototipskog K kanala. Oni se sastoje od četiri α subjedinice koje formiraju poru, a od kojih svaka sadrži dva transmembranska domena (M1 i M2) i P-petlju između njih (Slika 9). Kod Kir kanala α subjedinica sadrži citoplazmatski C- i N- kraj, a pomoćne subjedinice nisu identifikovane. Izuzetak predstavljaju samo Kir6.x odnosno K_{ATP} kanali koji imaju složeniju heterooktamernu strukturu sa više tipova pomoćnih subjedinica i koji će biti detaljno opisani u narednim delovima teksta (Quayle i sar., 1997).



Slika 9. Akcioni potencijal (A) i struktura (B) srčanog ulazno-ispravljačkog (Kir) kanala (izvor slike: Loussouarn i sar., 2002).

Istraživanjem ekspresije Kir kanala detektovano je značajno prisustvo samo dva člana Kir2.0 subfamilije (Kir2.1 i Kir2.2) na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. Oni su identifikovani u malim, rezistentnim arterijama i arteriolama, a njihova aktivnost je zavisna od membranskog potencijala, kao i od ekstracelularne koncentracije K^+ jona (Standen i Quayle, 1998; Smith i sar., 2008).

Kir kanali deluju kao senzori povećanja ekstracelularnog K^+ , dovodeći do hiperpolarizacije membrane i vazodilatacije, kada je ekstracelularna koncentracija K^+ jona povišena u rasponu od 5 mM do 8-15 mM. Ovakav ishod deluje neočekivano, pošto bi povećanje nivoa ekstracelularnog K^+ trebalo da uzrokuje smanjenje elektrohemijskog gradijenta za K^+ , i tako redukuje opšti uticaj K^+ kanala na membranski potencijal vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i odatle na vaskularni tonus. Međutim, aktivacijom Kir kanala, zbog fenomena ulaznog ispravljanja, ovaj efekat se prevazilazi (Quayle i sar., 1997). Njihova senzitivnost za K^+ jone, čini Kir kanale moćnim metaboličkim sensorima, pošto oni mogu pokrenuti povećanje u krvnom protoku kao odgovor na akumulaciju K^+ jona koja npr. prati povećanu neuronsku aktivnost (Jackson, 2005).

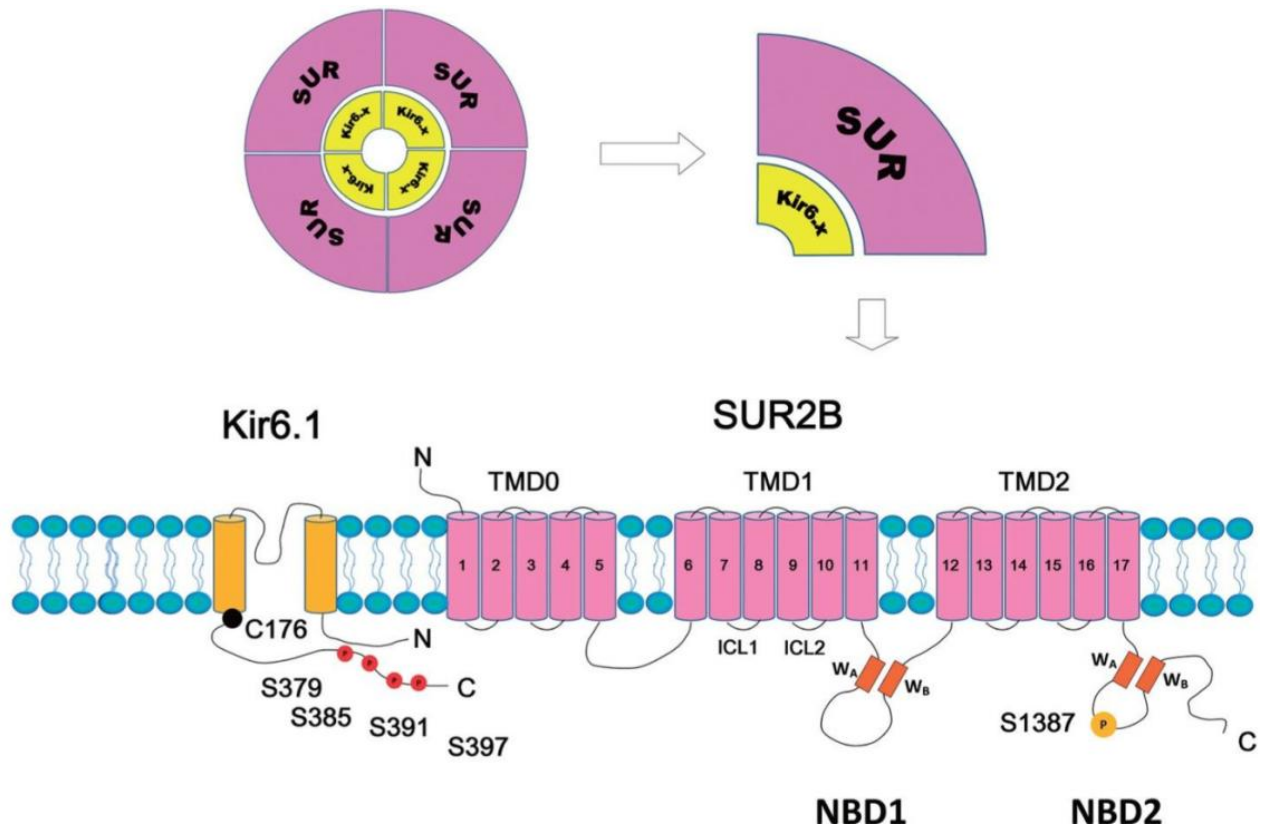
Jon Ba^{2+} blokira Kir struje u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama na voltažno-zavisan način. Vrednosti poluinhibicije izazvane Ba^{2+} , koje iznose 2.1 μM i 2.2 μM u koronarnim i cerebralnim arterijama, respektivno, povećavaju se eksponencijalno sa hiperpolarizacijom. Ipak, Ba^{2+} je manje-više efikasan i protiv K_{ATP} (K_d 200 μM na -60 mV), BK_{Ca} ($K_d > 10$ mM) i K_v ($K_d > 1$ mM) kanala. Stoga, samo pri koncentracijama ispod 50 μM , Ba^{2+} je selektivni blokator Kir kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. Jon Cs^+ , koji deluje iz spoljašnosti ćelije, takođe inhibira Kir struje sa K_d vrednošću 2.9 mM pri potencijalu -60 mV, dok ih spoljašnji Ca^{2+} i Mg^{2+} blokiraju samo parcijalno (Sorensen i sar., 2012).

Osobine i funkcije K_{ir} kanala variraju između različitih vaskularnih odeljaka, kao i u odnosu na veličinu krvnih sudova. Ekspresija K_{ir} kanala je najizraženija u glatkom mišiću autoregulatornih vaskularnih odeljaka, kao što su koronarna i cerebralna cirkulacija. Ekspresija K_{ir} kanala se povećava sa smanjenjem dijametra krvnog suda. Ovakva razlika u ekspresiji K_{ir} kanala može se obrazložiti činjenicom da sprovodne arterije pokazuju veoma mali odgovor na manja povećanja ekstracelularnog K^+ , dok rezistentne arterije pokazuju snažan odgovor (Chrissobolis i Sobey, 2003).

1.5.2. K_{ATP} kanali i otvarači kalijumovih kanala

ATP-senzitivne kalijumove (K_{ATP}) kanale je otkrio Noma na kardiomiocitima 1983. godine (Noma, 1983). Nedugo zatim ovi kanali identifikovani su na mnogim drugim tkivima uključujući i vaskularne glatke mišićne ćelije (Quayle i sar., 1997). Iako su ime dobili po osobini da povećanje intracelularnog ATP-a inhibira njihovu aktivnost, pokazano je da njihova aktivnost može biti modulirana mnoštvom signalnih puteva nevezanih za njihovu senzitivnost za ATP. Tako, oni predstavljaju metu u mehanizmu delovanja mnogih vazokonstriktora i vazodilatatora (Jackson, 2000; Teramoto, 2006). Predominantni tip K_{ATP} kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama su kanali male provodljivosti koji su, u prisustvu pinacidila, stimulirani mikromolarnim koncentracijama ATP-a i milimolarnim koncentracijama nukleotid difosfata (NDP), dok veće doze ATP-a inhibiraju njihovu aktivnost. Ovi kanali se ponekad označavaju kao K_{NDP} kanali (Beech i sar., 1993). K_{ATP} kanali u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama ostvaruju važne uloge u održavanju mirovnog membranskog potencijala i regulaciji vaskularnog tonusa. Delujući kao metabolički senzori oni učestvuju u povezivanju ćelijskog metabolizma i ekscitabilnosti (Quayle i sar., 1997). Odnos ATP/ADP glavni je faktor koji određuje njihovu aktivnost. Povećanje lokalnog metabolizma dovodi do smanjenja ATP/ADP odnosa, što povećava verovatnoću otvaranja K_{ATP} kanala i dovodi do relaksacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija. Sa druge strane, smanjenje lokalnog metabolizma preokreće navedeni proces i dovodi do povećanja vaskularnog tonusa (Akrouh i sar., 2009; Flagg i sar., 2010). U regulatore i modulare aktivnosti K_{ATP} kanala, pored nukleotida, spadaju mnogi medijatori kao što su NO, vazoaktivni intestinalni peptid, prostaciklin, acidoza, laktati, adenozin, protein kinaze i drugi (Sandhiya i Dkhar, 2009).

Strukturno, K_{ATP} kanali su funkcionalni heterooktameri izgrađeni od četiri Kir6.x subjedinice koje formiraju poru i četiri regulatorne subjedinice poznate kao sulfonilurea receptori, SURx (Slika 10). Kir6.x subjedinice su odgovorne za inhibiciju ATP-om, a SURx za NDP aktivaciju. Na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama K_{ATP} kanali su predominantno kompleksi Kir6.1 i SUR2B subjedinica (Hibino i sar., 2010).



Slika 10. Struktura K_{ATP} kanala (izvor slike: Shi i sar., 2012).

Do sada, dva Kir6.x gena (KCNJ8 za Kir6.1 i KCNJ11 za Kir6.2) i dva SURx gena (ABCC8 za SUR1 i ABCC9 za SUR2A i SUR2B) su identifikovana. Kir6.x deli 40-50% homologije u sekvenci aminokiselina sa drugim Kir kanalima. Strukturne studije sugerišu da Kir6.x ima 2 transmembranska heliksa, citoplazmatski N- i C- kraj i petlju pore sa selektivnim filterom odgovornom za propustljivost K⁺ (Campbell i sar., 2003). Funkcionalna ekspresija K_{ATP} kanala zahteva koekspresiju Kir6.x i SURx subjedinicu u odnosu 1:1. SUR1 je dominantno prisutna u pankreasnim β ćelijama. SUR2 ima dve varijante: SUR2A i SUR2B, koje nastaju alternativnim isecanjem egzona 38 u ABCC9 genu. One se razlikuju u poslednje 42 aminokiseline na C- kraju. SUR2A je uglavnom prisutna u miokardu i skeletnom mišiću, dok je SUR2B generalno distribuirana u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Shi i sar., 2012). SURx subjedinicu ima 3 transmembranska domena: TMD1 i TMD2 sa po 6 transmembranskih segmenata i TMD0, N-terminalni domen, sa 5 transmembranskih segmenata. Postoje dve velike intracelularne petlje koje spajaju susedne domene. Svaka intracelularna petlja sadrži domene za vezivanje nukleotida: Walker-ov motiv A (W_A) i Walker-ov motiv B (W_B). Ovi domeni katalizuju hidrolizu ATP-a (Campbell i sar., 2003; Rubaiy, 2016).

Dobro je poznata činjenica da kiseonik kao vazoaktivni faktor učestvuje u regulaciji vaskularog tonusa i da povećanje parcijalnog pritiska kiseonika izaziva vazokonstrikciju, a hipoksija vazodilataciju. Brojne studije ističu da K_{ATP} kanali u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama ostvaruju važnu ulogu u postizanju sistemske vazodilatacije tokom hipoksije, povećavajući krvni protok do srca, bubrega i mišića. Ova vazodilatacija se pripisuje oslobađanju NO-a ili adenzina zbog hipoksije, ali i direktnom efektu same hipoksije. Za vreme hipoksije, K_{ATP} kanali mogu biti aktivirani padom ATP-a, padom pH vrednosti i parcijalnog pritiska kiseonika ili porastom intracelularnih laktata i ADP-a. Ovi faktori mogu aktivirati K_{ATP} kanale direktno i/ili potenciranjem NO aktivacije (Landry, 1992).

Svoje uloge u mehanizmu delovanja vazodilatatora i vazokonstriktora K_{ATP} kanali ostvaruju interakcijom sa različitim protein kinazama. Tako, K_{ATP} kanali aktivirani protein kinazom A (PKA) i cGMP-zavisnom protein kinazom učestvuju u mehanizmu dejstva endogenih vazodilatatora poput adenzina i prostaciklina. Sa druge strane, aktivacija protein kinaze C (PKC) i povećanje intracelularnog Ca^{2+} izazvano vazokonstriktorima poput noradrenalina, vazopresina, endotelina i angiotenzina II praćeno je inhibicijom K_{ATP} kanala (Jackson, 2005).

K_{ATP} kanale u glatkim mišićima inhibiraju antidijabetici iz grupe derivata sulfonilureje, kao što su glibenklamid i tolbutamid. Glibenklamid je najčešće korišćeni inhibitor K_{ATP} kanala u studijama vaskularnih glatkih mišića, dok tolbutamid pokazuje dosta manju potentnost. Ekstracelularni Ba^{2+} takođe deluje kao inhibitor K_{ATP} kanala sa EC_{50} vrednošću 100 μM na -80 mV. Na K_{ATP} kanale ne deluje iberiotoksin, a manje su senzitivni na tetraetilamonijum (TEA) sa vrednošću poluinhibicije 7 mM (Ko i sar., 2008).

U istraživanju potencijalnih lekova, suštinski interes je usmeren ka K_{ATP} kanalima s obzirom na to da oni ispoljavaju aktivnost pod bazalnim uslovima i da značajno doprinose kontroli mirovnog membranskog potencijala i regulaciji vaskularnog tonusa (Teramoto, 2006). K_{ATP} kanali obezbeđuju pozadinsku K^+ provodljivost važnu za regulaciju V_m i odatle za vaskularni tonus i protok krvi. Ipak, mora se imati u vidu da doprinos K_{ATP} kanala mirovnom tonusu varira među vaskularnim odeljcima. Tako, na primer, u koronarnim, mezenteričnim i renalnim arterijama ovi kanali doprinose regulaciji V_m čak i u normoksiji i odsustvu vazodilatatora. Sa druge strane, blokatori K_{ATP} kanala, kao što je glibenklamid, generalno ne utiču na vaskularnu rezistenciju, tonus ili membranski potencijal u cerebralnim arterijama, iako su K_{ATP} kanali dokazano prisutni i funkcionalni u ovim krvnim sudovima (Tajada, 2012).

1.5.2.1. Otvarači kalijumovih kanala

Otvarači kalijumovih kanala (OKK) predstavljaju hemijski veoma raznovrsnu grupu supstanci. Brojni predstavnici su do sada sintetisani, uključujući kromakalim, levokromakalim, nikorandil, pinacidil, minoksidil, diazoksid, BRL-55834 i druge. Vazodilatacija izazvana ovim lekovima uspešno se blokira glibenklamidom, a dokazano je da oni hiperpolarišu vaskularne glatke mišićne ćelije tako što povećavaju verovatnoću otvaranja K_{ATP} kanala (Brayden, 2002). Neki OKK pronašli su svoje mesto u terapiji hipertenzije. Nikorandil, istovremeni OKK i donor NO-a, klinički se koristi u terapiji angine pektoris u Evropi i Japanu. OKK mogu posedovati veliki terapijski potencijal u mnogim kliničkim stanjima kao što su akutna i hronična ishemija miokarda, kongestivna srčana insuficijencija, bronhijalna astma, urinarna inkontinencija i izvesne miopatije. Dodatno, otvarači K_{ATP} kanala na β -ćelijama pankreasa, poput diazoksida, klinički su korisni u tretmanu hipersekrecije insulina udružene sa insulinomom i perzistentnom hiperinsulinemijskom hipoglikemijom novorođenčadi (Tabela 2) (Hibino i sar., 2010).

Tabela 2. Otvarači K_{ATP} kanala, primena i mehanizam dejstva (adaptirano iz: Rubaiy, 2016)

OKK	Klinička primena	Potencijalna primena	Mehanizam dejstva
Diazoksid	hipertenzivna kriza, insulinom		Otvaranje K_{ATP} kanala uzrokuje efluks K^+ ,
Minoksidil	alopecija, teška hipertenzija	hipertenzija, bronhijalna astma, urinarna inkontinencija,	hiperpolarizaciju membrane, relaksaciju glatkih
Nikorandil	angina pektoris	neki oblici miopatija	mišićnih ćelija i smanjenje krvnog
Pinacidil	-		pritiska
Kromakalim	-		

K_{ATP} kanali u različitim tkivima ispoljavaju značajne varijacije u odgovoru na OKK. Ova tkivna specifičnost i selektivnost pripisuje se prisustvu različitih Kir6.x i SURx subjedinica u različitim tkivima (Moreau i sar., 1999). Tako, K_{ATP} kanale β -ćelija pankreasa snažno aktivira diazoksid, slabo pinacidil, a potpuno su neosetljivi na dejstvo kromakalima i nikorandila. Suprotno, srčane K_{ATP} kanale aktiviraju pinacidil, kromokalim i nikorandil, ali ne i diazoksid. K_{ATP} kanale na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama aktiviraju svi navedeni lekovi (Lawson, 2000). Ipak, tkivna specifičnost i selektivnost do sada sintetisanih OKK nije dovoljna. Ovo rezultuje pojavom ozbiljnih neželjenih efekata tokom njihove upotrebe, zbog čega je klinička primena OKK danas prilično ograničena. Na primer, OKK koji se koriste u terapiji urinarne inkontinencije, deluju i na vaskularni glatki mišić, što kao neželjeno dejstvo izaziva hipotenziju i tahikardiju. Različiti OKK se vezuju za različite polipeptidne segmente SURx subjedinica, dok, na primer, vezujuće mesto za diazoksid još uvek nije precizno utvrđeno. Bolje razumevanje trodimenzionalne strukture K_{ATP} kanala, kao i alosternih interakcija njihovih subjedinica može u budućnosti dovesti do sinteze visoko selektivnih OKK sa minimalnim neželjenim efektima (Sandhiya i Dkhar, 2009; Rubaiy, 2016).

1.5.3. K_v kanali

Hodgkin i Huxley su 1949. godine prvi registrovali struje kroz K_v kanale na džinovskim aksonima lignje. Na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama one su detektovane tek 80-ih godina prošlog veka. K_v kanali su najveća superfamilija K kanala, za koju je odgovorno oko 40 gena i koja sadrži 12 podfamilija od kojih svaka ima po nekoliko predstavnika. Predstavnicima K_v1-4 , 7 i 10-12 podfamilija mogu da formiraju funkcionalne kanale kao homomeri, dok K_v5 , 6, 8 i 9 moraju da se udružuju sa K_v2 ili 3 subjedinicama da bi formirali funkcionalni kanal. Zvanična nomenklatura za K_v kanale je $K_{v,m,n}$, gde m i n označavaju podfamiliju i redni broj otkrića kanala (Tabela 3) (Hille, 2001; Jackson, 2018).

Tabela 3. Podtipovi, aktivatori i inhibitori K_v kanala

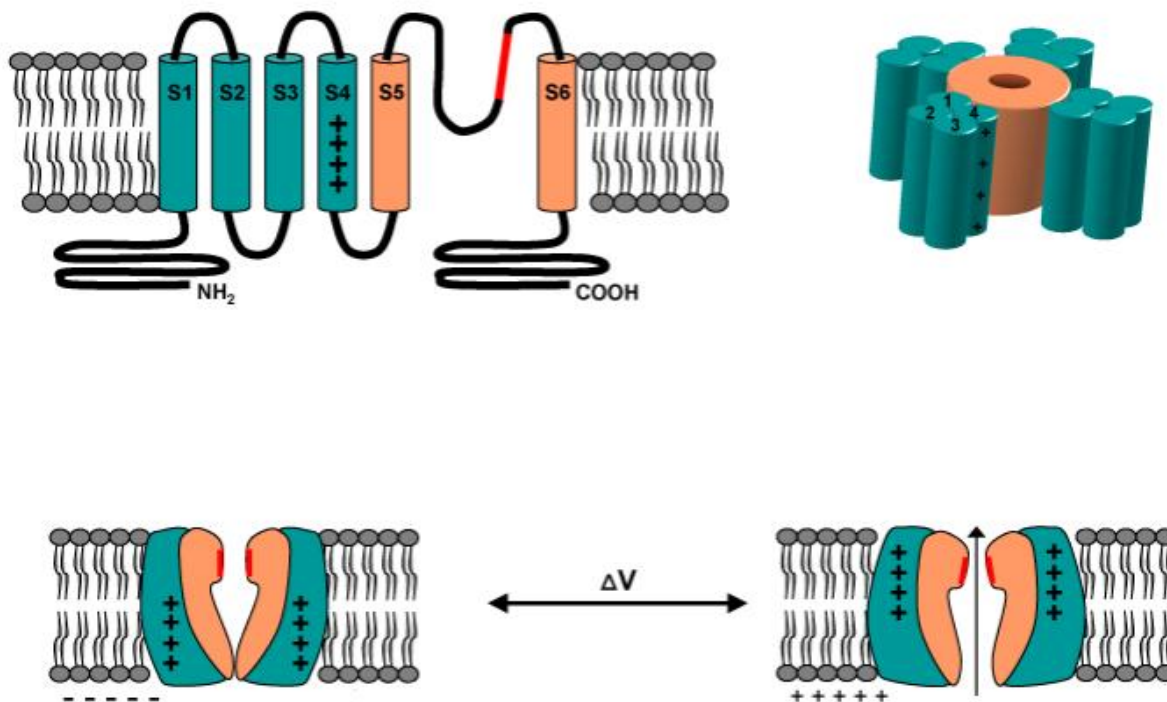
6TMD familija Voltažno-zavisni	Drugi naziv	Podtip	Pridružene subjedinice	Aktivatori	Inhibitori	
Kv1.x	Shaker	Kv1.1	K _v 1.2, K _v 1.4, K _v β1 i K _v β2	-	α-dendrotoksin, margatoksin, tetraetilamonijum (TEA)	
		Kv1.2	K _v 1.1, K _v 1.4, i K _v β2	K _v β1	-	margatoksin, α-dendrotoksin, noksiustoksin
		Kv1.3	K _v 1.1, K _v 1.2, K _v 1.4, K _v 1.6, K _v β1 i K _v β2	-	-	margatoksin, noksiustoksin, TEA, maurotoksin, koreolid
		Kv1.4	K _v 1.1, K _v 1.2, K _v β1 i K _v β2	-	-	fampridin
		Kv1.5	K _v β1 i K _v β2	-	-	fampridin
		Kv1.6	K _v β1 i K _v β2	-	-	α-dendrotoksin, TEA
		Kv1.7	K _v β1 i K _v β2	-	-	noksiustoksin, fampridin
		Kv1.8	K _v β1 i K _v β2	-	-	fampridin
Kv2.x	Shab	Kv2.1	K _v 5.1, K _v 6.1- 6.4, K _v 8.1- 8.2, K _v 9.1- 9.3	-	-	TEA
		Kv2.2	K _v 5.1, K _v 6.1- 6.4, K _v 8.1- 8.2, K _v 9.1- 9.3	-	-	fampridin, TEA
Kv3.x	Shal	Kv3.1	-	-	-	fampridin, TEA
		Kv3.2	-	-	-	fampridin, TEA
		Kv3.3	-	-	-	TEA
		Kv3.4	MiRP2	-	-	TEA
Kv4.x	Shaw	Kv4.1	KChIP 1- 4, DPP6, DPP10	-	-	fampridin
		Kv4.2	KChIP 1- 4, DPP6, DPP10, K _v β1, NCS- 1, Navβ1	-	-	-
		Kv4.3	KChIP 1- 4, DPP6 and DPP10, MinK, MiRPs	-	-	-
Kv5.x		Kv5.1	-	-	-	-
		Kv6.1	-	-	-	-
Kv6.x		Kv6.2	-	-	-	-
		Kv6.3	-	-	-	-
		Kv6.4	-	-	-	-
		Kv6.4	-	-	-	-

		Kv7.1	-	-	XE991, linopirdin
		Kv7.2	-	retigabin	XE991, linopirdin, TEA
Kv7.x	KCNQ	Kv7.3	-	gabapentin, retigabin	linopirdin
		Kv7.4	-	retigabin	XE991, linopirdin, TEA
		Kv7.5	-	retigabin, gabapentin	linopirdin, XE991
Kv8.x		Kv8.1	-	-	-
		Kv8.2	-	-	-
		Kv9.1	-	-	-
Kv9.x		Kv9.2	-	-	-
		Kv9.3	-	-	-
		Kv10.1	-	-	LY97241, terfenadin, dofetilid, kalmodulin, astemizol
Kv10.x	EAG	Kv10.2	-	-	LY97241, hinidin
		Kv11.1	minK, MiRP1	RPR260243	astemizol, terfenadin, dizopiramid, E4031, dofetilid, ibutilid
Kv11.x	ERG	Kv11.2	minK	-	E4031
		Kv11.3	minK	-	E4031
		Kv12.1	minK	-	Ba ²⁺
Kv12.x	ELK	Kv12.2	minK, MiRP1	-	Cs ⁺

K_v kanali su heteromultimetrični proteini sastavljeni od četiri α subjedinice koje formiraju poru i pomoćnih citoplazmatskih β subjedinica. Strukturno, α subjedinica ovih kanala ima citoplazmatski N- i C- kraj, sadrži šest transmembranskih domena (S1-S6), sa petljom pore između S5 i S6 i voltažnim senzorom u sastavu S4 domena (Korokvina i England, 2002). U sastavu S4 domena se nalazi neobična aminokiselinska sekvenca u kojoj se lizin ili arginin javljaju na svakoj trećoj ili četvrtoj poziciji koja daje pozitivno naelektrisanje i odgovorna je za voltažno-zavisnu aktivaciju kanala, dok je N- kraj odgovoran za inaktivaciju kanala (Slika 11) (Miller, 2000).

Funkcionalan K_v kanal sadrži četiri α subjedinice koje mogu biti iste ili različite. Pošto mogu biti homo- ili heterotetrameri, biofizičke osobine, fiziološka regulacija i farmakološke osobine K_v kanala veoma variraju. Na primer, kanal koji se sastoji od dve K_v2.1 i dve K_v1.5 subjedinice može biti funkcionalno različit od kanala koji sadrži tri K_v2.1 i jednu K_v1.5 subjedinicu; posledično, struje koje sprovode ovi kanali se značajno razlikuju po kinetici, amplitudi i odgovoru na različite supstance (Joseph i sar., 2013). Još većoj kompleksnosti ovih heteromultimera doprinosi

njihova interakcija sa manjim pomoćnim proteinima uključujući β subjedinice, KChIP, KchAP i minK proteine, miRP peptid i druge. Ipak, samo neki od ovih pomoćnih proteina su identifikovani u vaskularnom tkivu (Ko i sar., 2010).



Slika 11. Struktura voltažno-zavisnog K kanala (izvor slike: Börjesson i Elinder, 2008).

Vaskularni K_v kanali su uglavnom K_v1 , K_v2 , K_v3 i K_v4 izoforme kanala. Skorije, pripadnici K_v7 (KCNQ) i K_v11 (HERG) familija su takođe identifikovani u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Ohya i sar., 2003; Gutterman i sar., 2005; Greenwood i sar., 2009). K_v kanali ispoljavaju snažnu voltažnu zavisnost. Depolarizacija ćelijske membrane dovodi do njihove aktivacije i do povećanja hiperpolarizujućih izlaznih struja. Nastala hiperpolarizacija vaskularnih glatkih mišićnih ćelija inaktivira L-Ca kanale i posledično smanjuje vaskularni tonus. Prag za aktivaciju K_v kanala iznosi oko -30 mV (Jackson, 2000).

K_v struje zabeležene u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama mogu biti podeljene na dva glavna tipa, na osnovu razlike u voltažnoj senzitivnosti, kinetici i senzitivnosti prema inhibitorima: kasno-ispravljачka izlazna K^+ struja (I_K) i tranzitorna-izlazna K^+ struja (I_A) (Nelson i Quayle, 1995; Lida i sar., 2005). I_K pokazuje brzu aktivaciju sa sporom inaktivacijom, dok I_A pokazuje bržu aktivacionu i brzu inaktivacionu kinetiku; obe struje su voltažno-zavisne. I_K je najviše odgovorna za repolarizaciju, dok I_A ima relativno mali udeo u ukupnoj izlaznoj K_v struji i uglavnom je

inaktivisana pri mirovnom membranskom potencijalu. I_K je prisutna u većini vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, dok se I_A ređe detektuje i postoji, na primer, zajedno sa I_K , u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama renalnih arterija, portne vene i pulmonalnih arterija (Sandhiya i Dkhar, 2009; Pongs i sar., 2010).

U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama najvažniji podtipovi K_v kanala su K_v1 ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.5$, $K_v1.6$), K_v2 ($K_v2.1$), K_v3 ($K_v3.1$), K_v4 ($K_v4.2-3$) i K_v7 ($K_v7.1-5$). Obrazac ekspresije je zavisan od vaskularnog odeljka. Istraživanja pokazuju da funkcionalna ekspresija K_v kanala može biti regulisana heteromultimerizacijom sa „tihim“ (engl. *silent*) K_v5 , 6, 8 i 9 subjedinicama. Izgleda da ova heteromultimerizacija moduliše ekspresiju K_v struja, senzitivnost na različite supstance, kao i biofizičke osobine kanala poput inaktivacije (Castle, 2010; Werner i Ledoux, 2014; Nieves Cintron i sar., 2018).

Prepoznatljiva odlika K_v kanala je njihova senzitivnost prema farmakološkim modulatorima. Jedinjenja koja se najčešće koriste za inhibiciju K_v kanala su 4-aminopiridin (4-AP ili fampridin) i TEA. Generalno, K_v kanali vaskularnih glatkih mišićnih ćelija pokazuju veću senzitivnost prema 4-AP, koji nespecifično inhibira pripadnike K_v1-4 podfamilija ovih kanala (Cox, 2005; Alexander i sar., 2019). Elektrofiziološka snimanja su pokazala da su kanali kodirani $K_v1.2$ i $K_v1.5$ genima relativno senzitivni na 4-AP, dok K_v2 kanale efikasnije inhibiše TEA. Koncentracije 4-AP potrebne za polumaksimalnu inhibiciju funkcije K_v kanala variraju između 0.3 mM i 1.1 mM. Ove razlike u senzitivnosti kanala pripisuju se različitoj ekspresiji podtipova K_v kanala, upotrebi različitih životinjskih vrsta u ispitivanjima, razlikama u polu, tehnikama izolacije ćelija i uslovima snimanja (Garcia i sar., 1994; Immke i sar., 1999).

Vazokonstriktori izazivaju inhibiciju K_v kanala preko aktivacije fosfolipaze C (PLC) i PKC. Serotonin, na primer, inhibira K_v struje u pulmonalnim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama depolarizacijom membrane preko aktivacije PLC, PKC i tirozin kinaza (c-*Src*). Primena inhibitora PLC i PKC sprečava ovaj proces (Cogolludo i sar., 2006). Dalje, angiotenzin II i endotelin-1 inhibiraju K_v struje u mezenteričnim, odnosno pulmonalnim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama pacova aktivacijom Ca^{2+} -zavisnih podtipova PKC (Hayabuchi i sar., 2001). Sa druge strane, vazodilatatori tipično koriste cAMP i cGMP signalne puteve da aktiviraju PKA i protein kinazu G (PKG). Tako, stimulacija β adrenergičkih receptora preko PKA aktivira K_v struje u izolovanim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama vene porte zeca. Drugi poznati vazodilatatori, poput prostaciklina i adozina, aktiviraju K_v struje u cerebralnim, odnosno koronarnim arterijama zeca. Dodatno, smanjenje intracelularnog pH takođe dovodi do aktivacije K_v kanala (Smirnov i sar., 2002; Ko i sar., 2008; Nelson i sar., 2011).

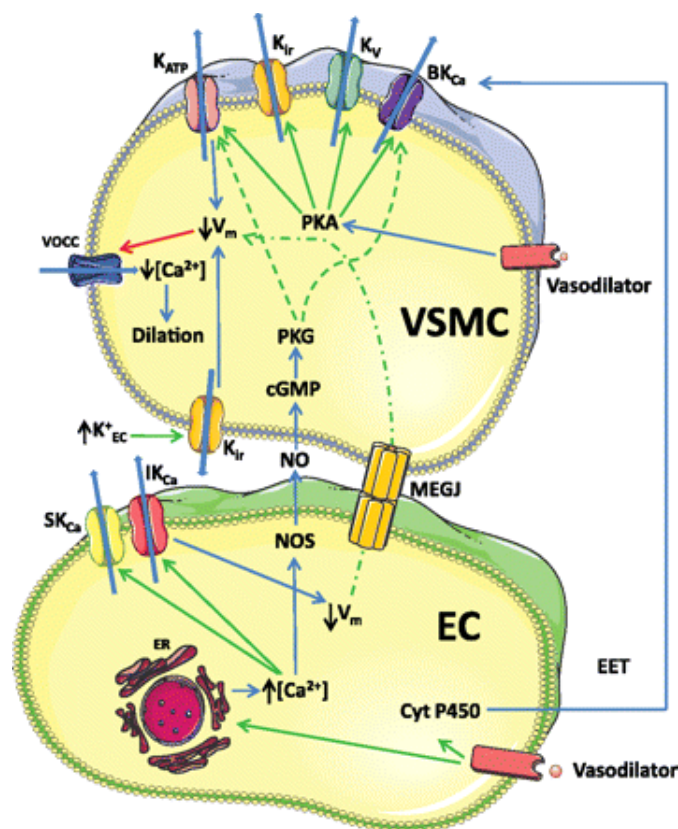
1.5.4. K_{Ca} kanali

K_{Ca} kanali su otkriveni 1972. godine kada je Meech objavio da intracelularne injekcije Ca²⁺ dovode do povećanja provodljivosti jona K⁺ u nervnim ćelijama (Meech, 1972). K_{Ca} kanali ostvaruju važnu ulogu u ćelijskoj ekscitabilnosti tako što registruju i reaguju na promene koncentracije intracelularnog Ca²⁺. Na osnovu njihove provodljivosti familija K_{Ca} kanala je podeljena na kanale sa velikom (BK_{Ca}, ~100-300 pS), intermedijernom (IK_{Ca}, ~25-100 pS) i malom provodljivošću (SK_{Ca}, ~2-25 pS) (Tabela 4) (Carvalho de Souza i sar., 2013). Dok BK_{Ca} kanale aktivira depolarizacija membrane i/ili vezivanje Ca²⁺ za kanal, SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali su voltažno-nezavisni i aktiviraju se vezivanjem Ca²⁺ za kalmodulin koji se konstitutivno vezuje sa kanalima (Wei i sar., 2005). Preostala tri člana ove grupe su uključena u nomenklaturu Ca-zavisnih K kanala s obzirom na strukturnu sličnost sa njima i povezanost sa genima koji ih kodiraju. Međutim, mnogo bolje izučene funkcionalne karakteristike ovih kanala tokom poslednjih godina doprinele su da oni budu izdvojeni u posebne kategorije. Naime, pokazano je da su ova tri kanala skoro u potpunosti nesenzitivni na Ca²⁺. Na-senzitivni K kanali (K_{Na1x}), nekada označavani kao K_{Ca4.1} i K_{Ca4.2}, aktiviraju se kao odgovor na promene intracelularnih koncentracija Na⁺ i/ili Cl⁻, dok K_{Ca5.1} kanal aktivira povećanje intracelularnog pH. Iz navedenih razloga ova podfamilija K kanala sa šest transmembranskih domena sada nosi naziv „Ca i Na-zavisni K kanali“ (Kaczmarek i sar., 2017).

Tabela 4. Podtipovi, aktivatori i inhibitori Ca i Na-zavisnih kalijumovih kanala

6TMD familija Ca ²⁺ i Na ⁺ -zavisni	Drugi naziv	Podtip	Aktivatori	Inhibitori
K _{Ca1x}	BK _{Ca} , MaxiK, Slo1	K _{Ca1.1}	NS004, NS1619	paksilin, karibdotoksin, iberiotoksin, TEA
	SK _{Ca1}	K _{Ca2.1}	EBIO, NS309	apamin, UCL1684, TEA
K _{Ca2x}	SK _{Ca2}	K _{Ca2.2}	NS309, EBIO	UCL1684, apamin, TEA
	SK _{Ca3}	K _{Ca2.3}	EBIO, NS309	apamin, UCL1684, TEA
K _{Ca3x}	IK _{Ca}	K _{Ca3.1}	NS309, EBIO SKA-121	karibdotoksin, TRAM-34, senikapok
	Slo2.1, <i>Slack</i>	K _{Na1.1}	bitionol, niklozamid	bepriidil, hinidin
K _{Na1x}	Slo2.2, <i>Slick</i>	K _{Na1.2}	nifluminska kiselina	Ba ²⁺ , hinidin
K _{Ca5.x}	Slo3	K _{Ca5.1}	-	hinidin

SK_{Ca}, IK_{Ca} i BK_{Ca} kanali su prisutni u vaskulaturi sa predominantnom ekspresijom BK_{Ca} kanala na glatkim mišićnim ćelijama, a SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala na endotelnim ćelijama. Svi ovi kanali značajno doprinose regulaciji vaskularnog tonusa. Aktivacija BK_{Ca} kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama omogućuje izlazak K⁺, dovodeći do hiperpolarizacije membrane. Sa druge strane, aktivacija SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala indirektno pokreće hiperpolarizaciju u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama endotel-zavisnim mehanizmima koji uključuju stvaranje NO i EDH. Hiperpolarizacija zavisna od endotela verovatno se ostvaruje električnim povezivanjem endotela i glatkih mišićnih ćelija putem mioendotelnih spojeva i/ili aktivacijom Kir kanala usled akumulacije K⁺ u intercelularnom prostoru zbog aktivnosti SK_{Ca} i IK_{Ca} u endotelnim ćelijama (Slika 12) (Feletou, 2009; Hill i sar., 2010; Kohler i sar., 2010).

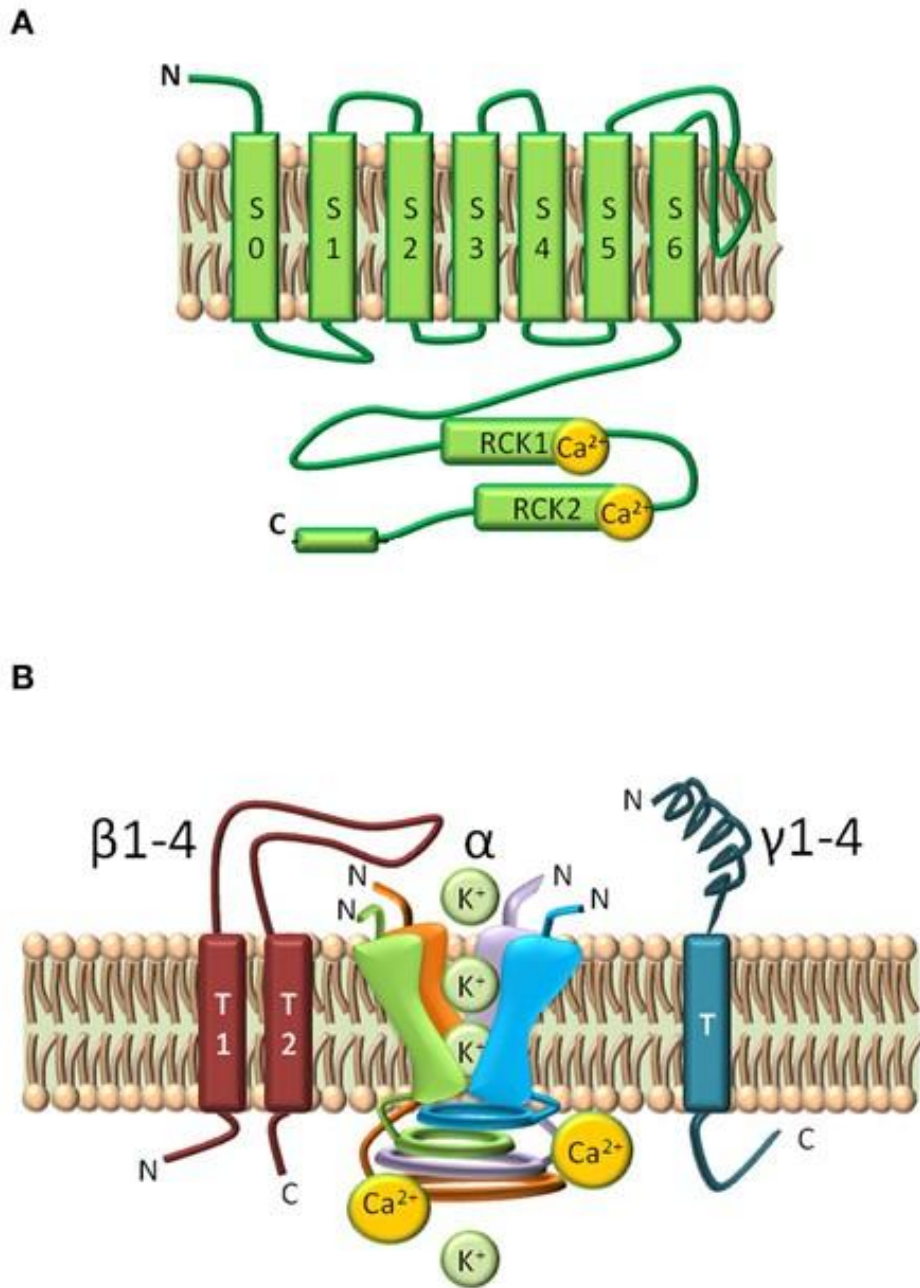


Slika 12. Prikaz spoja endotelne i vaskularne glatke mišićne ćelije i distribucije K kanala tokom vazodilatacije (izvor slike: Sorensen i sar., 2012).

1.5.4.1. BK_{Ca} kanali

BK_{Ca} (K_{Ca}1.1, Slo ili MaxiK) kanali konstruisani su od α subjedinica koje formiraju poru i pomoćnih β ili γ subjedinica. Četiri α subjedinice mogu samostalno da formiraju funkcionalan kanal. Pridružene pomoćne subjedinice deluju kao potentni regulatori većine karakteristika kanala, uključujući voltažnu i Ca²⁺-senzitivnost, kao i senzitivnost prema farmakološkim modulatorima. Svaka α subjedinica se sastoji od sedam transmembranskih domena (S0-S6) sa P-petljom i selektivnim filterom za K⁺ između S5 i S6 domena (Slika 13A). Ono što razlikuje BK_{Ca} kanale od K_v kanala je prisustvo dodatnog transmembranskog (S0) segmenta sa ekstracelularnim N- krajem, kao i prisustvo dugačkog intracelularnog C- kraja koji formira tzv. „rep“ kanala. Dalje, za razliku od K_v kanala, gde je voltažni senzor precizno lokalizovan u S4 domenu, kod BK_{Ca} kanala pozitivno naelektrisane rezidue, odgovorne za voltažnu-zavisnost, manje su centralizovane i prisutne su u S2, S3 i S4 domenima (Tykocki i sar., 2017). Veliki C- kraj BK_{Ca} kanala sadrži dve homologne strukturne jedinice nazvane „regulatori sprovođenja za K⁺“ (engl. *regulators of conductance for K⁺* (RCK)): proksimalni RCK domen (RCK1) i distalni RCK domen (RCK2). Ova dva domena odgovorna su za senzitivnost BK_{Ca} kanala za Ca²⁺ i Mg²⁺. Dok RCK1 domen ima ulogu u formiranju Ca²⁺-vezujućeg mesta, RCK2 sadrži dodatni domen koji veoma visokim afinitetom vezuje jona Ca²⁺, tzv. „Ca²⁺-pehar“ (engl. *Ca²⁺-bowl*) (Zhu i sar., 2018). Četiri para RCK1 i RCK2 domena formiraju Ca²⁺-senzitivni aparat odgovoran za alosternu modifikaciju i aktivaciju BK_{Ca} kanala nakon vezivanja Ca²⁺. Pokazano je da je N- kraj RCK1 domena povezan sa C- krajem S6 transmembranskog domena BK_{Ca} kanala preko S6-RCK1 veze; stoga S6 transmembranski domen igra veoma važnu ulogu u nastanku konformacionih promena BK_{Ca} kanala koje pobuđuje vezivanje Ca²⁺ za RCK1 (Yang i sar., 2010).

BK_{Ca} kanali postoje u praktično svim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. KCNMA1 gen ili *Slo1* gen (skraćeno od *slowpoke*) jedini je gen koji kodira α subjedinice, a njihova fenotipska raznovrsnost se postiže visokim nivoom alternativnog isecanja (engl. *splicing*) egzona. Više od 20 varijanti α subjedinice BK_{Ca} kanala do sada je identifikovano. Izoforme kanala dobijene alternativnim isecanjem pokazuju različite biofizičke osobine, uključujući voltažnu senzitivnost, Ca²⁺-senzitivnost i kinetiku. Osim toga, ove varijacije regulišu usmeravanje BK_{Ca} kanala ka različitim intracelularnim kompartmentima, što sugerise da postoje različiti intracelularni partneri ovih kanala. BK_{Ca} kanali takođe mogu biti meta niza posttranslacionih modifikacija kao što su reakcije oksidoredukcije, glikozilacije i fosforilacije. Na kraju, udruživanje α subjedinica sa različitim regulatornim subjedinicama još više doprinosi povećanju raznovrsnosti ovih kanala (Lee i sar., 2010; Kyle i Braun, 2014).



Slika 13. Struktura BK_{Ca} kanala. α subjedinica (A); pomoćne-regulatorne subjedinice (B) (izvor slike: Balderas i sar., 2015).

Četiri tipa β subjedinica ($\beta 1-4$) i četiri tipa γ subjedinica ($\gamma 1-4$) modulišu skoro sve fiziološke i farmakološke osobine BK_{Ca} kanala. β subjedinice sadrže dva, dok su γ subjedinice izgrađene od jednog transmembranskog domena (Slika 13B). Mehanizam kojim pomoćne subjedinice interreaguju sa α subjedinicama i regulišu aktivnost BK_{Ca} kanala izuzetno je komplikovan, ali je od ključne važnosti za proučavanje i razumevanje nastanka vaskularnih oboljenja. U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama $\beta 1$ subjedinica je dominantna izoforma i njena disfunkcija je povezana sa dijabetesom, hipertenzijom i drugim vaskularnim bolestima. Delecija gena za $\beta 1$ subjedinicu izaziva značajno smanjenje Ca^{2+} -senzitivnosti kanala. Kao pomoćne subjedinice BK_{Ca} kanala, γ subjedinice takođe utiču na njihovu aktivnost modulacijom voltažne i Ca^{2+} -zavisnosti. One imaju ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa, a delecija gena koji ih kodira dovodi do smanjenja aktivnosti funkcionalnih BK_{Ca} kanala i vazokonstrukcije (Nimigeon i Magleby 2002; Zhu i sar., 2018).

Teoretski α subjedinica i regulatorne β ili γ subjedinice BK_{Ca} kanala se nalaze u stehiometrijskom odnosu 1:1. Međutim, istraživanja ukazuju na to da populacija ovih kanala nije homogena i da postoje grupacije BK_{Ca} kanala sa manje od četiri regulatorne subjedinice. Brojni dokazi sugerišu da je stehiometrija subjedinica ovih jonskih kanala dinamična. Tako, na primer, ekspresija $\beta 1$ subjedinica može biti selektivno ushodno ili nishodno regulisana u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, bez odražavanja na ekspresiju α subjedinica. Ovo se dešava pod uticajem raznih fizioloških i patofizioloških stanja, kao i tokom hormonske stimulacije i dovodi do povećane ili smanjene aktivnosti kanala (Amberg i Santana, 2003; Hu i Zhang, 2012).

Pod eksperimentalnim uslovima BK_{Ca} kanali mogu biti aktivirani promenom voltaže u prisustvu ili odsustvu Ca^{2+} . Odavno je poznato da su voltažna i Ca^{2+} zavisnost kanala nezavisne jedna od druge, što znači da obe mogu povećati verovatnoću otvaranja kanala (Pallota, 1985). Aktivacija BK_{Ca} kanala promenom membranskog potencijala nema fiksne vrednosti i više je zavisna od koncentracije Ca^{2+} . U uslovima niske koncentracije Ca^{2+} , BK_{Ca} kanali se ponašaju kao čisti voltažno-zavisni kanali. Iako je, kao što je navedeno, mehanizam voltažne zavisnosti nezavisan od njegovog vezivanja, Ca^{2+} pomera mnoge parametre voltažne zavisnosti ka više negativnim potencijalima i dozvoljava aktivnost kanala pri bazalnom opsegu membranskih potencijala (-60 do -30 mV) u nekontrahovanim ćelijama (Cui i sar., 2009).

U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, BK_{Ca} kanali regulišu membranski potencijal produkcijom izlaznih struja koje nastaju kao odgovor na visoko lokalizovano oslobađanje Ca^{2+} , kroz receptore za rijanodin (RyR) sarkoplazmatskog retikuluma, tzv. Ca^{2+} iskre ili talase (engl. *Ca²⁺ sparks*). Ovakvo povezivanje je moguće samo ako su BK_{Ca} kanali ćelijske membrane i RyR na

sarkoplazmatskom retikulumu u velikoj blizini. Zbog ove blizine, BK_{Ca} kanali su izloženi relativno visokim nivoima Ca²⁺ jona (> 10μM Ca²⁺). Studije su pokazale da blokada RyR, bilo rijanodinom ili deplecijom intracelularnog Ca²⁺ tapsigarginom, redukuje Ca²⁺ iskre i BK_{Ca} struje. Dodatno, influks Ca²⁺ kroz L-Ca kanale takođe stimuliše aktivnost BK_{Ca} (Nelson i sar., 1995; Perez i sar., 1999). Otvaranje BK_{Ca} kanala omogućuje izlazak K⁺ vodeći do hiperpolarizacije membrane. Ova promena membranskog potencijala zatvara L-Ca kanale čime se redukuje koncentracija Ca²⁺ i indukuje vazorelaksacija. Suprotno, zatvaranje BK_{Ca} kanala uzrokuje depolarizaciju membrane koja otvara L-Ca kanale, rezultujući porastom Ca²⁺ i posledično vazokonstrikcijom. Generalno, BK_{Ca} kanali u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama učestvuju u podešavanju V_m, regulaciji vaskularnog tonusa i kompenzatornom mehanizmu amortizovanja vazokonstrikcije (Sorensen i sar., 2012).

Kao dodatak njihovoj voltažnoj i Ca²⁺-zavisnosti, BK_{Ca} kanali su regulisani i fosforilacijom od strane nekoliko kinaza, uključujući PKA, PKG, PKC i c-Src-kinaze. Nekoliko mesta za fosforilaciju je identifikovano na citoplazmatskom domenu α subjediniče, a nastala fosforilacija može dovesti do izmenjene voltažne i/ili Ca²⁺-senzitivnosti i povećanja ili smanjenja aktivnosti kanala. Generalno, u većini istraživanja je pokazano da aktivnost BK_{Ca} kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama stimulišu PKA i PKG, a inhibišu PKC i c-Src. Međutim, u zavisnosti od izoforme α subjediniče ovih kanala, kinaze mogu ispoljavati i obrnute efekte. Tako, na primer, aktivacija PKC povećava aktivnost BK_{Ca} kanala u pulmonalnim arterijama pacova (Yan i sar., 2008; Ko i sar., 2010).

BK_{Ca} kanali takođe takođe predstavljaju važne mete u mehanizmu dejstva raznih vazokonstriktora i vazodilatatora. Generalno, vazodilatatori aktiviraju ove kanale, dok ih vazokonstriktori inhibiraju. Adenozin i β -adrenergički agonisti aktiviraju BK_{Ca} kanale preko cAMP-zavisnih i c-GMP-zavisnih puteva. Posebno u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, povišeni nivo cGMP-a i aktivacija PKG sa NO, rezultira fosforilacijom BK_{Ca} kanala i njihovom posledičnom aktivacijom. Sa druge strane, angiotenzin II i endotelin-1 inhibiraju BK_{Ca} kanale u koronarnim arterijama PKC-nezavisnim mehanizmima (Carvalho de Souza i sar., 2013).

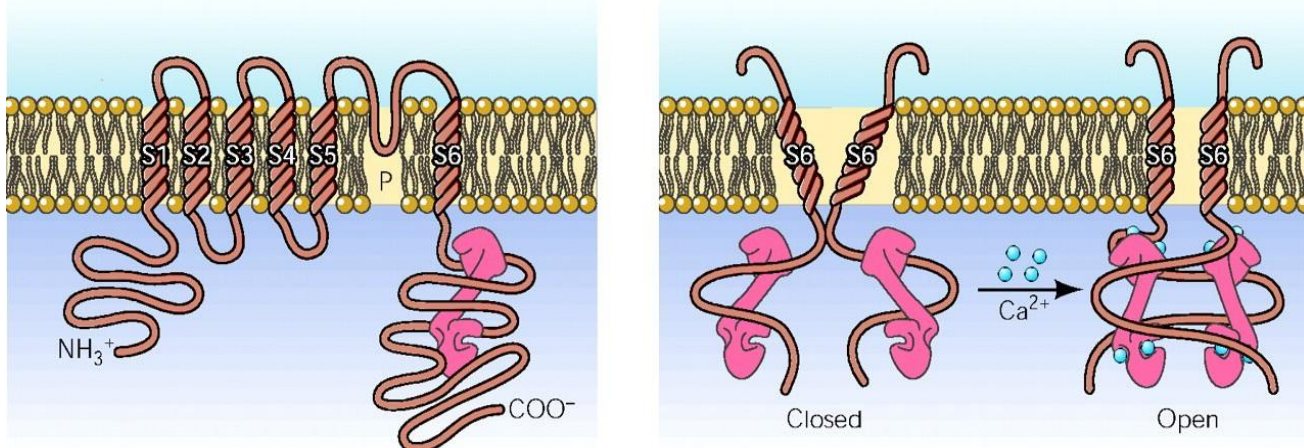
Farmakologija BK_{Ca} kanala ograničena je na potentnu blokadu sa TEA i serijom alkaloida, uključujući paksilin, kao i na efikasniju specifičnu inhibiciju sa nekoliko škorpionskih toksina, poput iberiotoksina i karibdotoksina. Iako ova jedinjenja nemaju čist terapijski potencijal, ona (posebno iberiotoksin) su vrlo korisna sredstva za proučavanje funkcije ovih kanala. Na BK_{Ca} kanale ne deluju glibenklamid, Ba²⁺ i apamin, koji blokira SK_{Ca} kanale. Nekoliko malomolekulskih otvarača BK_{Ca} kanala je otkriveno i za nativne i za klonirane kanale. Na primer, benzoimidazol NS-1619 aktivira BK_{Ca} kanale, ali njegovi funkcionalni efekti takođe uključuju i inhibiciju Ca²⁺ struja i

K_v kanala (Gribkoff i sar., 1997). I brojne druge supstance mogu da modulišu aktivnost BK_{Ca} kanala. Estrogen se u visokoj mikromolarnoj koncentraciji vezuje za BK_{Ca} kanal, primarno za $\beta 1$ subjedinicu, i direktno reguliše ekspresiju kanala, kao i njegovu funkciju. Proteini hema i reaktivne vrste kiseonika su dokazani modulatori ovih kanala, pošto i jedni i drugi inhibiraju njihovu aktivnost u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama delujući na α subjedinicu. Etanol takođe inhibira BK_{Ca} aktivnost u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama dovodeći da porasta vazokonstrikcije (Dick i Sanders, 2001; Dopico, 2003).

1.5.4.2. SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali

Druga grupa Ca-zavisnih K kanala, SK/IK ($K_{Ca2.x/3.1}$) grupa, sadrži tri izoforme kanala sa malom provodljivošću i to $K_{Ca2.1}$ (SK1), $K_{Ca2.2}$ (SK2) i $K_{Ca2.3}$ (SK3), kao i jedan kanal sa intermedijarnom provodljivošću $K_{Ca3.1}$ (SK4/IK). Nedostatak voltažne zavisnosti dozvoljava ovim kanalima da ostanu u otvorenom stanju pri negativnijim membranskim potencijalima nego K_v i BK_{Ca} kanali. Posledično, ovi kanali mogu hiperpolarizovati membranu pri vrednostima bliskim ekvilibrijumskom potencijalu od -89 mV (Wulff i Kohler, 2013). Model ekspresije ovih kanala je dosta različit u odnosu na BK_{Ca} kanale. Oni su prisutni u neuronima, endotelu, epitelu i u nekoliko tipova glatkih mišića (npr. u urinarnom traktu) ali ne i u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. Jedini izuzetak predstavlja IK_{Ca} kanal, koji je pronađen u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, ali samo kada su miociti u proliferativnom stanju. Dok su svi $K_{Ca2.x}$ i $K_{Ca3.1}$ kanali prisutni u nervnom tkivu, samo $K_{Ca2.3}$ i $K_{Ca3.1}$ postoje u vaskulaturi, gde ostvaruju svoje uloge u regulaciji vaskularnog tonusa (Neylon i sar., 1999).

Funkcionalan kanal rezultat je udruživanja četiri subjedinice, od kojih svaka sadrži šest transmembranskih domena (S1-S6) sa intracelularnim N- i C- krajevima. Region koji učestvuje u formiranju pore (S5-S6) je jedini homologan sa drugim familijama K kanala. Interesantno, ovoj familiji kanala nedostaje voltažna zavisnost uprkos postojanju nekoliko pozitivno naelektrisanih aminokiselina u četvrtom transmembranskom domenu. Odsustvo Ca^{2+} -pehara upućuje i na nedostatak Ca^{2+} zavisnosti. Ipak, $K_{Ca2.x}$ kanali konstitutivno su povezani sa kalmodulinom, koji deluje kao Ca^{2+} senzitivna subjedinica i izaziva Ca^{2+} -zavisno otvaranje kanala. $K_{Ca3.1}$ kanali takođe su konstitutivno vezani sa kalmodulin. Stoga, otvaranje ovih kanala je nezavisno od potencijala membrane, ali striktno zavisi od Ca^{2+} . Vezivanje Ca^{2+} za kalmodulin indukuje konformacionu promenu kompleksa kanal-kalmodulin, uključujući preplitanje citoplazmatskih petlji što dovodi do otvaranja pore kanala (Slika 14) (Ledoux i sar., 2006).



Slika 14. Struktura i aktivacija SK_{Ca} kanala (izvor slike: Ledoux i sar., 2006).

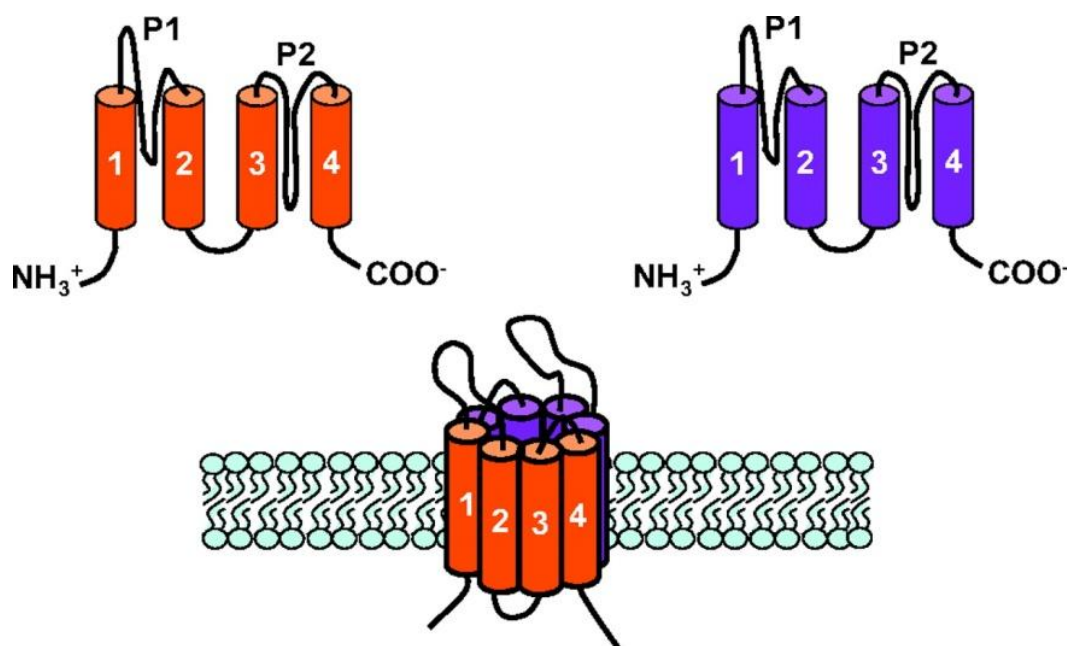
Farmakološki, SK_{Ca} kanali su visoko senzitivni na otrov pčele apamin sa različitim afinitetom za sve tri izoforme kanala: SK2 kanali su najsenzitivniji, a SK1 najmanje. Scilatoksin i ostala jedinjenja poput bikukulina, dekvalinijuma i njegovog potentnijeg derivata UCL1684 su, takođe, potentni inhibitori ove grupe kanala. Premda su IK_{Ca} kanali nesenzitivni na ove peptide i molekule, druga jedinjenja inhibiraju ove kanale, bez uticaja na SK_{Ca} subfamiliju. Na primer, IK_{Ca} struju smanjuje toksin škorpiona karibdotoksin, koji takođe inhibira BK_{Ca} kanale. Druga jedinjenja, kao klotrimazol i TRAM-34, su specifičniji inhibitori IK_{Ca} kanala. Oba tipa kanala stimulišu hlorsazonski, zoksazolamin, neuroprotektivni lek rituzol, 1-EBIO, njegov potentniji derivat DC-EBIO i skorije otkriveni NS-309. Ipak, ovi aktivatori ne mogu u potpunosti da zamene potrebe za Ca²⁺ zavisnu aktivaciju kanala. Štaviše, porast senzitivnosti kanala za Ca²⁺ je pretpostavljen mehanizam njihovog delovanja (Kažić i Gojković-Bukarica, 1999; Feletou, 2009).

Koekspresija SK_{Ca3} i IK_{Ca} kanala u endotelnim ćelijama je inicijalno shvatana kao beznačajna, ali je rastući broj dokaza pokazao da su ova dva tipa kanala lokalizovana u specijalnim, različitim mikrodomenima i da učestvuju u različitim signalnim putevima (Edwards i sar., 2010). Dok su SK_{Ca3} pronađeni u interendotelnim spojevima i nalaze se u blizini TRPC, IK_{Ca} kanali su predominantno lokalizovani u mioendotelnim spojevima gde oslobađanje Ca²⁺ kroz IP₃ receptore reguliše njihovu funkciju. Uprkos različitoj intracelularnoj lokalizaciji i različitim signalnim putevima, aktivacija SK_{Ca3} i IK_{Ca} kanala inicira hiperpolarizaciju, njeno širenje na vaskularne glatke mišićne ćelije, zatvaranje L-Ca kanala i posledičnu vazodilataciju, što čini važnu komponentu EDH u brojnim vaskularnim odeljcima (Werner i Ledoux, 2014).

1.5.5. K_{2P} kanali

K kanali sa dve pore su prvo opisani na kvascu 1995. godine, a zatim su otkriveni njihovi humani homolozi. Svaka subjedinica K_{2P} kanala se sastoji od dva regiona koji učestvuju u formiranju pore (P1 i P2, odatle njihovo ime) i od 4 transmembranska domena (M1-M4). Funkcionalni kanali su građeni kao dimeri ovih subjedinica koje formiraju jednu poru selektivno propustljivu za kalijum (Slika 15) (Mathie i sar., 2010). Postoji 15 članova K_{2P} familije kanala (Tabela 5). Pozadinske (engl. *leak*) K⁺ struje regulišu mirovni membranski potencijal i ekscitabilnost mnogih ćelija sisara. K_{2P} kanali su otvoreni pri fiziološkom, mirovnom potencijalu i ostvaruju ključnu ulogu u kontroli i stabilizaciji mirovnog membranskog potencijala i volumena ćelije. To su voltažno-nezavisni kanali koji u fiziološkim uslovima (visoka koncentracija K⁺ u citoplazmi, a niska ekstracelularno) sprovode K⁺ jone iz ćelije u ekstracelularni prostor (Enyedi i Czirjak, 2010).

Aktivnost K_{2P} kanala je regulisana širokim spektrom faktora koji menjaju verovatnoću otvaranja kanala. Najvažniji od njih su hemijski stimulusi kao što je pH ravnoteža, zatim mehanički stimulusi, fosfolipidi i polinezasićene masne kiseline. K_{2P} kanali imaju važne uloge u mnogim fiziološkim procesima uključujući neuroprotekciju, cerebrovaskularnu vazodilataciju, regulaciju produkcije i sekrecije aldosterona, depresiju, hemorepciju i pulmonalnu vazokonstrikciju (Gurney i Manoury, 2009). Senzitivnost K_{2P} kanala prema različitim stimulusima varira u zavisnosti od njihove klase (Tabela 5).



Slika 15. Struktura K_{2P} kanala (izvor slike: <http://hyper.ahajournals.org/>).

Tabela 5. Podtipovi, aktivatori i inhibitori K_{2P} kanala

4TMD familija	Drugi naziv	Aktivatori	Inhibitori
$K_{2P}1.1$	TWIK1	-	-
$K_{2P}2.1$	TREK1	arahidonska kiselina, halotan, hloroform, izofluran, rastezanje membrane, toplota, kiseli pH	norfluoksetin
$K_{2P}3.1$	TASK1	halotan	metanandamid, anandamid, kiseli pH
$K_{2P}4.1$	TRAAK	arahidonska kiselina, riluzol, rastezanje membrane, toplota	-
$K_{2P}5.1$	TASK2	-	-
$K_{2P}6.1$	TWIK2	-	-
$K_{2P}7.1$	-	-	-
$K_{2P}9.1$	TASK3	halotan	metanandamid, anandamid
$K_{2P}10.1$	TREK2	arahidonska kiselina, halotan, rastezanje membrane	-
$K_{2P}12.1$	THIK2	-	-
$K_{2P}13.1$	THIK1	-	halotan
$K_{2P}15.1$	TASK5	-	-
$K_{2P}16.1$	TALK1	alkalni pH	-
$K_{2P}17.1$	TALK2	alkalni pH	-
$K_{2P}18.1$	TRESK	-	arahidonska kiselina

Deset od 15 članova K_{2P} kanala identifikovano je na vaskularnim ćelijama. Brojne studije su pokazale da su K_{2P} kanali prisutni u nekoliko vaskularnih odeljaka, uključujući cerebralne, mezenterične i pulmonalne vaskularne glatke mišićne ćelije. Interesantno, za K_{2P} kanale se pretpostavlja da imaju važnu ulogu u hipoksičnoj vazokonstrikciji pulmonalne vaskulature. Dok hipoksija generalno izaziva vazodilataciju u većini vaskularnih odeljaka, nizak parcijalni pritisak kiseonika povezuje se sa vazokonstrikcijom u pulmonalnim arterijama. Ispitivanje ekspresije i farmakoloških osobina TASK1 kanala na humanim pulmonalnim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama potvrdilo je da je hipoksija umereni blokator ovih kanala (Gardener i sar., 2004; Werner i Ledoux, 2014). TREK1 kanali su veoma prisutni u glatkom mišiću i endotelu bazilarnih arterija i esencijalni su za modulaciju cerebrovaskularnog tonusa. K_{2P} kanali senzitivni na arahidonsku kiselinu su lokalizovani u endotelnim ćelijama arterija gde ostvaruju važne uloge u regulaciji vaskularnog tonusa (Szuts i sar., 2012).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Da se ispita da li se ekspresija vaskularnih K kanala humanih umbilikalnih vena zdravih porodilja razlikuje u odnosu na humane umbilikalne vene porodilja sa gestacijskim dijabetesom i hipertenzijom primenom molekularnih tehnika
2. Da se ispita da li postoji razlika u efikasnosti i potentnosti pinacidila da izazove vazodilataciju prekontrahovanih venskih segmenta zdravih porodilja i porodilja sa gestacijskim dijabetesom i hipertenzijom
3. Da se definišu tipovi K kanala uključeni u vazodilatatorne efekte pinacidila na izolovanim humanim umbilikalnim venama zdravih porodilja i porodilja sa gestacijskim dijabetesom i hipertenzijom primenom različitih blokatora K kanala
4. Da se utvrdi da li pinacidil ima dejstva nezavisna od aktivacije membranskih K kanala vaskularnih glatkih mišićnih ćelija u sva tri eksperimentalna modela

3.2. Klinički uzorci, rukovanje i upravljanje tkivom

Segmenti pupčanika isecani su iz njegovog medijalnog dela neposredno posle porođaja, zatim stavljeni u male boce sa hladnim Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom i transportovani u laboratoriju gde su čuvani na temperaturi od 4°C manje od 24 časa (Radenković i sar., 2007). Nakon preparacije i izolacije humanih umbilikalnih vena, venski segmenti su bili čuvani u 10% formaldehidu za imunohistohemijsko bojenje, zamrzavani na -70°C za Western blot analizu ili montirani u kupatilo za izolovane organe u cilju sprovođenja farmakoloških eksperimenata.

3.3. Molekularna analiza subjedinica K kanala

3.3.1. Western blot analiza

Uzorci tkiva humane umbilikalne vene bili su homogenizovani na ledu u modifikovanom RIPA puferu sa proteaznim i fosfatnim inhibitorima. Nakon toga su centrifugirani pod opterećenjem od 15000 x g, na temperaturi od 4°C, tokom 30 minuta. BCA metod primenjen je da bi se odredila koncentracija proteina. Dobijeni supernatanti korišćeni su kao ćelijski lizati za Western blot analizu, nakon ključanja u Lemlijevom puferu. Proteini su odvojeni elektroforezom i premešteni su na poliviniliden difluoridne (PVDF) membrane blokirane sa 5% mlekom u prahu i 0.1% *Tween 20*, na sobnoj temperaturi, tokom 1 sata. Membrane su onda inkubirane sa pojedinačnim primarnim antitelima preko noći na 4°C. Za detekciju subjedinica K kanala korišćena su sledeća primarna antitela: K_v1.2, K_v1.3, BK- α , Kir6.1 i SUR2B (Santa Cruz Biotechnology, USA). Nakon toga membrane su isprane i inkubirane sa sekundarnim antizečjim ili antikožjim HRP konjugovanim antitelima, 1.5 sat na sobnoj temperaturi. Postupak ispiranja je još jednom ponovljen, a na membrane je naneto specifično antitelo za β -aktin, u odnosu na koga je izvršena kvantifikacija subjedinica K kanala. Za kvantitativnu analizu korišćen je ImageJ softver (Bundalo i sar., 2015).

3.3.2. Imunohistohemija

Tkivo humane umbilikalne vene je nakon izolovanja fiksirano u formaldehidu, ukalupljeno u parafinu, a zatim je sečeno na preseke debljine oko 5 μm . Svi preseki su deparafinirani i rehidrirani kroz rastvore sa opadajućim koncentracijama alkohola do destilovane vode i nakon toga zagrevani 30 minuta u Tris-EDTA puferu na pH 9.0 u cilju demaskiranja antigena. Nakon hlađenja, preseki su ispirani TBS (*Tris-buffered saline*) puferom i inkubirani preko noći sa istim antitelima korišćenim u Western blot metodi, pri razblaženju 1:50. Nakon toga, preseki su tretirani koristeći komercijalni *UltraVision/DAB* kit za bojenje (Thermo Scientific Lab Vision TL-060-HD) u slučaju zečjih i mišjih primarnih antitela, odnosno komercijalnim *ImmunoCruz™ goat ABC* sistemom (sc-2023, Santa Cruz Biotechnology) u slučaju kozjih antitela. Imunoreakcije su vizualizovane korišćenjem DAB-a (3.3-diaminobenzedin tetrahidrohlorid dihidrat) kao supstrata tokom 10 minuta i kontrastirane hematoksilinom tokom 10 sekundi. Negativne kontrole dobijene su izostavljanjem primarnog antitela. Svi preseki su analizirani na mikroskopu Olympus BX 41 i fotografisani OlympusC-5060 digitalnom kamerom (Rakocevic i sar., 2016).

Intenzitet i distribucija pozitivnog bojenja ocenjivani su od strane iskusnog istraživača, koji nije imao uvid u eksperimentalne grupe, koristeći dva sistema skoriranja. Prvi sistem je originalno predložio Fisher, a modifikovan je od strane Adamsa (Fisher i sar., 1994; Adams i sar., 1999). Ovaj sistem prikazan je u Tabeli 6 i objedinjuje oba faktora, intenzitet i distribuciju pozitivnog bojenja, u jedan skor (Adams i sar., 1999). Drugi sistem, standardna skala za ocenu intenziteta pozitivnog bojenja, svrstavala je preseke u jednu od 4 grupe: negativni, +, ++, ili +++.

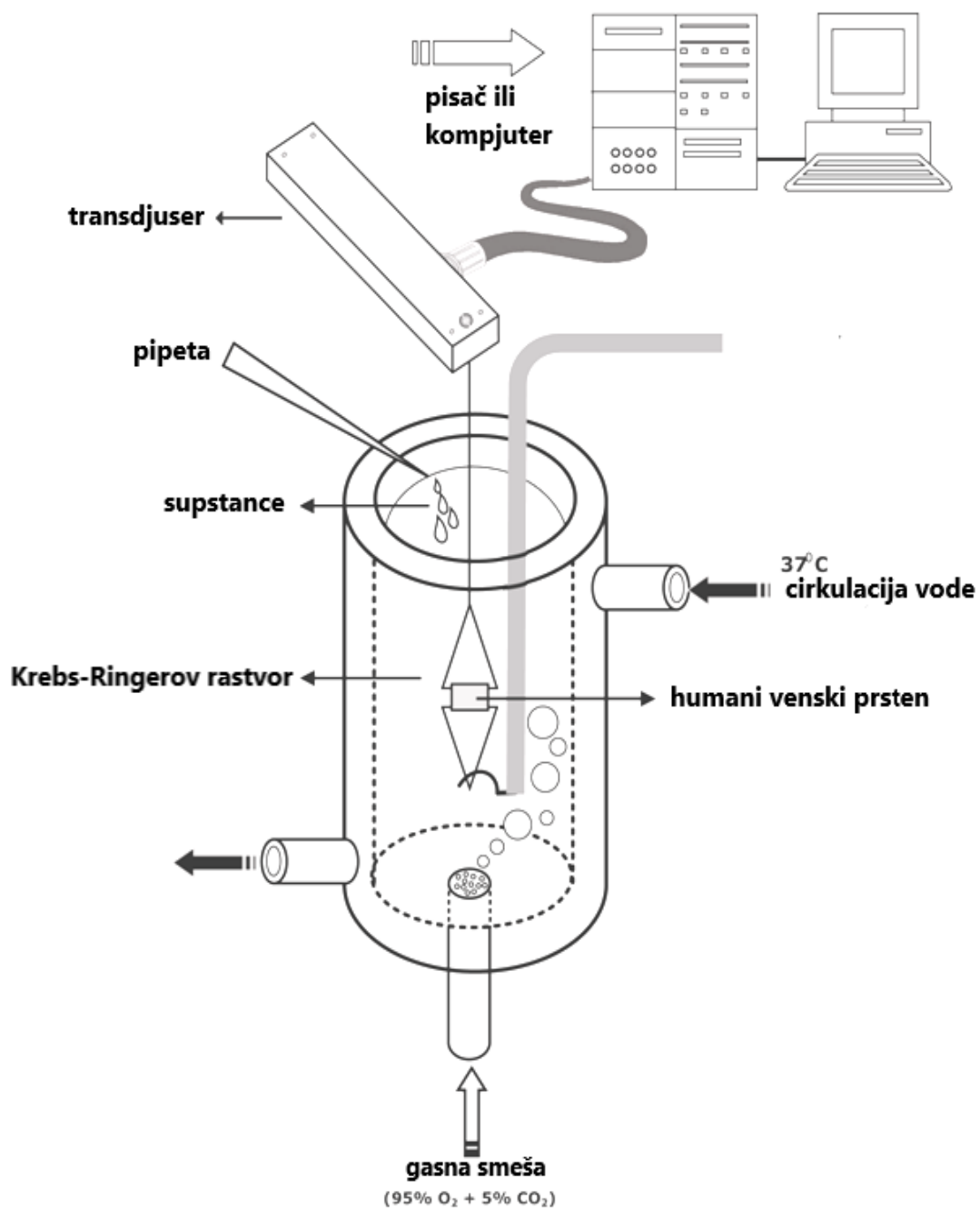
Tabela 6. Imunocitohemijski sistem skoriranja subjedinica K kanala (adaptirano iz: Adams i sar., 1999)

Imunohistohemijsko bojenje subjedinica K kanala	
Jako	Tamno lako uočljivo membransko bojenje koje uključuje > 50% ćelija
Umereno	Fokalne tamno obojene zone u < 50% ćelija, ili umereno membransko bojenje u > 50% ćelija
Slabo	Fokalno umereno bojenje u < 50% ćelija, ili blede membransko bojenje u bilo kom procentu ćelija koje nije lako uočljivo
Rasuto	Tamno membransko bojenje u široko rasutim ćelijama
Negativno	Glatko mišićno tkivo koje ne pokazuje ništa iznad navedeno

3.4. Ispitivanje vazorelaksantnog dejstva pinacidila

Kupatilo za izolovane organe klasični je farmakološki metod koji se koristi više od 100 godina za procenjivanje izometrijske tenzije kontraktilnih tkiva i odnosa koncentracije i efekta. Ovaj metod opisan je u potpunosti u mnoštvu radova (Jespersen i sar., 2015). U ovom istraživanju, segmenti humanih umbilikalnih vena sečeni su na prstenove dužine oko 5 mm, nakon što su prethodno pažljivo izolovani iz pupčanika i očišćeni od Vartonove pihtije. Mehanička deendotelizacija venskih segmenata izvršena je nežno pomoću čelične žice. U sledećem koraku, kroz lumen svakog prstena provučena su dva trougla od nerđajućeg čelika i prstenovi su smešteni u kupatilo za izolovane organe (10 ml) sa Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom (pH 7.4), oksigenisanim mešavinom 95% O₂ i 5% CO₂, na temperaturi od 37°C. Gornji od trouglova bio je preko tankog konca povezan sa transdjuserom (K30, Hugo Sachs, Freiburg, Germany), a donji za staklenu cevčicu na dnu kupatila. Promene u izometrijskoj tenziji, registrovane pomoću transdjusera, beležene su na multikanalni pisač (R60; Rikadenki, Tokyo). Uz to, za registrovanje kontrakcija korišćen je i kompjuterski program *IsoLab* (Elunit, Beograd, Srbija) (Slika 17).

Svi preparati ekvilibrisani su 60 minuta i ispirani na svakih 15 minuta unutar ovog vremenskog perioda. Potom su progresivno istezani do optimalne tenzije od 2 g (Stojnić i sar., 2007; Protić i sar., 2015). Venski prstenovi su onda kontrahovani serotoninom (100 µM). Acetilholin (20 µM) je dodavan u kupatilo u cilju procene funkcije endotela. Izostanak vazorelaksacije posle dodavanja acetilholina smatran je znakom odsustva funkcionalnog endotela. Na ovaj način mogućnost pogrešne interpretacije rezultata pod uticajem endotelnih faktora je isključena (Gojkovic-Bukarica i sar., 2011).



Slika 17. Registrovanje izometrijskih kontrakcija humane umbilikalne vene u kupatilu za izolovane organe (adaptirano iz: Yildiz i sar., 2013).

Da bi se ispitale vazodilatatorne osobine pinacidila, segmenti vena bez endotela prekontrahovani su serotoninom (100 μM). Nakon uspostavljanja stabilnog platoa, rastuće koncentracije pinacidila (0.1 – 1000 μM) dodavane su u kupatilo na kumulativan način i koncentracijski-zavisne krive su dobijene. Ovako dobijene krive korišćene su kao kontrole. U cilju ispitivanja doprinosa određenih podtipova K kanala u vazorelaksaciji izazvanoj pinacidilom, različiti nespecifični i specifični blokatori K kanala dodavani su u kupatilo, 20 minuta pre kontrakcije venskog segmenta serotoninom. Za testiranje uloge K_{ATP} kanala korišćen je njihov specifični blokator glibenklamid (GLB, 10 μM). Za proveru umešanosti drugih tipova K kanala u vazorelaksaciji izazvanoj pinacidilom korišćeni su sledeći antagonisti: 4-AP (1 mM) – neselektivni antagonista K_v kanala; margatoksin (30 nM) – specifični antagonista $K_v1.2$ i $K_v1.3$ kanala; friksotoksin (12.5 nM) – specifični antagonista $K_v4.2$ i $K_v4.3$ kanala. Iberiotoksin (100 nM) je korišćen kao selektivni antagonista BK_{Ca} kanala. Poređenjem kontrolnih kriva sa krivama dobijenim u prisustvu blokatora, doprinos različitih kanala u vazodilataciji izazvanoj pinacidilom bio je potvrđen ili opovrgnut.

U posebnoj seriji eksperimenata, druga kontrakcija prouzrokovana je rastvorom visoke koncentracije K^+ (100 mM K^+) da bi se blokirali efekti aktivacije K kanala. Pinacidil je dodavan na isti način kao u prethodnim eksperimentima, a dobijene koncentracijski-zavisne krive imale su svrhu da se ispita postojanje mehanizama dejstva pinacidila nezavisnih od K^+ jona i njihovih potencijalnih alteracija u patološkim trudnoćama.

Papaverin (100 μM) je korišćen kao opšti vazodilatator na kraju svakog eksperimenta da bi se odredila maksimalna moguća relaksacija krvnog suda.

3.5. Supstance i rastvori

Supstance korišćene u eksperimentima bile su: pinacidil, serotonin, papaverin, kalijum-hlorid, glibenklamid, 4-aminopiridin, iberiotoksin, margatoksin i friksotoksin (Sigma – Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Pinacidil je bio rastvaran u 0.01 N HCL, a dalja razblaženja pravljena su neposredno pre upotrebe, u destilovanoj vodi. Glibenklamid je bio rastvaran u 96% v/v etanolu, dok su sve ostale supstance bile rastvarane u destilovanoj vodi.

Koristio se Krebs-Ringerov bikarbonatni rastvor sledećeg sastava (mmol/l): 120 NaCl, 5 KCl, 1.2 MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 1.2 KH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 i 11 glukoze (pH 7.4). Depolarišući rastvor KCl pravio se ekvimolarnom zamenom Na^+ sa K^+ u željenoj koncentraciji (mmol/l): 45 NaCl, 100 KCl, 1.2 MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 1.2 KH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 i 11 glukoze.

Sve supstance su dodavane direktno u kupatilo i koncentracije navedene u radu predstavljaju izračunate finalne koncentracije supstanci u rastvoru kupatila.

3.6. Statistika

Analiza podataka urađena je pomoću programa Sigma Plot (Systat Software Inc., San Jose, CA). Ukoliko nije naznačeno da je drugačije, rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm srednja standardna greška (S.E.M.); n = broj eksperimenata.

Koncentracija pinacidila koja izaziva 50% maksimalnog odgovora (EC_{50}) računata je za svaku krivu koristeći regresionu analizu i izražena je kao pD_2 vrednost ($pD_2 = -\log EC_{50}$). „Senzitivnost“ je određena pomoću pD_2 vrednosti i opisuje položaj koncentracijski zavisne krive. E_{max} opisuje maksimum relaksacije izazvane pinacidilom i računata je u odnosu na efekat papaverina koji je predstavljao 100%. Za ispitivanje razlika između srednjih vrednosti korišćen je Studentov t -test; P vrednost < 0.05 smatrana je statistički značajnom (Stojnić i sar., 2007).

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike pacijentkinja

Ukupno 72 žene bile su uključene u istraživanje. Njih 40 je bilo zdravo, 16 je imalo GDM i 16 PIH. Sociodemografske i kliničke karakteristike pacijentkinja, kao i terapija tokom trudnoće prikazani su u Tabeli 7. Razlike između grupa pacijentkinja u starosti, načinu začeća, načinu porođaja i pušačkom statusu nisu bile statistički značajne. Gestacioni period kod hipertenzivnih porodilja bio je signifikantno kraći u poređenju sa normotenzivnim.

Tabela 7. Sociodemografske i kliničke karakteristike pacijentkinja

Karakteristike pacijentkinja	NT	GDM	PIH
Starost (godine \pm SD)	31.8 \pm 4.8	33.9 \pm 6.1	31.8 \pm 7.2
Period gestacije (nedelja \pm SD)	39.5 \pm 1.1	39.7 \pm 0.6	37.4 \pm 3.0*
Carski rez	12 (30%)	4 (25%)	8 (50%)
IVF	6 (15%)	1 (6.3%)	3 (18.8%)
Pušački status	4 (10%)	5 (31.3%)	2 (12.5%)

NT – normalna trudnoća; GDM – gestacijski dijabetes melitus; PIH – trudnoćom izazvana hipertenzija; IVF – in vitro fertilizacija; *P < 0.05 u poređenju sa NT.

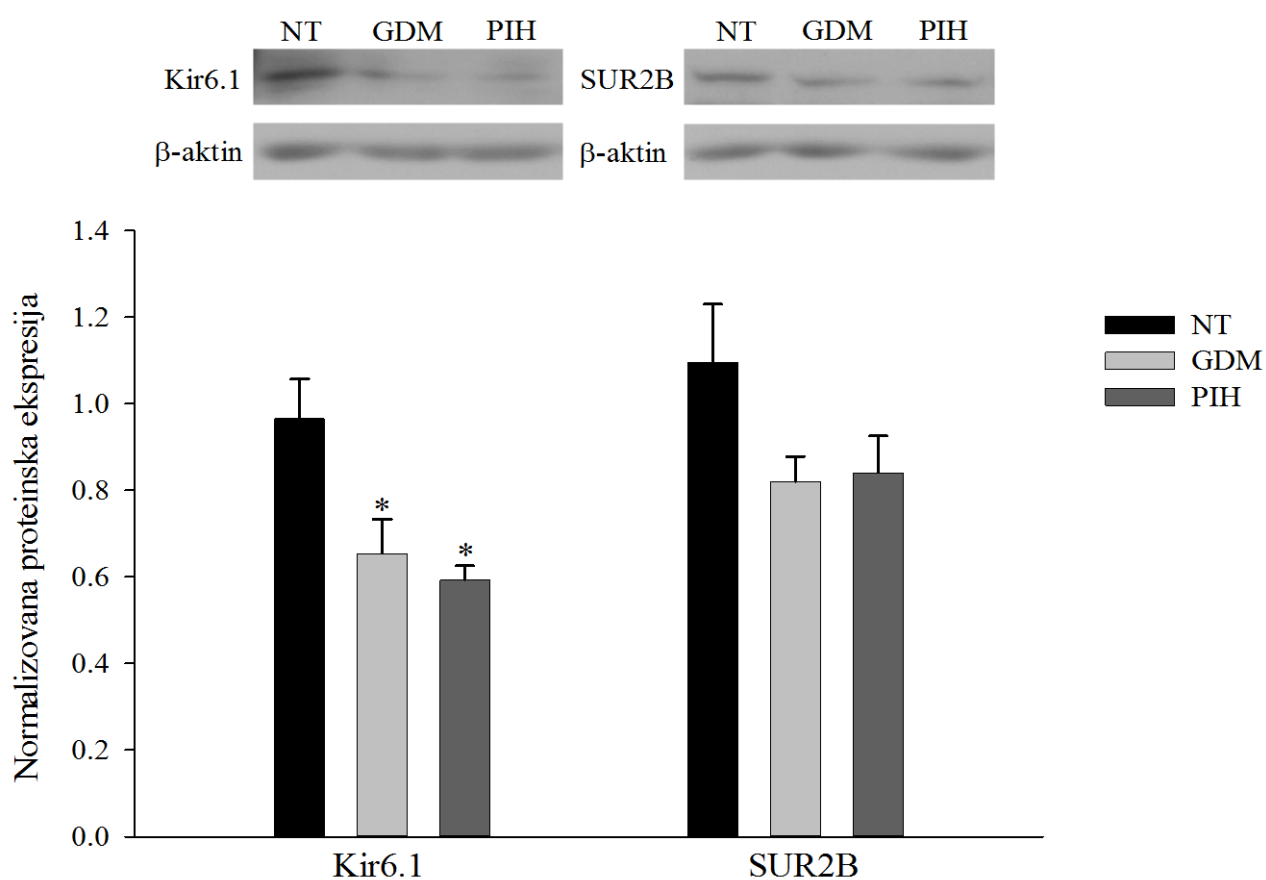
Sve žene sa gestacijskim dijabetesom bile su na dijeti, 2 (12.5%) od njih koristile su insulin. Sve pacijentkinje sa hipertenzijom lečene su metildopom, 9 (56.3%) od njih dodatno je koristilo i blokatore kalcijumskih kanala (nifedipin, amlodipin i/ili verapamil). Sedam hipertenzivnih trudnica (43.8%) dobijalo je tokom trudnoće diazepam (Bensedin), a samo jedna magnezijum sulfat. Ostali sporadično korišćeni lekovi tokom trudnoće u svim eksperimentalnim grupama bili su progesteron (Utrogestan), levotiroksin (Euthyrox) i nadroparin-kalcijum (Fraxiparine).

Tokom porođaja korišćen je oksitocin (Sintocinon) kod 23 (57.5%) zdravih, 6 (37.5%) dijabetičnih i 8 (50%) hipertenzivnih trudnoća. Epiduralna anestezija je primenjena kod 4 (10%) zdrave, 4 (25%) dijabetične i 2 (12.5%) hipertenzivne trudnice. Hioscin-butilbromid (Buscopan) je u vreme porođaja korišćen kod 2 zdrave (5%), 2 dijabetične (12.5%) i 2 (12.5%) hipertenzivne porodilje.

4.2. Molekularna analiza subjedinica K kanala

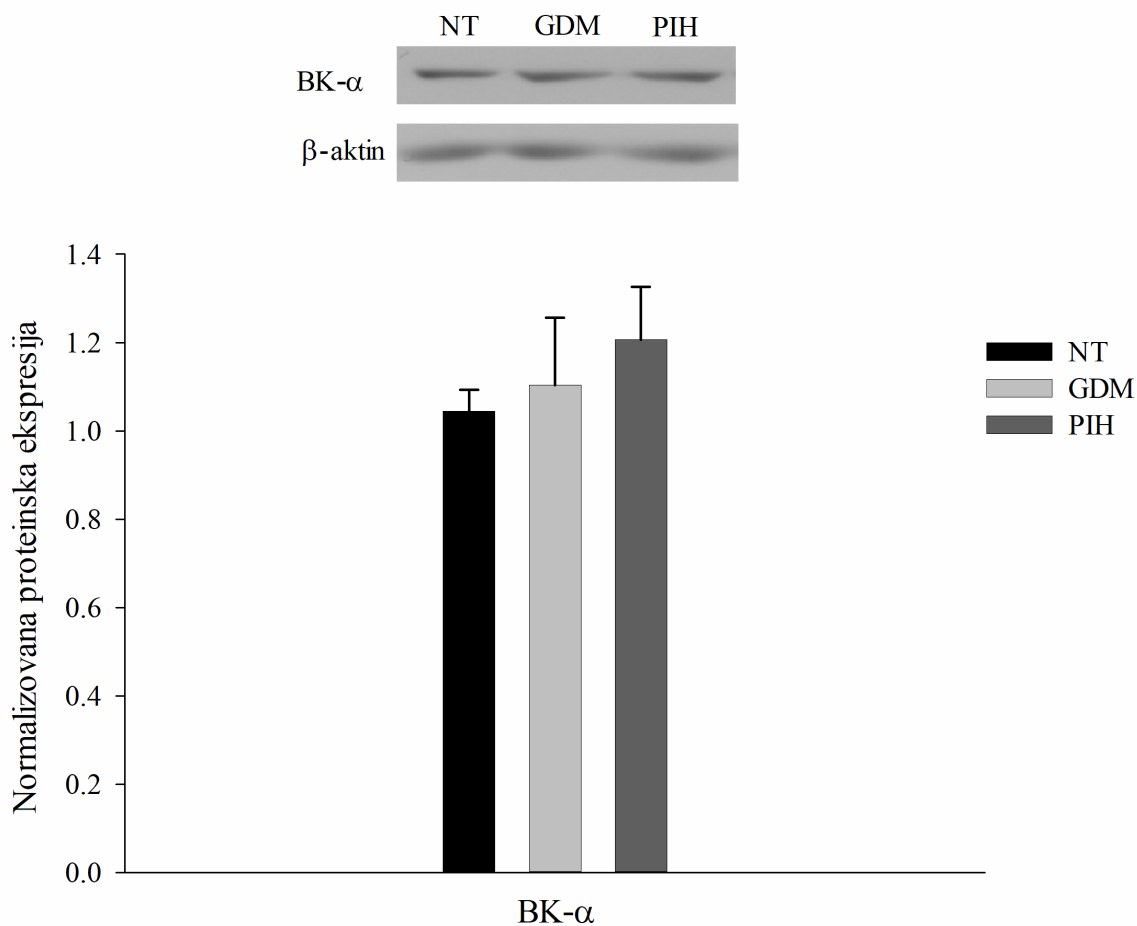
4.2.1. Western blot analiza

Western blot metodom detektovana je statistički značajno smanjena ekspresija Kir6.1 subjedinice K_{ATP} kanala u oba patološka stanja u poređenju sa normalnom trudnoćom ($P < 0.05$, Slika 18). Ekspresija SUR2B subjedinica nije se značajno razlikovala među grupama (Slika 18).



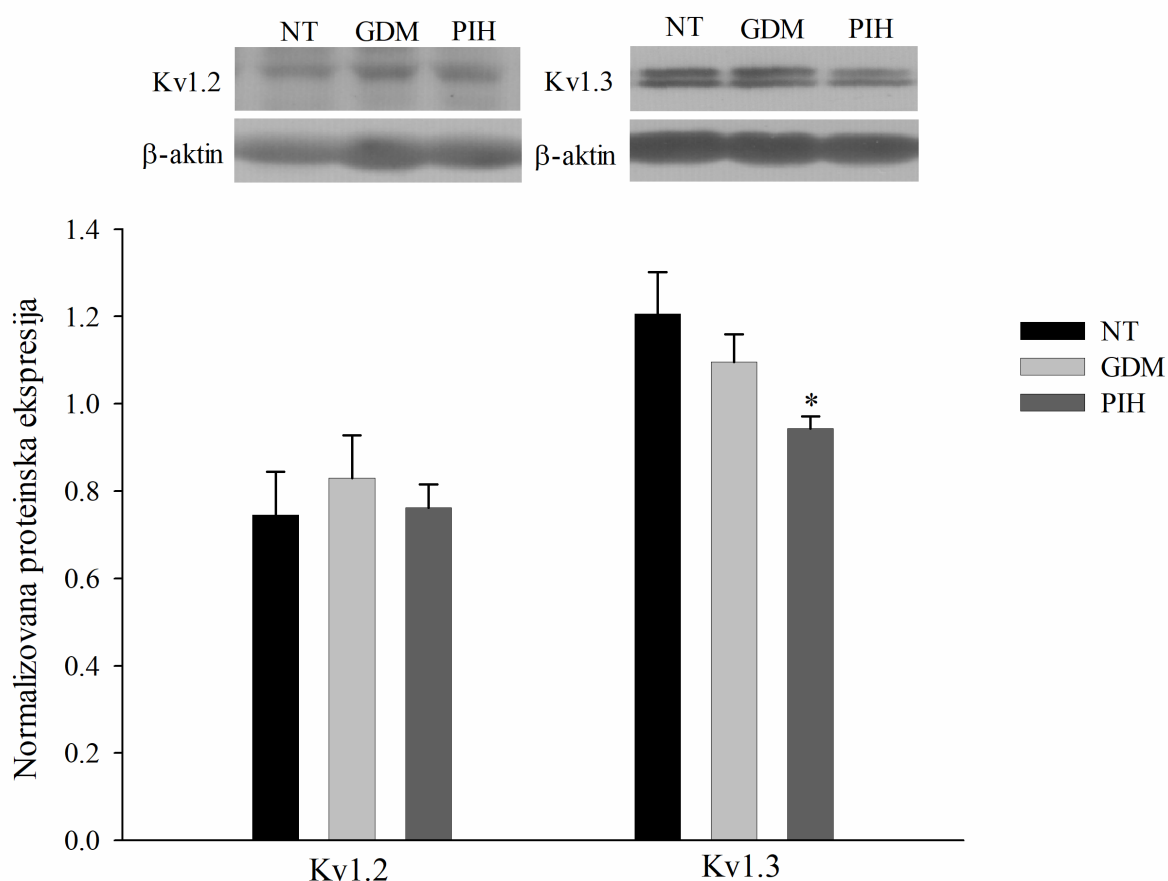
Slika 18. Ekspresija Kir6.1 i SUR2B subjedinica K_{ATP} kanala na glatkim mišićnim ćelijama humanih umbilikalnih vena poreklom od normalne trudnoće (NT, $n = 6$), gestacijskog dijabetesa melitusa (GDM, $n = 6$) i trudnoćom izazvane hipertenzije (PIH, $n = 6$). * $P < 0.05$ u odnosu na NT.

Ekspresija BK- α subjedinica BK_{Ca} kanala nije bila statistički značajno različita između grupa (Slika 19).



Slika 19. Ekspresija BK- α subjedinica BK_{Ca} kanala na glatkim mišićnim ćelijama humanih umbilikalnih vena kod normalne trudnoće (NT, n = 6), gestacijskog dijabetesa melitusa (GDM, n = 6) i trudnoćom izazvane hipertenzije (PIH, n = 6).

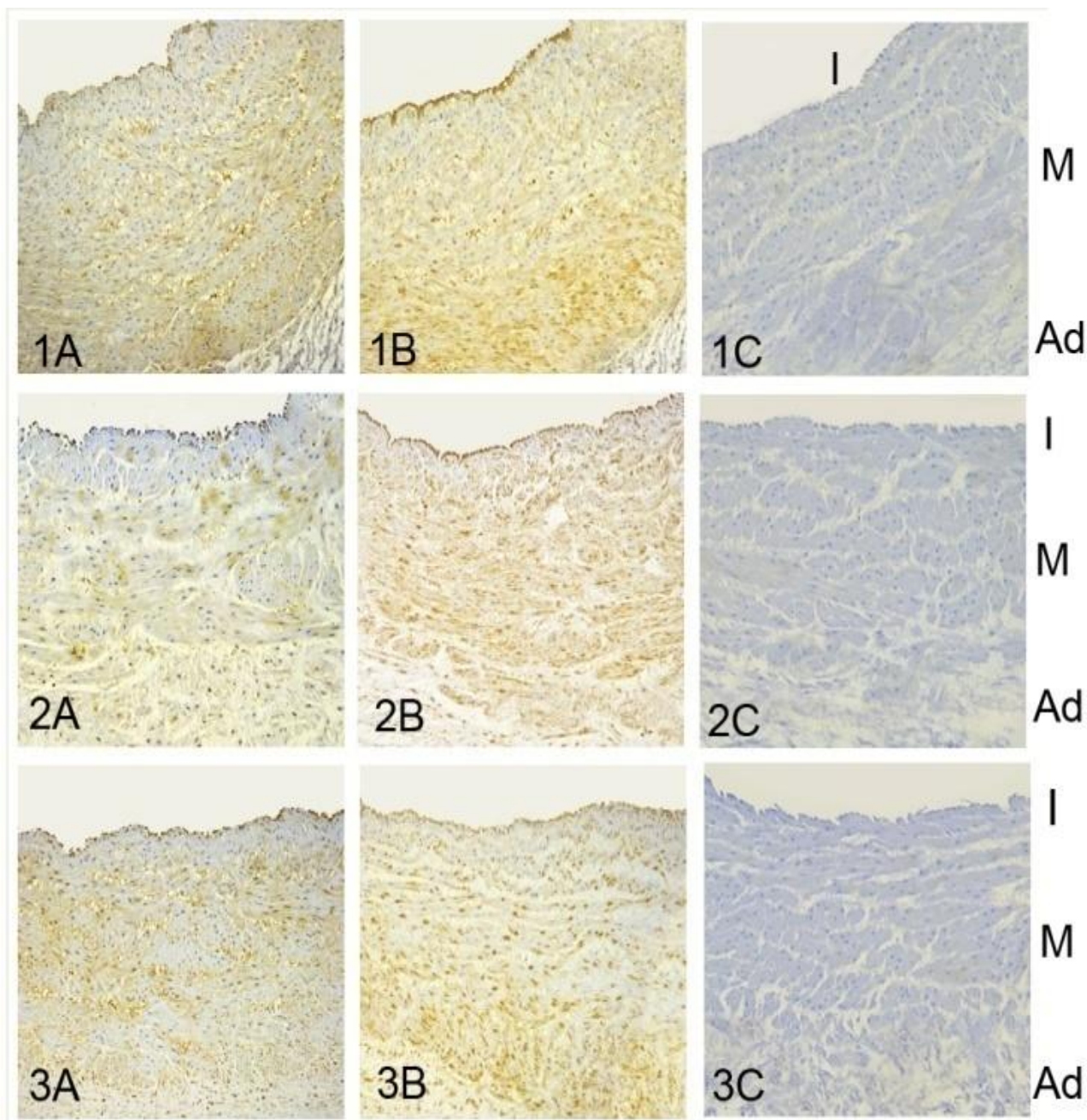
Ekspresija K_v1.2 subjedinica K_v kanala nije se značajno razlikovala među grupama, dok je ekspresija K_v1.3 subjedinice bila statistički značajno smanjena u PIH grupi u poređenju sa normalnom trudnoćom (Slika 20).



Slika 20. Ekspresija $K_v1.2$ i $K_v1.3$ subjedinica K_v kanala na glatkim mišićnim ćelijama humanih umbilikalnih vena poreklom od normalne trudnoće (NT, $n = 6$), gestacijskog dijabetesa melitusa (GDM, $n = 6$) i trudnoćom izazvane hipertenzije (PIH, $n = 6$). * $P < 0.05$ u odnosu na NT.

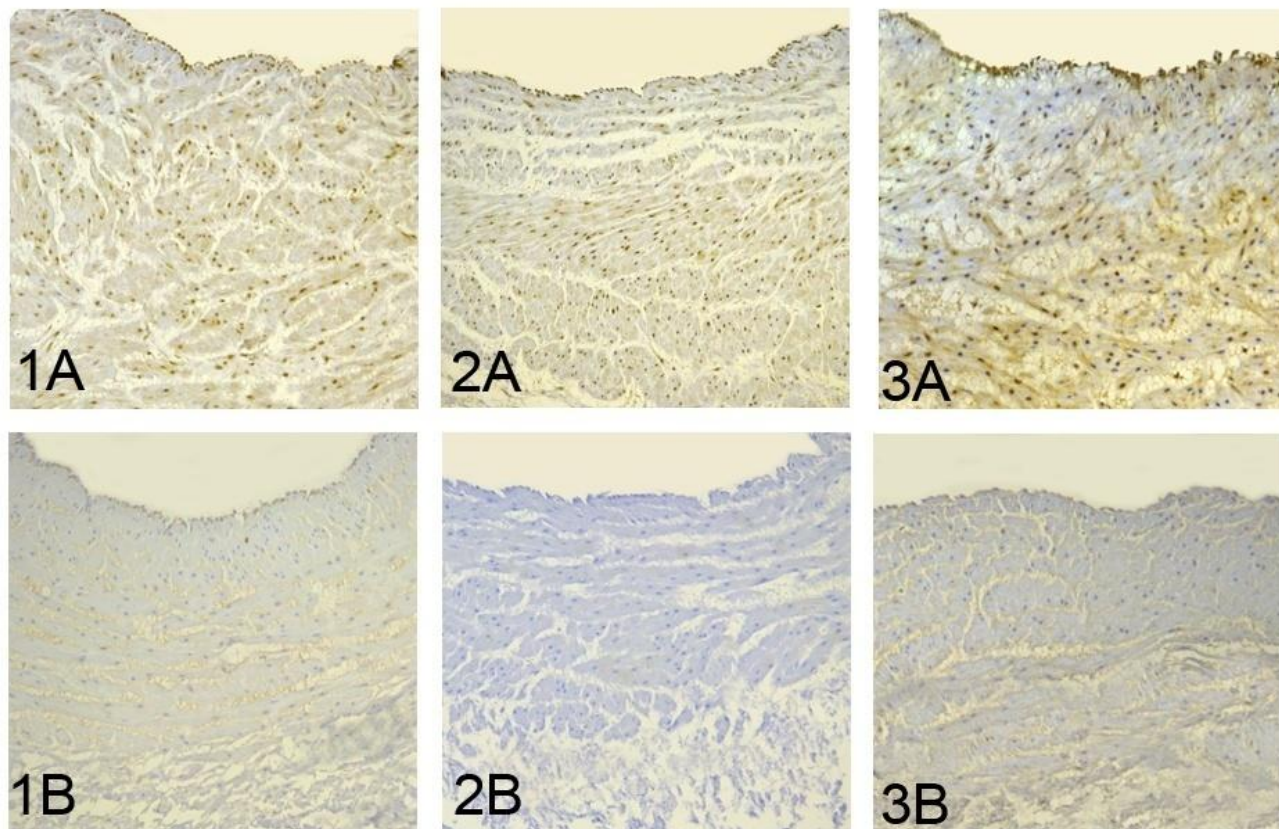
4.2.2. Imunohistohemijsko bojenje

Imunohistohemija je pokazala difuznu sarkolemalnu i intracelularnu ekspresiju Kir6.1 i SUR2B subjedinica K_{ATP} kanala u mediji humanih umbilikalnih vena, kao i u glatkim mišićnim ćelijama koje su povremeno prisutne u intimi (Slika 21). Rezultati imunocitohemijskog skoriranja bili su u saglasnosti sa Western blot analizom. U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama poreklom od normalnih trudnoća (Slika 21, 1A) Kir6.1 subjedinica je bila eksprimirana širom tunike medije (imunocitohemijski skor – umeren/++), ali je bila smanjena u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama poreklom od GDM (Slika 21, 2A) (imunocitohemijski skor – slab/+) i PIH (Slika 21, 3A) (imunocitohemijski skor – slab do umeren – +/-). Ekspresija SUR2B subjedinica je bila slična u svim grupama (Slika 21, 1B, 2B, 3B) (imunocitohemijski skor – umeren/++).



Slika 21. Imunohistohemijška detekcija subjedinica K_{ATP} kanala. Normalna trudnoća (1); gestacijski dijabetes melitus (2); trudnoćom izazvana hipertenzija (3). Ekspresija Kir6.1 (braon, A); ekspresija SUR2B (braon, B); negativna kontrola (C). Tunika intima (I); tunika medija (M); tunika adventicija (Ad). Uveličanje: 200 x.

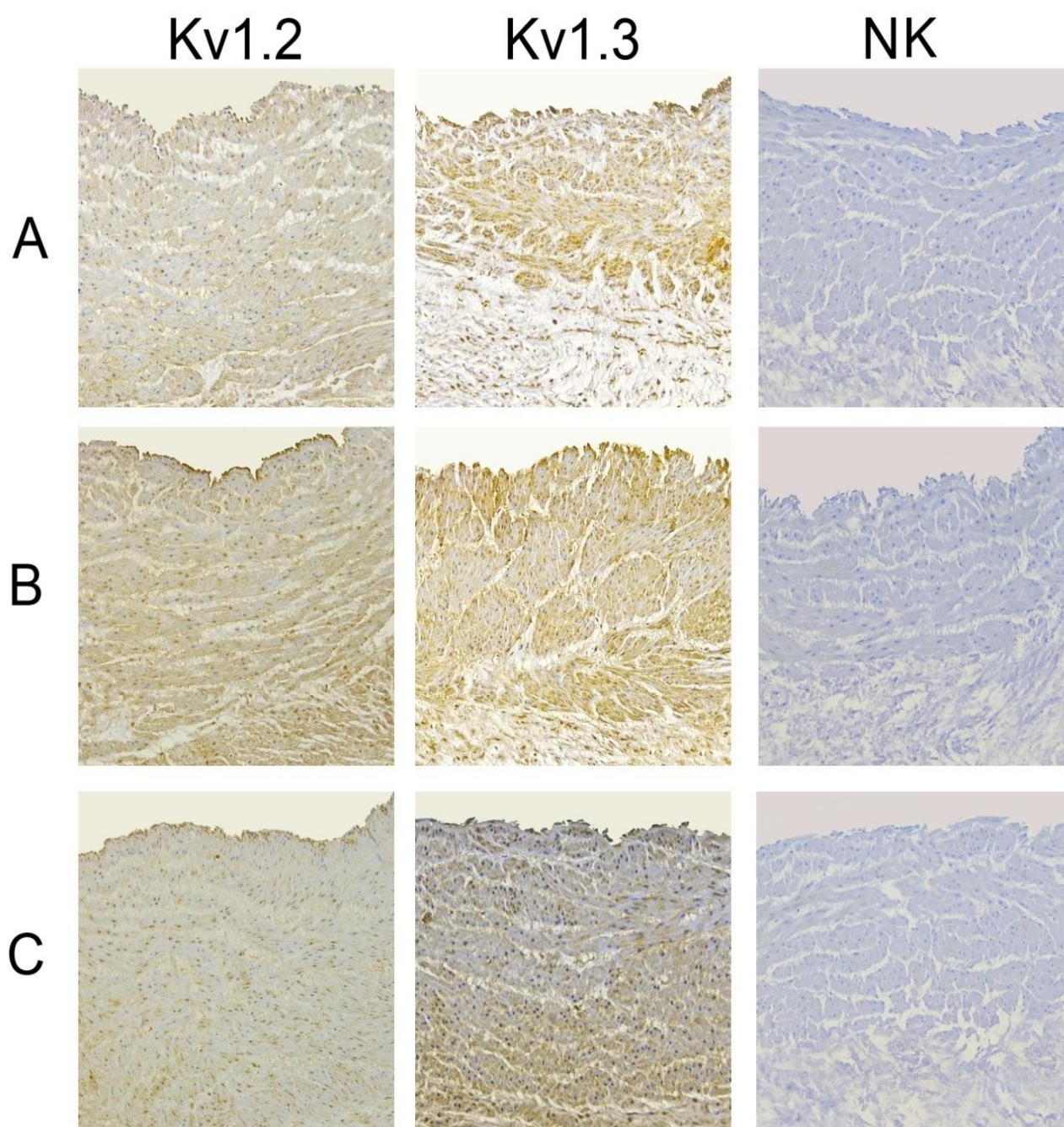
Obrazac ekspresije BK- α subjedinice BK_{Ca} kanala bio je sličan u svim eksperimentalnim grupama (Slika 22).



Slika 22. Imunohistohemijska detekcija BK- α subjedinice BK_{Ca} kanala. Normalna trudnoća (1); gestacijski dijabetes melitus (2); trudnoćom izazvana hipertenzija (3). Ekspresija BK- α (braon bojenje, A); negativna kontrola (B). Uveličanje: 200 x.

Rezultati imunocitohemijskog skoriranja su i u ovom slučaju podržali rezultate Western blot analize (Slika 22, 1A, 2A, 3A) (imunocitohemijski skor BK- α subjedinice – umeren/++).

Dalje, imunohistohemija je pokazala difuznu membransku i intracelularnu ekspresiju K_v1.2 i K_v1.3 subjedinica K_v kanala u mediji humanih umbilikalnih vena, kao i u glatkim mišićnim ćelijama koje su povremeno prisutne u intimi i adventiciji (Slika 23).



Slika 23. Imunohistohemijška detekcija subjedinica $K_v1.2$ i $K_v1.3$ kanala. Normalna trudnoća (A); gestacijski dijabetes melitus (B); trudnoćom izazvana hipertenzija (C). Pozitivna ekspresija (braon bojenje); negativna kontrola (NK). Uveličanje: 200 x.

Imunocitohemijski skor za K_v1.2 subjedinicu bio je isti u svim eksperimentalnim grupama (Slika 23, K_v1.2 A, B, C) (imunocitohemijski skor – slab do umeren – +/+++). U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama poreklom od normalnih i dijabetičnih trudnoća (Slika 23, K_v1.3 A i B) K_v1.3 subjedinica je bila eksprimirana širom tunike medije (imunocitohemijski skor – umeren/+++), ali je bila smanjena u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama poreklom od PIH (Slika 23, K_v1.3 C) (imunocitohemijski skor – slab do umeren – +/+++).

Svi rezultati koji se tiču molekularne analize proteinskih subjedinica K kanala sumirani su i prikazani u Tabeli 8.

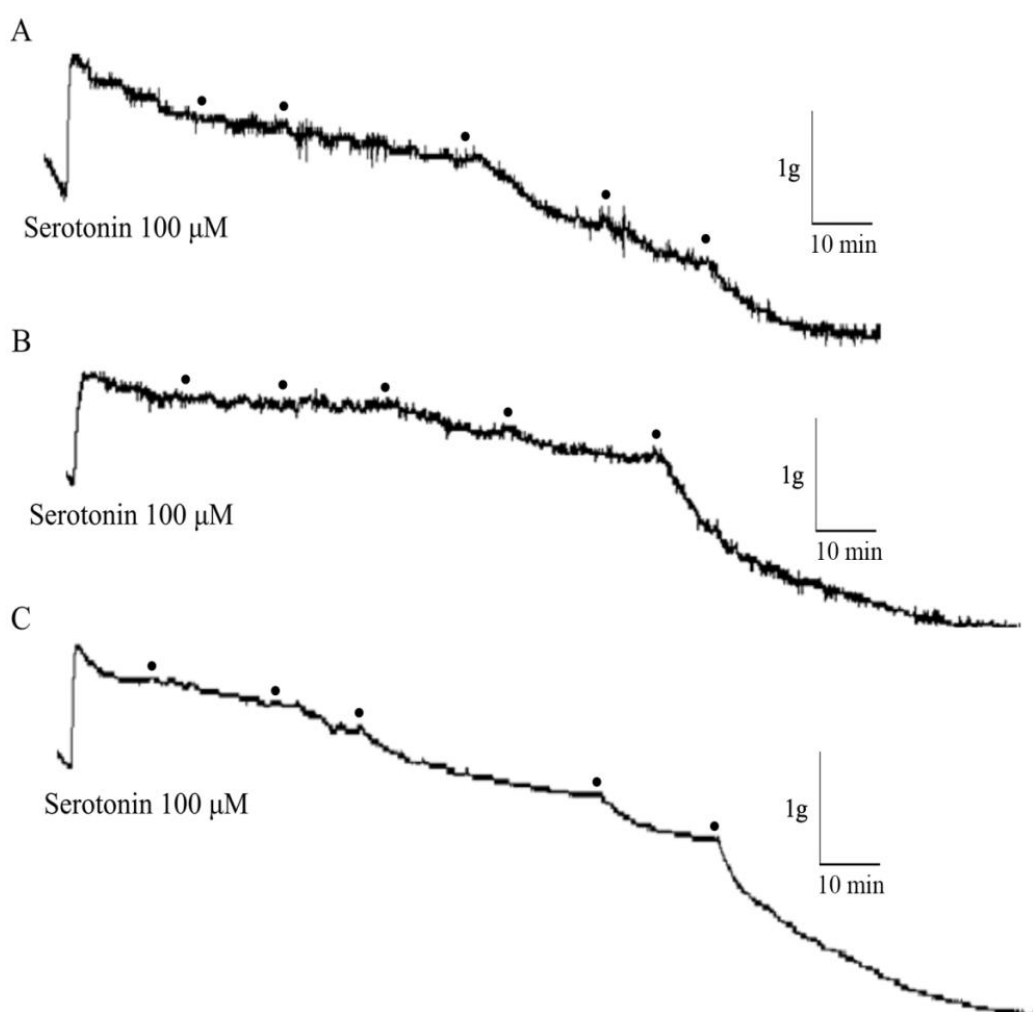
Tabela 8. Molekularna analiza subjedinica K kanala primenom imunohistohemije i Western blota.

Subjedinica	Imunohistohemijsko bojenje			Western blot
	NT	GDM	PIH	
Kir6.1	umereno ++, m/cp, difuzno	slabo +, m/cp, fokalno	slabo do umereno +/+++ m/cp, difuzno	smanjena u GDM i PIH, P < 0.05
SUR2B	umereno ++, m/cp, difuzno	umereno ++, m/cp, difuzno	umereno ++, m/cp, difuzno	nema statistički značajne razlike
BK- α	umereno ++, m/cp, difuzno	umereno ++, m/cp, difuzno	umereno ++, m/cp, difuzno	nema statistički značajne razlike
Kv1.2	slabo do umereno +/+++ m/cp, difuzno	slabo do umereno +/+++ m/cp, difuzno	slabo do umereno +/+++ m/cp, difuzno	nema statistički značajne razlike
Kv1.3	umereno ++, m/cp, difuzno	umereno ++, m/cp, difuzno	slabo do umereno +/+++ m/cp, difuzno	smanjena u u PIH, P < 0.05

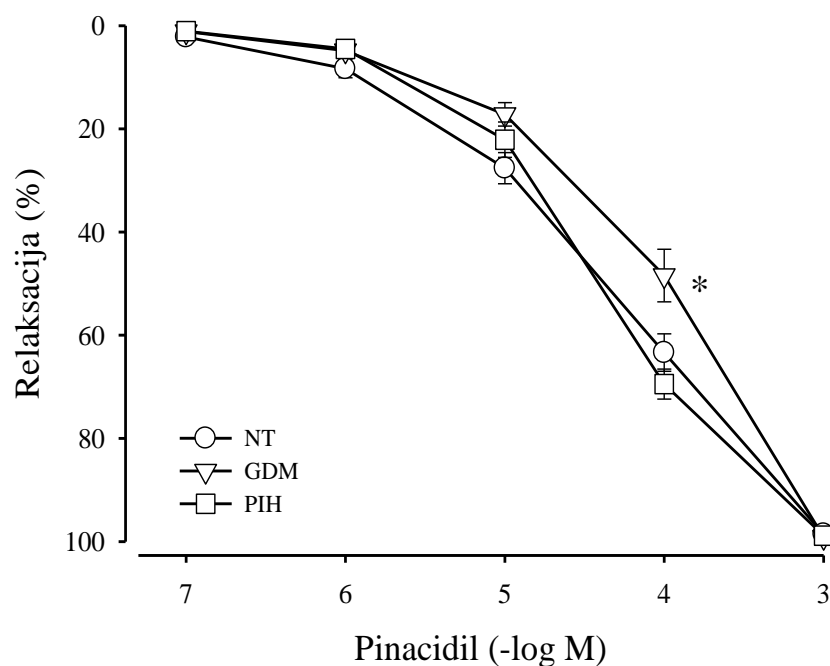
NT – normalna trudnoća; GDM – gestacijski dijabetes melitus; PIH – trudnoćom izazvana hipertenzija; m/cp – membransko/citoplazmatsko bojenje.

4.3. Efekti pinacidila na venskim segmentima prekontrahovanim serotoninom

Primena pinacidila (0.1 – 1000 μM) izazvala je relaksaciju venskih segmenata na koncentracijski-zavisan naćin kod normalnih (pD_2 vrednost iznosila je 4.58 ± 0.06 , E_{max} : 98.58 ± 0.30 , $n = 29$), dijabetićnih (pD_2 vrednost je bila 4.32 ± 0.07 , E_{max} : 99.13 ± 0.24 , $n = 19$) i hipertenzivnih trudnoća (pD_2 vrednost je iznosila 4.58 ± 0.05 , E_{max} : 98.86 ± 0.24 , $n = 19$). GDM je izazvao statistićki znaćajno pomeranje koncentracijski-zavisne krive za pinacidil udesno u poređenju sa normalnom trudnoćom ($P < 0.05$). Maksimalne relaksacije nisu bile statistićki znaćajno različite izmeću grupa ($P > 0.05$) (Slika 24 i 25).

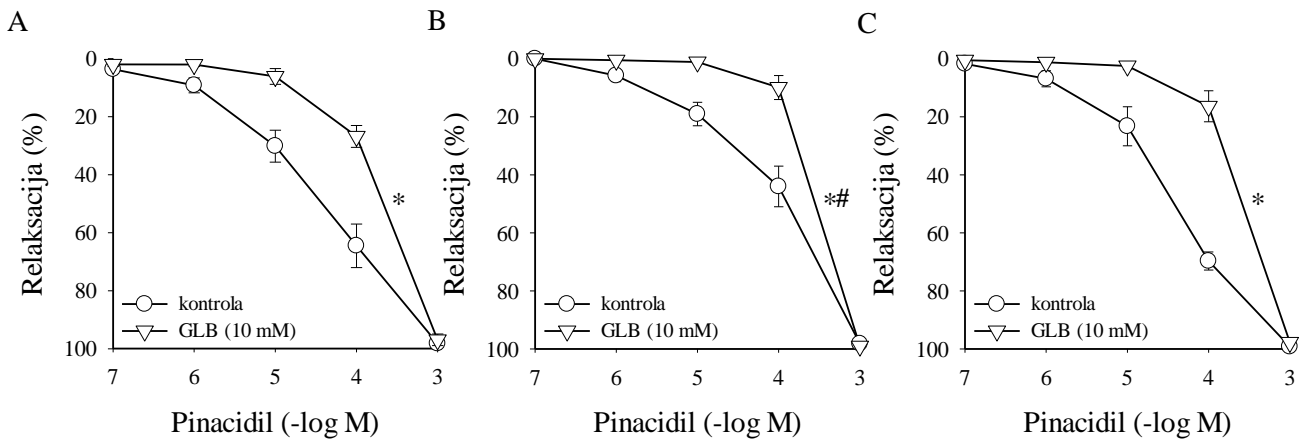


Slika 24. Originalni zapisi vazorelaksantnih efekata pinacidila na segmentima humanih umbilikalnih vena prekontrahovanih serotoninom. A – normalna trudnoća; B – gestacijski dijabetes melitus; C – trudnoćom izazvana hipertenzija.



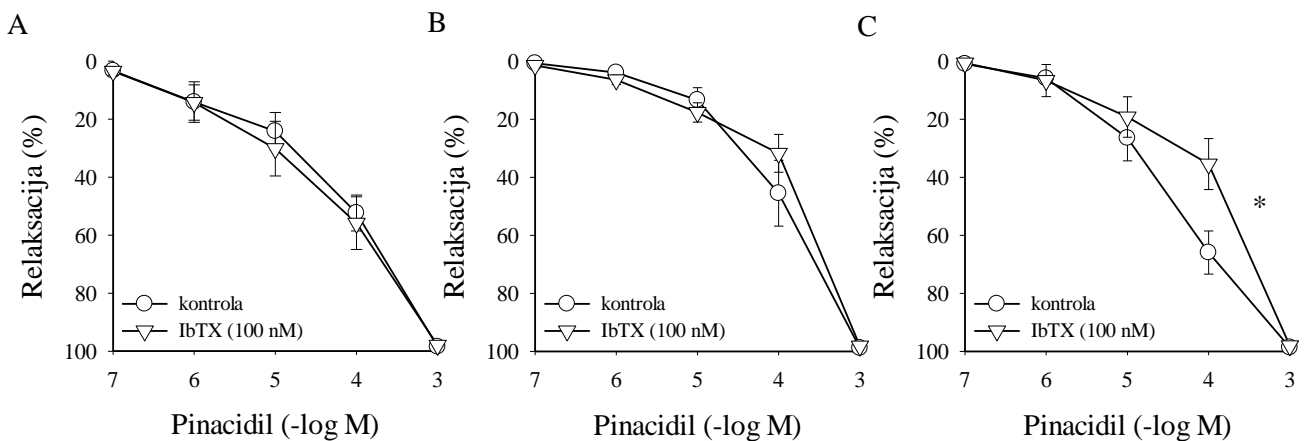
Slika 25. Kumulativne koncentracijski zavisne krive za pinacidil na humanim umbilikalnim venama prekontrahovanim serotoninom kod NT (n = 29, krug), GDM (n = 19, trougao) i PIH (n = 19, kvadrat). Tačke predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije su S.E.M. *P < 0.05 u poređenju sa NT.

U svim grupama, GLB (10 μ M, n = 6), selektivni inhibitor K_{ATP} kanala signifikantno je inhibirao relaksaciju humanih umbilikalnih vena izazvanu pinacidilom, bez razlika u E_{max} vrednostima. U normalnoj trudnoći pD_2 vrednost je bila 4.61 ± 0.12 u odsustvu vs. 3.91 ± 0.04 u prisustvu GLB-a, $P < 0.05$; E_{max} : 98.22 ± 0.82 % u odsustvu vs. 96.92 ± 2.00 % u prisustvu GLB-a, $P > 0.05$ (Slika 25A). U GDM grupi pD_2 vrednost je iznosila 4.27 ± 0.09 u odsustvu vs. 3.65 ± 0.07 u prisustvu GLB-a, $P < 0.05$; E_{max} vrednosti u GDM grupi iznosile su 98.32 ± 0.63 % u odsustvu vs. 99.05 ± 0.45 % u prisustvu GLB-a, $P > 0.05$ (Slika 26B). U PIH vrednosti pD_2 bile su 4.62 ± 0.09 u odsustvu i 3.70 ± 0.09 u prisustvu GLB-a, $P < 0.05$; E_{max} : 99.22 ± 0.36 % u odsustvu, a 97.78 ± 0.76 % u prisustvu GLB-a, $P > 0.05$ (Slika 26C).



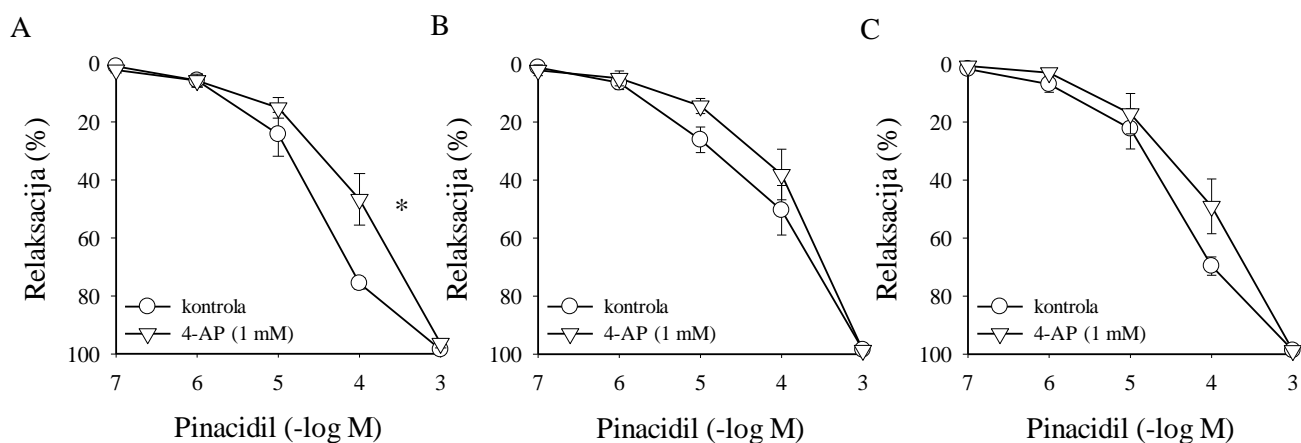
Slika 26. Antagonizam relaksantnih efekata pinacidila izazvan glibenklamidom na humanim umbilikalnim venama prekontrahovanim serotoninom. A – normalna trudnoća (n = 6); B – gestacijski dijabetes melitus (n = 6); C – trudnoćom izazvana hipertenzija (n = 6). Kumulativne koncentracijski zavisne krive u odsustvu (krug) i prisustvu glibenklamida (GLB, trougao). Tačke predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije su S.E.M. *P < 0.05 u poređenju sa kontrolom; #P < 0.05 u poređenju sa normalnom trudnoćom.

Iberiotoksin (100 nM), selektivni antagonist BK_{Ca} kanala, statistički značajno je inhibirao vazorelaksantne efekte pinacidila na hipertenzivnim venama (P < 0.05), ali nije uspeo da izazove isti odgovor na zdravim i dijabetičnim venskim segmentima (Slika 27). Ni u ovom slučaju razlike u maksimalnom efektu između grupa nisu bile statistički značajne (P > 0.05, Tabela 9).



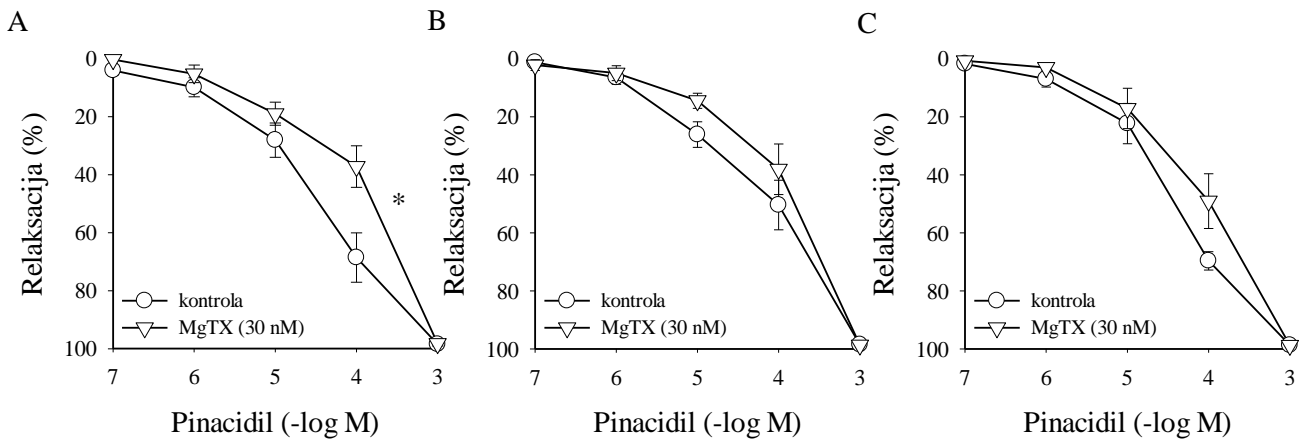
Slika 27. Koncentracijski zavisne krive za relaksantno dejstvo pinacidila na humanim umbilikalnim venama prekontrahovanim serotoninom u odsustvu (krug) i prisustvu iberiotoksina (IbTX, trougao). A – normalna trudnoća (n = 6); B – gestacijski dijabetes melitus (n = 6); C – trudnoćom izazvana hipertenzija (n = 6). Tačke predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije su S.E.M. *P < 0.05 u poređenju sa kontrolom.

4-AP (10 mM, n = 6), neselektivni blokator K_v kanala, izazvao je statistički značajno pomeranje koncentracijski-zavisne krive za pinacidil udesno na venskim segmentima poreklom od normalnih trudnoća, ali nije uzrokovao značajne promene kod dijabetičnih i hipertenzivnih vena (Slika 28). Razlike u maksimalnom efektu između grupa nisu bile statistički značajne ($P > 0.05$, Tabela 9).



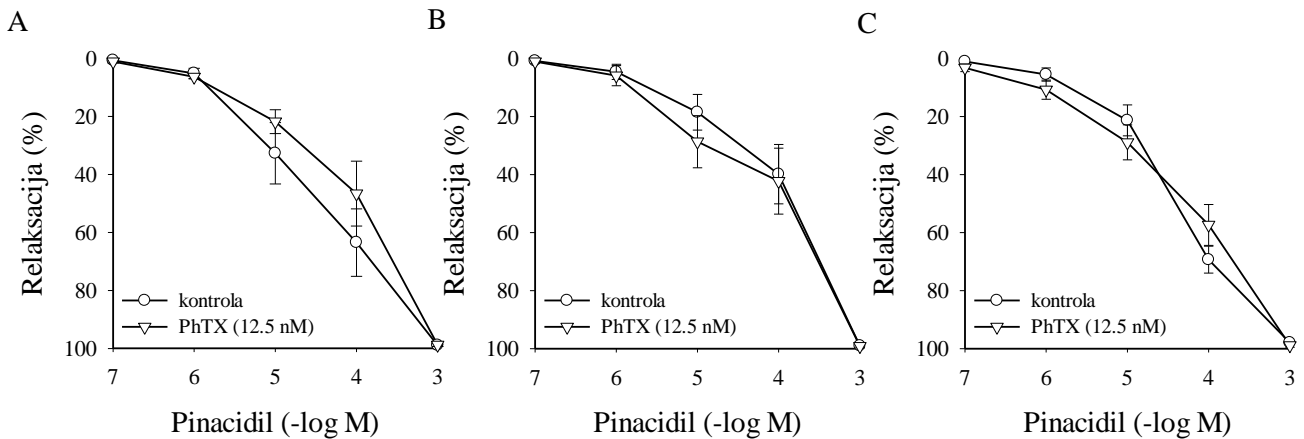
Slika 28. Antagonizam relaksantnih efekata pinacidila izazvan 4-aminopiridinom (4-AP) na humanim umbilikalnim venama prekontrahovanim serotoninom. A – normalna trudnoća (n = 6); B – gestacijski dijabetes melitus (n = 6); C – trudnoćom izazvana hipertenzija (n = 6). Kumulativne koncentracijski zavisne krive u odsustvu (krug) i prisustvu 4-AP (4-AP, trougao). Tačke predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije su S.E.M. * $P < 0.05$ u poređenju sa kontrolom

Margatoksin (30 nM, n = 6), selektivni blokator $K_{v1.2}$ i $K_{v1.3}$ kanala, izazvao je statistički značajno pomeranje koncentracijski-zavisne krive za pinacidil udesno na venskim segmentima poreklom od normalnih trudnoća, ali nije uzrokovao značajne promene kod dijabetičnih i hipertenzivnih vena (Slika 29). Razlike u maksimalnom efektu između grupa nisu bile statistički značajne ($P > 0.05$, Tabela 9).



Slika 29. Koncentracijski zavisne krive za relaksantno dejstvo pinacidila na humanim umbilikalnim venama prekontrahovanim serotoninom u odsustvu (krug) i prisustvu margatoksina (MgTX, trougao). A – normalna trudnoća (n = 6); B – gestacijski dijabetes melitus (n = 6); C – trudnoćom izazvana hipertenzija (n = 6). Tačke predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije su S.E.M. *P < 0.05 u poređenju sa kontrolom.

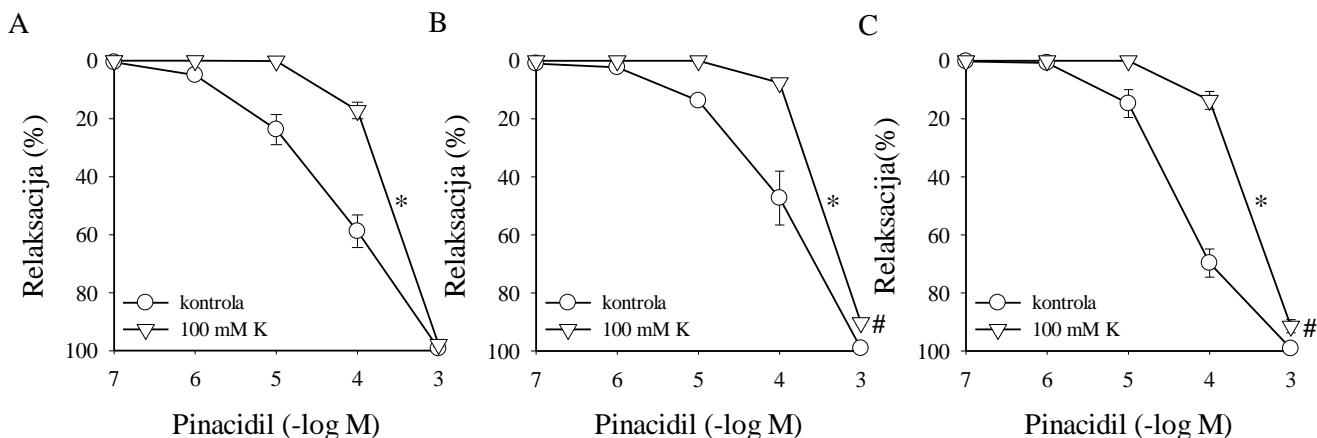
Friksotoksin (12.5 nM, n = 5–6), selektivni blokator $K_v4.2$ i $K_v4.3$ kanala, nije antagonizovao vazodilatatorne efekte pinacidila na humanim umbilikalnim venama ni u jednoj od eksperimentalnih grupa. Ni u ovom slučaju razlike u maksimalnom efektu između grupa nisu bile statistički značajne (P > 0.05, Slika 30, Tabela 9).



Slika 30. Antagonizam relaksantnih efekata pinacidila izazvan friksotoksinom (PhTX) na humanim umbilikalnim venama prekontrahovanim serotoninom. A – normalna trudnoća (n = 6); B – gestacijski dijabetes melitus (n = 6); C – trudnoćom izazvana hipertenzija (n = 6). Kumulativne koncentracijski zavisne krive u odsustvu (krug) i prisustvu friksotoksina (PhTX, trougao). Tačke predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije su S.E.M.

4.4. Efekti pinacidila na humane umbilikalne vene u prisustvu 100 mM K⁺

Relaksantni efekat pinacidila (0.1 – 1000 μM) na humanim umbilikalnim venama prekontrahevanim depolarizujućim rastvorom K⁺ bio je statistički značajno inhibiran u svim eksperimentalnim grupama (P < 0.05, Slika 31). Takođe, postojala je statistički značajna razlika u maksimalnim relaksacijama u oba patološka stanja u poređenju sa normalnom trudnoćom (P < 0.05, Tabela 9).



Slika 31. Antagonizam relaksantnih efekata pinacidila u prisustvu rastvora visoke koncentracije kalijuma (100 mM K⁺). A – normalna trudnoća (n = 6); B – gestacijski dijabetes melitus (n = 6); C – trudnoćom izazvana hipertenzija (n = 6). Kumulativne koncentracijski zavisne krive u odsustvu (krug) i prisustvu depolarizujućeg rastvora K⁺ (100 mM K⁺, trougao). Tačke predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije su S.E.M. *P < 0.05 u poređenju sa kontrolom; #P < 0.05 u poređenju sa normalnom trudnoćom.

Tabela 9. Vazorelaksantni efekti pinacidila na humane umbilikalne vene u odsustvu i prisustvu iberiotoksina (IbTX), 4-AP, margatoksina (MgTX), friksotoksina (PhTX) i 100 mM K⁺.

	NT		GDM		PIH	
	pD ₂	E _{max} (%)	pD ₂	E _{max} (%)	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola	4.55 ± 0.10	98.43 ± 1.08	4.23 ± 0.10 [#]	98.87 ± 0.72	4.58 ± 0.12	98.70 ± 0.51
IbTX	4.57 ± 0.20	97.94 ± 0.31	4.12 ± 0.12	98.18 ± 0.70	4.18 ± 0.20*	98.10 ± 0.46
Kontrola	4.66 ± 0.08	98.48 ± 0.35	4.35 ± 0.10 [#]	98.53 ± 0.69	4.61 ± 0.10	98.75 ± 0.45
4-AP	4.25 ± 0.13*	96.32 ± 1.56	4.18 ± 0.09	98.67 ± 0.30	4.30 ± 0.14	98.78 ± 0.56
Kontrola	4.65 ± 0.12	98.45 ± 1.08	4.31 ± 0.15	98.93 ± 0.55	4.76 ± 0.08	99.60 ± 0.50
MgTX	4.20 ± 0.10*	98.24 ± 0.77	4.34 ± 0.18	99.18 ± 0.34	4.76 ± 0.15	99.12 ± 0.88
Kontrola	4.59 ± 0.17	99.92 ± 0.27	4.22 ± 0.17	99.03 ± 0.64	4.57 ± 0.08	97.94 ± 0.32
PhTX	4.32 ± 0.16	98.72 ± 0.56	4.34 ± 0.20	99.13 ± 0.55	4.57 ± 0.11	98.87 ± 0.64
Kontrola	4.50 ± 0.08	99.22 ± 0.33	4.27 ± 0.10	99.10 ± 0.45	4.51 ± 0.05	99.18 ± 0.34
100 mM K ⁺	3.73 ± 0.04*	97.80 ± 0.80	3.38 ± 0.03* [#]	90.26 ± 0.99* [#]	3.51 ± 0.10*	91.46 ± 2.26* [#]

NT – normalna trudnoća; GDM – gestacijski dijabetes melitus; PIH – trudnoćom izazvana hipertenzija; Kontrola – respektivna kontrola za svaki eksperiment, prekontrahovana serotoninom. Rezultati su prezentovani kao srednje vrednosti ± S.E.M; *P < 0.05 u poređenju sa respektivnom kontrolom; [#]P < 0.05 u poređenju sa NT; n = 5-7.

5. DISKUSIJA

Humana umbilikalna vena izuzetno je specifičan krvni sud koji se nalazi pod uticajem brojnih metaboličkih, vaskularnih i hemodinamskih promena tokom čitavog fetalnog života. Istraživanja su pokazala da GDM i PIH uzrokuju različite morfološke i ultrastrukturne promene na humanim umbilikalnim venama, kao što su perivaskularne i intraparijetalne hemoragije, disekcije zida krvnog suda, povećanje odnosa zid/lumen, alteracije sadržaja tkivnog matriksa i druge (Blanco i sar. 2011). Tokom GDM opisana su oštećenja i degeneracija vaskularnog glatkog mišićnog tkiva u zidu humane umbilikalne vene, kao i smanjenje saturacije kiseonika i povećanje koncentracije laktata u umbilikalnoj venskoj krvi (Singh, 1986; Taricco i sar., 2009). Povećavanje debljine zida i odnosa zid/lumen od placentalnog ka fetalnom kraju humane umbilikalne vene tokom preeklampsije, upućuje na povećanu potrebu održavanja adekvatnog pritiska u lumenu da bi krv tekla prema fetusu. Vaskularne glatke mišićne ćelije su u stanju hronične vazokonstrikcije, a sadržaj elastičnih vlakana se takođe povećava idući prema fetalnom kraju, što je važan faktor s obzirom da elastična vlakna imaju ulogu senzora hemodinamskih promena u krvnim sudovima (Koech i sar., 2008). U brojnim studijama registrovano je prisustvo hronične hipoksije i povećanog oksidativnog stresa tokom gestacijskog dijabetesa i hipertenzije (Bisseling i sar., 2005; Taricco i sar., 2009; Toljic i sar., 2017; Yang i sar., 2018). Humana umbilikalna vena vrlo aktivno reaguje na abnormalne stimuluse u dijabetičnim i hipertenzivnim mikrosredinama (Pugnaloni i sar., 1995). Detaljniji, molekularni uvid u promene koje se pritom dešavaju u njenom zidu, kao i proučavanje regulacije njenog tonusa mogu biti dragoceni u razumevanju patogeneze GDM i PIH i njihovih komplikacija, kao i u eventualnom pronalaženju novih lekova za njihovu terapiju.

Pinacidil, glavni predstavnik OKK iz hemijske grupe cijanogvanidina, nekada je bio korišćen u terapiji hipertenzije, ali je zbog ozbiljnih neželjenih dejstava, poput edema, jakih glavobolja i srčanih aritmija, povučen iz kliničke upotrebe i danas se koristi samo u eksperimentalne svrhe. Mesto vezivanja pinacidila precizno je lokalizovano na SUR_x subjedinici K_{ATP} kanala (Friedel i Brogden, 1990; Rubaiy, 2016). Međutim, postoje mnogi dokazi da pinacidil, naročito ako se primeni u visokim dozama ($\geq 100 \mu\text{M}$), pored K_{ATP} kanala deluje i na druge podtipove K kanala, uključujući K_v i BK_{Ca} kanale (Stockbridge i sar. al., 1991; Khan i sar., 1998; Thorne i sar., 2002; Novakovic i sar., 2012). Dalje, eksperimenti sa rastvorom visoke koncentracije K⁺ pokazali su i prisustvo dodatnih mehanizama dejstva pinacidila koji uopšte ne zavise od K kanala (Stojnic i sar., 2007). Ostali OKK ili imaju manju potentnost ili predstavljaju relativno „čiste“ otvarače K_{ATP} kanala (kromakalim), nisu u mogućnosti da relaksiraju krvne sudove u prisustvu visokog kalijuma (kromakalim, levokromakalim), ili imaju neke dobro poznate dodatne efekte koji bi mogli da utiču na rezultate istraživanja i dovedu do pogrešnih zaključaka (nikorandil, minoksidil). Potentnost

pinacidila je mnogo veća i pinacidil izaziva mnogo jače relaksacije u odnosu na diazoksid (Quayle i sar., 1997). Iz navedenih razloga za proučavanje funkcije K kanala u ovom istraživanju izabran je pinacidil. Polazna pretpostavka je bila da će upotreba pinacidila pružiti najširu sliku o funkciji vaskularnih K kanala, njihovim ulogama u regulaciji vaskularnog tonusa i potencijalnim alteracijama tokom patoloških stanja. Takođe je pretpostavljeno da bi neki novi, pinacidilu sličan OKK, mogao da bude moćno sredstvo u razumevanju i potencijalno i u terapiji dijabetesa i hipertenzije.

Prema podacima dobijenim temeljnim pretraživanjem i proučavanjem literature ovo istraživanje je prvo koje se bavi ispitivanjem razlika u ekspresiji i funkciji K kanala na humanim umbilikalnim venama pod uticajem gestacijskog dijabetesa i hipertenzije. U narednim delovima teksta svi dobijeni rezultati biće postupno i detaljno diskutovani i objašnjeni.

Prosečna starost porodilja bila je veća kod dijabetičnih porodilja u odnosu na zdrave. Iako ova razlika nije bila statistički značajna ona je u skladu sa činjenicom da je starija životna dob faktor rizika za nastanak GDM. Statistički značajno skraćen gestacioni period kod hipertenzivnih porodilja u odnosu na zdrave normotenzivne porodilje očekivan je rezultat s obzirom na to da je u slučaju PIH medicinska intervencija često neophodna da bi se sačuvao život majke i/ili deteta. Posledično, u ovoj grupi pacijentkinja procenat porođaja izvedenih carskim rezom bio je najveći i iznosio je 50%. Prema podacima iz literature slični rezultati bili bi očekivani i kod porodilja sa gestacijskim dijabetesom, ali to u ovom istraživanju nije bio slučaj. Primenjena terapija tokom trudnoće i porođaja bila je u skladu sa vodičima dobre kliničke prakse, navedenim u uvodnom delu, u oba patološka stanja.

GDM je značajno antagonizovao relaksaciju humanih umbilikalnih vena izazvanu pinacidilom, dok je u PIH vazodilatatorni odgovor krvnog suda izazvan pinacidilom ostao nepromenjen. Izmenjena funkcija K kanala u dijabetes melitusu i/ili hipertenziji može biti kako uzrok (npr. umešanost u patogenezu), tako i posledica bolesti (npr. kompenzatorni mehanizam) i oslikava se kao promena broja, pojedinačne sprovodljivosti i/ili verovatnoće otvaranja kanala (Sobey, 2001). Potvrđeno je da ćelijski metabolizam može da učestvuje u regulaciji genske ekspresije K_{ATP} kanala, kao i da alteracije metabolizma (npr. izazvane hroničnom hipoksijom ili oksidativnim stresom) koje postoje u dijabetičnim i hipertenzivnim mikrosredinama dovode do promena u njihovom broju (Zhuo i sar., 2005). Da bi vaskularni K_{ATP} kanali bili funkcionalni neophodna je koekspresija obe njihove subjedinice, Kir6.1 i SUR2B, u odnosu 4 prema 4 (Hibino i sar., 2010). Stoga, značajno smanjena ekspresija Kir6.1 subjedinice u GDM-u i PIH-u dobijena u ovom istraživanju, uz očuvanu ekspresiju SUR2B subjedinice predstavlja dokaz smanjene

ekspresije K_{ATP} kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama humane umbilikalne vene. Ovakvi rezultati su velikom većinom u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na različitim dijabetičnim i hipertenzivnim modelima u drugim vaskularnim odeljcima (Tykocki i sar., 2017). Kratko vreme izlaganja humane umbilikalne vene dijabetičnom i hipertenzivnom okruženju, ograničeno na period trudnoće, kao i primena adekvatne terapije koja je u većini slučajeva održavala glikemiju i vaskularnu tenziju u normalnim granicama, moguća su objašnjenja očuvane ekspresije SUR2B subjedinice. Tako je na vaskularnom glatkom mišiću aorte spontano hipertenzivnih pacova pokazano da se već registrovano smanjenje ekspresije subjedinica K_{ATP} kanala kod 16 nedelja starih eksperimentalnih životinja još više smanjuje sa starenjem. Posledično, kada su životinje bile stare 49 nedelja, ekspresija subjedinica K_{ATP} kanala bila je statistički značajno manja u odnosu na onu zabeleženu u 16. nedelji (Liu i sar., 2016). Još jedna mogućnost je da je proteinska stabilnost SUR2B subjedinica vaskularnih glatkih mišićnih ćelija humane umbilikalne vene veća i da je ova subjedinica otpornija na delovanje patoloških stimulusa dijabetičnih i hipertenzivnih mikrosredina i na post-translacione modifikacije u odnosu na Kir6.1 subjedinicu.

Smanjeni funkcionalni odgovor na relaksaciju indukovanu pinacidilom u GDM-u, zapažen u ovom istraživanju, u saglasnosti je sa rezultatima molekularne analize K_{ATP} proteina. Nedavno, Li i saradnici (2018) su na humanim umbilikalnim arterijama uočili da je smanjenje K_{ATP} struja i vazorelaksacije izazvane pinacidilom pre svega posledica smanjene ekspresije ovih kanala u GDM-u. Ranije su Bisseling i saradnici (2005) detektovali oštećenu funkciju K_{ATP} kanala u fetoplacentalnoj cirkulaciji žena sa dijabetes melitusom tip 1. U eksperimentima sprovedenim na modelu insulin rezistentnih pacova pokazano je da hiperprodukcija slobodnih radikala i povećan oksidativni stres remete vazodilataciju izazvanu pinacidilom u cerebralnim arteriolama, ali da se ona u potpunosti obnavlja posle tretmana sa superoksid dismutazom i katalazom (Erdos i sar., 2004). Aktivacija PKC izazvana glukozom, nezavisna od slobodnih radikala, još jedan je od mogućih mehanizama koji izaziva supresiju funkcije K_{ATP} kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama tokom dijabetesa (Tykocki i sar., 2017). Glibenklamid, selektivni inhibitor K_{ATP} kanala, u dozi od 10 μ M antagonizovao je odgovor humanih umbilikalnih vena na pinacidil u GDM-u što je definitivno potvrdilo umešanost ovih kanala u mehanizam dejstva pinacidila. U ovom istraživanju uočena je i smanjena senzitivnost na pinacidil na venskim segmentima preinkubiranim sa GLB-om u GDM grupi u odnosu na kontrolne normalne trudnoće. Ovo je nešto o čemu bi trebalo razmišljati u slučaju kliničke primene oralnih antidijabetika iz grupe sulfonilureje u terapiji gestacijskog dijabetesa imajući na umu da 70% ovog leka dospeva u umbilikalnu cirkulaciju. Relativna neosetljivost humanih umbilikalnih vena na vazodilatatore, u prisustvu glibenklamida, mogla bi da kompromituje venski protok i dopremanje kiseonika i hranljivih materija do fetusa.

Neki od vazoaktivnih faktora koji se oslobađaju tokom patogeneze PIH i učestvuju u nastanku i održavanju vazokonstrikcije dokazano modulišu i funkciju K kanala. Studije na genetski modifikovanim životinjama definitivno su potvrdile značaj K_{ATP} kanala u kontroli krvnog pritiska. Glavna uloga Kir6.1 subjedinica u kontroli krvnog pritiska je posebno istaknuta s obzirom na to da su miševi sa kondicionalnom delecijom ove subjedinice ispoljili hipertenziju (Aziz i sar., 2014). Suprotno, povećanje ekspresije Kir6.1 subjedinice praćeno hiperaktivnošću K_{ATP} kanala izazivalo je hipotenziju. Hipereaktivnost K_{ATP} kanala zapažena je i kod ljudi sa Kantu sindromom, čija je jedna od karakteristika sistemska hipotenzija (Li i sar., 2013). Akutna hipoksija može da aktivira K_{ATP} kanale kako direktno, tako i putem različitih intracelularnih signalnih puteva izazivajući vazodilataciju. Sa druge strane, hronična hipoksija dovodi do smanjenog odgovora K_{ATP} kanala na OKK i povećanja vaskularnog tonusa i krvnog pritiska. Tako je dugotrajna hipoksija smanjivala aktivnost K_{ATP} kanala na uterusnim arterijama trudnih ovaca (Xiao i sar., 2010). U ovom istraživanju, tokom PIH nije došlo do promene pinacidilom izazvane relaksacije uprkos smanjenju ekspresije K_{ATP} kanala. Glibenklamid je prouzrokovao značajnu inhibiciju relaksacije izazvane pinacidilom na hipertenzivnim humanim umbilikalnim venama, ali bez ikakvih razlika u odnosu na normalnu trudnoću. Ovakvi rezultati deluju pomalo neočekivano. Ipak, Blanco-Rivero i saradnici (2008) dobili su slične rezultate na glatkom mišiću aorti spontano hipertenzivnih pacova. Oni su takođe demonstrirali da smanjena ekspresija subjedinica K_{ATP} kanala ne remeti odgovor krvnog suda na pinacidil. Dalje, na sličnom eksperimentalnom modelu, Liu i saradnici (2016) su registrovali smanjen funkcionalni odgovor hipertenzivnih aorti izazvan diazoksidom, ali ne i pinacidilom. Ovim se ističe velika hemijska raznovrsnost OKK, kao i izuzetna kompleksnost njihovog mehanizma dejstva, što može, barem delimično, pružiti objašnjenje nekih rezultata ovog istraživanja.

U cilju analize doprinosa BK_{Ca} kanala u vazorelaksantnom odgovoru na pinacidil korišćen je iberiotoksin. Iberiotoksin je selektivni blokator BK_{Ca} kanala koji je u ovom istraživanju prouzrokovao statistički značajno pomeranje koncentracijski-zavisne krive za pinacidil udesno u PIH grupi, dok je u normalnoj trudnoći i GDM funkcionalni odgovor na pinacidil ostao nepromenjen. Dobijeni rezultat sugerise da tokom hipertenzije dolazi do ushodne regulacije i/ili povećanja aktivnosti BK_{Ca} kanala što je poznati kompenzatorni mehanizam u suprostavljanju hiperreaktivnosti krvnih sudova. Na različitim animalnim hipertenzivnim modelima primena blokatora BK_{Ca} kanala izazvala je naglašene vazokonstriktorne odgovore i tako obelodanila povećanu aktivnost BK_{Ca} kanala u hipertenziji (Sobey, 2001; Hu i Zhang 2012). Dodatno, korišćenjem *patch clamp* tehnika registrovano je povećanje iberiotoksin-senzitivnih struja u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama hipertenzivnih životinja u poređenju sa kontrolama (Joseph

i sar., 2013). Nepromenjena ekspresija α -subjedinice BK_{Ca} kanala u PIH dobijena u ovom istraživanju ukazuje da zapažena hiperaktivnost BK_{Ca} kanala nije posledica povećanja njihovog broja, nego je pre funkcionalne prirode. Do nje najverovatnije dolazi zbog različitih post-transkripcionih modifikacija BK α -subjedinice, promena njene proteinske stabilnosti i/ili promena interakcija sa različitim pomoćnim subjedinicama. U mnogim studijama uočena je povećana ekspresija pomoćnih β 1 subjedinica BK_{Ca} kanala tokom hipertenzije. Sve ove alteracije mogu da utiču na sprovodljivost i/ili verovatnoću otvaranja BK_{Ca} kanala i da ih povećaju (Joseph i sar., 2013; Li i Yan, 2016). Dodatno, demonstrirano je da dugotrajna hipoksija povećava Ca²⁺-senzitivnost BK_{Ca} kanala u pojedinim vaskularnim odeljcima (Dopico i sar., 2018). Koristeći sve ove opservacije može se, barem jednim delom, objasniti očuvanost funkcionalnog odgovora na pinacidil u PIH grupi uprkos smanjenju ekspresije K_{ATP} kanala, ali detaljnija istraživanja funkcionalne ekspresije BK_{Ca} kanala na humanim umbilikalnim venama tokom PIH su neophodna. Njihovi rezultati mogu biti dragoceni u razumevanju i potencijalnoj terapiji PIH.

Ekspresija α -subjedinice BK_{Ca} kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama humanih umbilikalnih vena tokom GDM je bila nepromenjena u odnosu na zdrave kontrole. Prema većini drugih istraživanja sposobnost BK_{Ca} kanala da se suprostave vazokonstrukciji tokom dijabetesa je smanjena, dok se ekspresija α -subjedinice BK_{Ca} kanala takođe ne menja. Na pojedinim animalnim dijabetičnim modelima detektovana je nishodna regulacija ekspresije β 1 subjedinice (Hu i Zhang 2012). Sa druge strane, rezultati dobijeni na humanim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama arterija adipoznog tkiva nisu pokazali smanjenu ekspresiju ni α ni β 1 subjedinica BK_{Ca} kanala kod pacijenata sa dijabetesom tip 2. Poremećena aktivnost BK_{Ca} kanala u navedenom istraživanju kod dijabetesa tip 2 pripisana je smanjenoj interakciji između glavnih i regulatornih subjedinica (Nieves-Cintrón i sar., 2017). Primenom funkcionalnih, farmakoloških i elektrofizioloških ispitivanja demonstrirano je da je funkcija BK_{Ca} kanala tokom dijabetesa smanjena i da dolazi do redukcije Ca²⁺-iskri i BK_{Ca}-posredovanih struja. Zanimljivo, primećeno je da umereno vežbanje i trening mogu da spreče nastanak ovih promena, što potvrđuje značaj fizičkog vežbanja u terapiji GDM. Dodatno, primena superoksid-dizmutaze i katalaze može da obnovi BK_{Ca}-posredovanu vazodilataciju krvnih sudova pružajući zanimljivu perspektivu za prevenciju i lečenje ne samo GDM, već i drugih tipova dijabetesa, a naročito njihovih vaskularnih komplikacija (Erdos i sar. 2004; Mokolke i sar., 2005).

Da bi se ispitala umešanost K_v kanala u pinacidilom izazvanoj vazorelaksaciji humanih umbilikalnih vena korišćen je 4-AP, koji u koncentraciji od 1 mM, predstavlja nespecifični blokator ovih kanala. Antagonizam pinacidilom izazvane relaksacije u normalnoj trudnoći posle primene ove supstance potvrđuje učešće K_v kanala u dejstvu pinacidila. Sa druge strane, odsustvo

inhibicije funkcionalnog odgovora na pinacidil u oba patološka stanja upućuje na zaključak da tokom gestacijskog dijabetesa i hipertenzije dolazi do oštećenja funkcije K_v kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama humanih umbilikalnih vena. Rezultati dobijeni na placentalnim arterijama i venama horionskih ploča kod trudnoća komplikovanih intrauterinom restrikcijom rasta pružaju slične zaključke. Ovde su autori demonstrirali da je venska, ali ne i arterijska kontraktilnost povećana. Takođe, 4-AP je bio manje efikasan u izazivanju kontrakcije u oba vaskularna odeljka, što ukazuje na redukovanu aktivnost K_v kanala (Wareing i sar., 2006; Wareing 2014).

Promene funkcije K_v kanala tokom hiperglikemije i dijabetesa na različitim krvnim sudovima ispitivane su ranije. Na koronarnim arterijama izloženim visokim nivoima glukoze 4-AP senzitivne struje i funkcionalni odgovor na 4-AP bili su značajno oštećeni. I u slučaju K_v kanala pokazano je da povećan oksidativni stres izazvan hiperglikemijom smanjuje njihovu funkciju. Demonstrirano je da su na ove uticaje najviše osetljivi članovi K_v1 podfamilije i to $K_v1.3$, $K_v1.4$ i $K_v1.5$, a da su $K_v1.2$, $K_v2.1$ i $K_v4.1$ kanali rezistentni. Takođe, pokazano je da se i K_v struje mogu parcijalno obnoviti antioksidantnim tretmanom (primenom superoksid-dizmutaze i katalaze) (Gutterman i sar., 2005; Ko i sar., 2010). Mehanizmi najodgovorniji za oštećenje K_v kanala na animalnim modelima dijabetesa tip 1 uključivali su smanjenje njihove ekspresije i/ili funkcije nitracijom subjedinica K_v kanala, slobodnim radikalima i PKC-posredovanim oštećenjem funkcije K_v kanala (Jackson, 2018). Sa druge strane u ranim fazama dijabetes melitusa tip 2 na mezenteričnim arterijama pacova uočeno je povećanje ekspresije određenih subjedinica K_v kanala, kao što su $K_v1.1$, $K_v1.2$ i $K_v1.4$ (Dogan i sar., 2019). Da bi se analizirao značaj pojedinih podtipova K_v kanala u antagonizmu koji je izazvao 4-AP u ovom istraživanju, primenjen je margatoksin, agens sa najvećim afinitetom za $K_v1.2$ i $K_v1.3$ kanale, a koji u većim dozama deluje i na $K_v1.1$ kanale (Bartok i sar., 2014). Margatoksin je izazvao statistički značajno pomeranje koncentracijski zavisne krive za pinacidil udesno u zdravim trudnoćama, dok u GDM grupi nije bilo promena. Ekspresija $K_v1.2$ i $K_v1.3$ subjedinica na dijabetičnim venama bila je nepromenjena u odnosu na normalnu trudnoću. Na osnovu ovoga može se izvesti zaključak da je oštećenje ovih podtipova K_v kanala humanih umbilikalnih vena tokom gestacijskog dijabetesa funkcionalne prirode i najverovatnije se može pripisati hiperglikemijom-izazvanoj produkciji superoksida i peroksinitrita, pa su dodatna istraživanja neophodna. U studiji na koronarnim arterijama pacova pokazano je da do redukcije K_v struja dolazi zbog specifične nitracije $K_v1.2$ subjednice, bez promena u njenoj ekspresiji, i posledičnog oštećenja K_v kanala, kao i zbog gubitka cAMP-posredovane vazodilatacije (Li i sar., 2004).

Brojni dokazi sugerišu da K_v kanali mogu biti modulisani ekstracelularnom koncentracijom glukoze preko glukoza-zavisnog povećanja aktivnosti PKC. Još uvek je nejasno da li do ovoga

dolazi zbog fosforilacije K_v kanala i/ili nekim drugim PKC-posredovanim putevima (Nieves-Cintron i sar., 2018). Tako, u centralnom nervnom sistemu povećanje lokalnog cerebralnog protoka krvi izazvano neuronskom aktivnošću se javlja da bi se obezbedilo snabdevanje aktivnijih neurona glukozom i kiseonikom. Zanimljive su spekulacije da bi modulacija aktivnosti K_v kanala u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama mogla da bude vaskularni mehanizam očitavanja glukoze u mozgu. U uslovima dijabetesa, neurovaskularne i kognitivne funkcije mogu da budu poremećene i u takvim slučajevima, izmenjeni vaskularni tonus i reaktivnost zbog oštećenja K_v struja vrlo verovatno doprinose neurovaskularnoj disfunkciji (Straub i sar., 2009). Može se pretpostaviti da K_v kanali ostvaruju slične uloge i u drugim vaskularnim odeljcima, uključujući i fetoplacentalnu cirkulaciju, a dodatna istraživanja na tom polju mogu potencijalno dati vrlo interesantne rezultate i biti od izuzetnog značaja.

Funkcija i alteracije K_v kanala u hipertenziji i dalje su prilično nejasne s obzirom na veoma raznovrsne i oprečne rezultate dosadašnjih istraživanja. Na primer *patch clamp* studije su zabeležile povećane, smanjene i nepromenjene K_v struje u različitim vaskularnim odeljcima tokom hipertenzije. Slično tome, registrovana je povećana, smanjena i nepromenjena ekspresija subjednica ovih kanala na glatkim mišićnim ćelijama različitih hipertenzivnih eksperimentalnih modela (Jackson, 2018). U ovom istraživanju margatoksin je izazvao statistički značajno pomeranje koncentracijski zavisne krive za pinacidil udesno u zdravim trudnoćama, dok u PIH grupi nije bilo promena. Ekspresija $K_v1.2$ subjednica je ostala nepromenjena, dok je ekspresija $K_v1.3$ subjednica na hipertenzivnim venama bila značajno smanjena u odnosu na normalnu trudnoću. Gubitak antagonizma margatoksina u PIH grupi u skladu je sa smanjenom ekspresijom $K_v1.3$ subjednica K_v kanala i može se doneti zaključak da su ovi kanali od velikog značaja za regulaciju vaskularnog tonusa humanih umbilikalnih vena i za suprotstavljanje vazokonstrukciji. Na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama torakalnih aorti spontano hipertenzivnih pacova, pokazano je da vežbanje i trening mogu dovesti do reverzije smanjene ekspresije različitih subjednica K_v kanala (Li i sar., 2015). Na nekim animalnim modelima hipertenzije dokazano je da povećan ulazak Ca^{2+} kroz L-Ca kanale i povećani citoplazmatski Ca^{2+} izazivaju inaktivaciju K_v1 kanala, što rezultuje depolarizacijom membrane glatkih mišićnih ćelija i vazokonstrukcijom, nezvano za promene u ekspresiji K_v kanala. Ovo može predstavljati značajan dodatni mehanizam redukcije K_v struja u hipertenziji (Cox i Petrou, 1999).

K_v1.3 kanali izuzetno su zanimljiv podtip K_v kanala i našli su se u žiži interesovanja brojnih istraživača kada je pokazano da mogu imati važnu ulogu u proliferaciji ćelija. Pored toga što izazivaju proliferaciju ćelija imunog sistema, naročito T limfocita, i glija ćelija centralnog nervnog sistema, od posebnog značaja za ovo istraživanje je to što je pokazano da im se ekspresija povećava i u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, što menja njihovu plastičnost i uzrokuje dediferencijaciju, proliferaciju, migraciju i neointimalnu hiperplaziju (Perez Garcia i sar., 2017). Osim na različitim animalnim modelima, ove promene su demonstrirane i na humanoj veni safeni (Cheong i sar., 2010). Precizan mehanizam kojim K_v1.3 kanali transformišu fenotip ćelija u proliferativni nije rasvetljen, a predloženo je više mehanizama čija objašnjenja prevazilaze okvire ovog istraživanja (Perez Garcia i sar., 2017). Proliferacija i hiperplazija vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, kao i remodelacija vaskularnog zida uočeni su i na humanim umbilikalnim venama tokom PIH (Koech i sar., 2008). Međutim, kao što je već navedeno, u ovom istraživanju registrovana je smanjena ekspresija K_v1.3 subjedinica, što sugerise da u mediji humanih umbilikalnih vena ovi kanali najverovatnije nemaju ulogu u proliferaciji ćelija i vaskularnom remodelovanju, već da imaju ulogu tipičnih K_v kanala u krvnim sudovima – da izazivaju hiperpolarizaciju i da se suprotstavljaju vazokonstrukciji. Ohanyan i saradnici (2017) su demonstrirali da K_v1.3 ostvaruju značajnu ulogu u povezivanju metabolizma i srčanog krvnog protoka, odnosno da imaju ulogu u izazivanju vazodilatacije tokom povećanog srčanog rada. S obzirom na činjenicu da humana umbilikalna vena nije samo pasivni sprovodni krvni sud već je sposobna i da prilagođava svoj vaskularni tonus pod dejstvom različitih lokalnih faktora, sasvim je moguće da K_v1.3 kanali u humanim umbilikalnim venama obavljaju slične zadatke u slučaju povećanih metaboličkih zahteva fetusa, i da njihov gubitak tokom hipertenzije, uočen u ovom istraživanju, doprinosi povećanju hipoksije i nastanku neželjenih ishoda trudnoće.

Da bi se testirala umešanost K_v4.2 i K_v4.3 kanala u vazorelaksantnom dejstvu pinacidila na humanim umbilikalnim venama, upotrebljen je selektivni blokator ovih kanala friksotoksin. U ovom istraživanju friksotoksin (12.5 nM) nije antagonizovao efekte pinacidila ni u jednoj od eksperimentalnih grupa, čime se isključuje učešće K_v4.2 i K_v4.3 u mehanizmu dejstva pinacidila.

Pored do sada opisanih dejstava dokazano je da pinacidil, posebno ukoliko se primeni u višim koncentracijama ($\geq 100 \mu\text{M}$), koje su korišćene i u ovom istraživanju, pokazuje i mehanizme dejstva nezavisne od K kanala. Ovi mehanizmi do danas nisu u potpunosti rasvetljeni, a neke pretpostavke su da u njih spadaju: stimulacija Na⁺-K⁺ pumpe, stimulacija sarkolemalnog mehanizma ekstruzije Ca²⁺ i Ca²⁺-ATP-aze, stimulacija Na⁺-Ca⁺ razmenjivača, direktna inhibicija sarkolemalnih Ca²⁺ kanala, inhibicija fosfolipaze C i smanjenje produkcije inozitol-3-fosfata, inhibicija intracelularne mobilizacije Ca²⁺, smanjenje senzitivnosti kontraktilnih proteina na Ca²⁺,

inhibicija Ca^{2+} -nezavisne provodljivosti hlorida, aktivacija signalnih puteva zavisnih od cikličnih nukleotida i/ili modulacija PKC-posredovane kontrakcije (Barber i Henderson, 1996; Tsang i sar., 2003; Stojnic i sar., 2007). Da bi se istakao doprinos K-nezavisnih mehanizama dejstva pinacidila korišćen je rastvor visoke koncentracije K^+ . Povećanje ekstracelularne koncentracije K^+ redukuje njegov transmembranski gradijent, pa se na taj način eliminišu dejstva pinacidila zavisna od K kanala (Protić i sar., 2014). U normalnoj trudnoći vazorelaksantni odgovor na pinacidil u humanim umbilikalnim venama prekontrahevanim sa 100 mM K^+ bio je statistički značajno inhibiran, dok je maksimalni odgovor ostao nepromenjen. Na ovaj način postojanje K-nezavisnih mehanizama dejstva pinacidila u humanoj umbilikalnoj veni definitivno je potvrđeno. U GDM-u i PIH-u rastvor 100 mM K^+ takođe je doveo do značajne inhibicije vazorelaksantnog odgovora na pinacidil, ali je u ovom slučaju bio praćen i značajnom supresijom maksimalnih odgovora. Maksimalni odgovor je bio smanjen kako u odnosu na serotoninom prekontrahevanu kontrolu, tako i u odnosu na normalnu trudnoću. Dobijeni rezultati upućuju na zaključak da su i K-nezavisni mehanizmi dejstva pinacidila oštećeni tokom GDM i PIH. Povećane aktivnosti PKC i Rho-kinaze uz pojačanu osetljivost kontraktilnih elemenata na Ca^{2+} , koje su registrovane kod žena sa preeklampsijom, neke su od brojnih spekulacija kojima može da se tumači smanjena reaktivnost prema pinacidilu tokom PIH (Zhu i sar., 2013). Međutim, tačna identifikacija K-nezavisnih mehanizama dejstva pinacidila, kao i ispitivanje mogućnosti poremećaja funkcije drugih unutarćelijskih signalnih puteva koji učestvuju u modulaciji membranskih K_{ATP} kanala na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama humanih umbilikalnih vena tokom GDM i PIH, zahteva detaljna dodatna istraživanja koja vrlo verovatno mogu doprineti rasvetljenju patogeneze oba patološka stanja i/ili obezbediti nove lekove za njihovu terapiju.

6. ZAKLJUČCI

Glavni zaključci koji proizilaze iz ovog doktorskog rada su:

- Gestacijski dijabetes melitus značajno smanjuje relaksaciju humanih umbilikalnih vena izazvanu pinacidilom, dok u hipertenzivnim venama vazodilatatorni odgovor izazvan pinacidilom ostaje nepromenjen.
- Ekspresija Kir6.1 subjedinice K_{ATP} kanala statistički je značajno smanjena u oba patološka stanja u poređenju sa zdravim trudnoćama, što ukazuje na smanjenu ekspresiju ovih kanala tokom gestacijskog dijabetesa i hipertenzije. Ekspresija SUR2B subjedinice nije promenjena.
- Smanjeni funkcionalni odgovor venskih segmenata na pinacidil tokom gestacijskog dijabetesa u skladu je sa smanjenom ekspresijom K_{ATP} kanala, a očuvanje ovog odgovora u hipertenziji može se, barem delimično, objasniti dodatnim K_{ATP} -nezavisnim dejstvima pinacidila.
- Primena oralnih antidijabetika iz grupe derivata sulfonilureje u terapiji gestacijskog dijabetesa može biti štetna s obzirom da prisustvo glibenklamida tokom dijabetesa smanjuje osetljivost humane umbilikalne vene na pinacidil, a možda i na endogene vazodilatatore koji koriste iste mehanizme dejstva i signalne puteve.
- Iberiotoksin, selektivni blokator BK_{Ca} kanala, prouzrokovao je statistički značajno pomeranje koncentracijski-zavisne krive za pinacidil udesno u trudnoćom izazvanoj hipertenziji, dok u normalnoj trudnoći i dijabetesu to nije bio slučaj. Ovakav rezultat sugeriše da tokom hipertenzije dolazi do ushodne regulacije BK_{Ca} kanala. Zbog toga što ekspresija $BK-\alpha$ subjedinice, koja formira poru BK_{Ca} kanala, ostaje ista u svim eksperimentalnim grupama, pretpostavka je da je ova ushodna regulacija funkcionalne prirode i najverovatnije je posledica promenjene interakcije sa pomoćnim, regulatornim subjedinicama. Ovo zahteva dodatna ispitivanja.
- 4-aminopiridin, nespecifični blokator K_v kanala, antagonizovao je pinacidilom izazvanu relaksaciju humanih umbilikalnih vena u normalnoj trudnoći što potvrđuje učešće K_v kanala u dejstvu pinacidila. Sa druge strane, odsustvo inhibicije funkcionalnog odgovora na pinacidil u obe bolesti implicira da tokom gestacijskog dijabetesa i hipertenzije dolazi do oštećenja funkcije K_v kanala.

- Margatoksin, selektivni blokator $K_v1.2$ i $K_v1.3$ kanala, takođe je antagonizovao pinacidilom izazvanu relaksaciju humanih umbilikalnih vena samo u zdravim trudnoćama. Molekularna analiza K proteina pokazala je očuvanu ekspresiju $K_v1.2$ subjedinice u oba patološka stanja, a smanjenu ekspresiju $K_v1.3$ subjedinice K_v kanala na hipertenzivnim venama. Ovo je u skladu sa gubitkom antagonizma margatoksina u hipertenziji. Gubitak antagonizma margatoksina tokom dijabetesa verovatno je posledica smanjenja aktivnosti kanala usled hiperglikemije i povećanog oksidativnog stresa.
- Primena rastvora visoke koncentracije K^+ potvrdila je prisustvo K-nezavisnih mehanizama dejstva pinacidila. Statistički značajno smanjenje maksimalnih odgovora na pinacidil na venskim segmentima u oba patološka stanja ukazuje da su i K-nezavisni mehanizmi dejstva pinacidila oštećeni. Njihova precizna identifikacija može doprineti potpunom razumevanju patogeneze oba patološka stanja i/ili obezbediti nove lekove za njihovu terapiju.

7. LITERATURA

Acharya G, Sonesson SE, Flo K, Räsänen J, Odibo A. Hemodynamic aspects of normal human fetoplacental (umbilical) circulation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2016;95:672-682.

Adams EJ, Green JA, Clark AH, Youngson JH. Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *J Clin Pathol* 1999;52:75–77.

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, González G. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995;268(5209):423-6.

Akrouh A, Halcomb SE, Nichols CG, Sala-Rabanal M. Molecular biology of K(ATP) channels and implications for health and disease. *IUBMB Life* 2009;61:971–978.

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA, Veale EL, Striessnig J, Kelly E, Armstrong JF, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA; CGTP Collaborators. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. *Br J Pharmacol* 2019:142-228.

Amberg GC, Santana LF. Downregulation of the BK channel β 1 subunit in genetic hypertension. *Circ Res* 2003; 93:965–971.

American Diabetes Association: Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care* 2019;42(1):165-172.

Aschcroft FM. *Ion Channels and Disease*. Academic Press 2000.

Aziz Q, Thomas AM, Gomes J, Ang R, Sones W, Li Y, Ng K, Gee L, Tinker A. The ATP-sensitive potassium channel subunit, Kir6.1, in vascular smooth muscle plays a major role in blood pressure control. *Hypertension* 2014;64:523–529.

Balderas E, Zhang J, Stefani E, Toro L. Mitochondrial BKCa channel. *Front Physiol* 2015;6:104.

Barber RD, Henderson RM. Inhibition by P1075 and pinacidil of a calcium-independent chloride conductance in conditionally-immortal renal glomerular mesangial cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:772–778.

Barrett KE, Ganong WF. Ganong's review of medical physiology. New York: McGraw-Hill Medical;2012.

Bartok A, Toth A, Somodi S, Szanto TG, Hajdu P, Panyi G, Varga Z. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels. *Toxicon* 2014;87:6–16.

Beech DJ, Zhang H, Nakao K, Bolton TB. K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1993;110(2):573–582.

Berberoglu Z. Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *EMJ Diabet* 2019;7:97-106.

Bisseling TM, Versteegen MG, van derWal S, Copius Peerboom-Stegeman JJ, Borggreven JM, Steegers EA, van der Laak JA, Russel FG, Smits P. Impaired K_{ATP} channel function in the fetoplacental circulation of patients with type 1 diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:973-979.

Blanco M, Vega HR, Giuliano R, Grana DR, Azzato F, Lerman J, Milei J. Histopathology and histomorphometry of umbilical cord blood vessels. Findings in normal and high risk pregnancies. *Artery res* 2011;5:50–57.

Blanco-Rivero J, Gamallo C, Aras-López R, Cobeño L, Cogolludo A, Pérez-Vizcaino F, Ferrer M, Balfagon G. Decreased expression of aortic KIR6.1 and SUR2B in hypertension does not correlate with changes in the functional role of K(ATP) channels. *Eur J Pharmacol* 2008;587:204–208.

Börjesson SI, Elinder F. Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels. *Cell Biochem Biophys* 2008;52:149–174.

Brayden JE. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:317-323.

Brennan LJ, Morton JS, Davidge ST. Vascular dysfunction in preeclampsia. *Microcirculation* 2014;21:4-14

Bundalo M, Zivkovic M, Culafic T, Stojiljkovic M, Koricanac G, Stankovic A. Oestradiol treatment counteracts the effect of fructose-rich diet on matrix metalloproteinase 9 expression and NFκB activation. *Folia Biol* 2015;61:233–240.

- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:374–380.
- Campbell JD, Sansom MS, Ashcroft FM. Potassium channel regulation. *EMBO Rep* 2003;4(11):1038–1042.
- Carvalho de Souza JL, Varanda WA, Tostes RC, Chignalia AZ. BK Channels in Cardiovascular Diseases and Aging. *Aging Dis* 2013;4(1):38–49.
- Castle NA. Pharmacological modulation of voltage-gated potassium channels as a therapeutic strategy. *Expert Opin Ther Pat* 2010;20(11):1471–1503.
- Cheng J, Wen J, Wang N, Wang C, Xu Q, Yang Y Ion channels and vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:146–156.
- Cheong A, Li J, Sukumar P, Kumar B, Zeng F, Riches K, Munsch C, Wood IC, Porter KE, Beech DJ. Potent suppression of vascular smooth muscle cell migration and human neointimal hyperplasia by Kv1.3 channel blockers. *Cardiovasc Res* 2011;89:282–289.
- Chrissobolis S, Sobey CG. Inwardly rectifying potassium channels in the regulation of vascular tone. *Curr Drug Targets* 2003;4(4):281-9.
- Christensen KL, Mulvany MJ. Location of resistance arteries. *J Vasc Res* 2001;38(1):1-12.
- Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeno L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Serotonin inhibits voltage-gated K_{T} currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* 2006;98:931–938.
- Cox RH, Petrou S. Ca^{2+} influx inhibits voltage-dependent and augments Ca^{2+} -dependent K^{+} currents in arterial myocytes. *Am J Physiol* 1999;277:51–63.
- Cox RH. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys* 2005;42:167–195.
- Cui J, Yang H, Lee US. Molecular Mechanisms of BK Channel Activation. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(5):852-75.

Di Biase N, Balducci S, Lencioni C, Bertolotto A, Tumminia A, Dodesini AR, Pintaudi B, Marcone T, Vitacolonna E, Napoli A. Review of general suggestions on physical activity to prevent and treat gestational and pre-existing diabetes during pregnancy and in postpartum. *NMCD* 2019;29:115-126.

Di Cianni G., Miccoli R., Volpe L., Lencioni C., Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19:259–270.

Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V, Lanzillotti G, et al. Umbilical vein blood flow in fetuses with normal and lean umbilical cord. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;17:224–28.

Dick GM, Sanders KM. (Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice. *J Biol Chem* 2001;276:44835–44840.

Dogan, MF, Yildiz O, Arslan SO, Ulusoy KG. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. *Fund Clin Pharmacol* 2019;33:504–523.

Dopico AM. Ethanol sensitivity of BK(Ca) channels from arterial smooth muscle does not require the presence of the beta 1-subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284: C1468–C1480.

Dopico AM, Bukiya AN, Jaggar JH. Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflug Arch* 2018;470:1271–1289.

Edwards G, Félétou M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflug Arch Eur J Physiol* 2010;459(6):863–879.

Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 2010;90(2):559–605.

Erdos B, Simandle SA, Snipes JA, Miller AW, Busija DW. Potassium channel dysfunction in cerebral arteries of insulin-resistant rats is mediated by reactive oxygen species. *Stroke* 2004;35:964–969.

ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *European Heart Journal*, 2018;39(33):3021–3104.

- Feletou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol.* 2009;156:545–562.
- Felipe A, Vicente R, Villalonga N, Roura-Ferrer M, Martinez- Marmol R, Sole L, Ferreres JC, Condom E. Potassium channels: new targets in cancer therapy. *Cancer Detect Prev* 2006;30:375–385.
- Fisher CJ, Gillett CE, Vojtěšek B, Barnes DM, Millis RR. Problems with p53 immunohistochemical staining: The effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 1994;69:26–31.
- Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, Nichols CG. Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev* 2010;90:799–829.
- Friedel HA, Brogden RN. Pinacidil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the treatment of hypertension. *Drugs* 1990;39(6):929–67.
- Fujita A, Kurachi Y. Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacol Therapeut* 2000;85:39–53.
- Gao Q, Tang J, Li N, Zhou X, Zhu X, Li W, Liu B, Feng X, Tao J, Han B, Zhang H, Sun M, Xu Z. New conception for the development of hypertension in preeclampsia. *Oncotarget* 2016;7:78377-78395
- Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K_v channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 1994;33:6834–6839.
- Garcia-Huidobro DN, Garcia-Huidobro MT, Huidobro-Toro JP. Vasomotion in human umbilical and placental veins: role of gap junctions and intracellular calcium reservoirs in their synchronous propagation. *Placenta* 2007;28:328–338.
- Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 2004;142(1):192-202.
- Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:23–30.

George EM, Granger JP. Recent insights into the pathophysiology of preeclampsia. *Expert Rev Obstet Gynecol* 2010;5:557–566.

Gill RW, Kossoff G, Warren PS, Garrett WJ. Umbilical venous flow in normal and complicated pregnancy. *Ultrasound Med Biol* 1984;10(3):349–63.

Gojković Bukarica Lj, Kažić T. Jonski kanali i kanalopatije. U: Kažić T, Ostojić M. *Klinička kardiovaskularna farmakologija*. 5. izd. Beograd: Integra 2009:47–69.

Gojkovic-Bukarica Lj, Savic N, Peric M, Markovic-Lipkovski J, Cirovic S, Kanjuh V, Cvejic J, Atanackovic M, Lesic A, Bumbasirevic M, Heinle H. Effect of potassium channel opener pinacidil on the contractions elicited electrically or by noradrenaline in the human radial artery. *Eur J Pharmacol* 2011;654(3):266–273.

Greenwood IA, Yeung SY, Tribe RM, Ohya S. Loss of functional K⁺ channels encoded by ether-à-go-go-related genes in mouse myometrium prior to labour onset. *J Physiol* 2009;587(10):2313–2326.

Gribkoff VK, Starrett JE Jr, Dworetzky SI. The pharmacology and molecular biology of large conductance calcium-activated (BK) potassium channels. *Adv Pharmacol* 1997;37: 319–348.

Gurney A, Manoury B. Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *Eur Biophys J* 2009;38(3):305-18

Gutterman DD, Miura H, Liu Y. Redox modulation of vascular tone: Focus of potassium channel mechanisms of dilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:671–678.

Haas TL. Shaping and remodeling of the fetoplacental circulation: aspects of health and disease. *Microcirculation* 2014;21:1–3.

Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2011.

Hayabuchi Y, Standen NB, Davies NW. Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K_t channels of rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 2001;281:2480–2489.

Hecker M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor— Fact or Fiction? *News Physiol Sci* 2000;15:1-5.

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010;90(1):291-366.

Hill MA, Yang Y, Ella SR, Davis MJ, Braun AP. Large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS Lett* 2010;584:2033–2042.

Hille B. *Ion channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc; 2001.

Hu XQ, Zhang L. Function and regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today* 2012;17:974–987.

Iida H, Jo T, Iwasawa K, Morita T, Hikiji H, et al. Molecular and pharmacological characteristics of transient voltage-dependent K_T currents in cultured human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2005;146:49–59.

Immke D, Wood M, Kiss L, Korn SL. Potassium-dependent changes in the conformation of the Kv2.1 potassium channel pore. *J Gen Physiol* 1999;113:819–836.

Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 2000;35:173–178.

Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 2005;12:113-127.

Jackson WF. K_V channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation* 2018;25:e12421.

Jenkinson DH. Potassium channels - multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol* 2006;147:63-71.

Jespersen B, Tykocki NR, Watts SW, Cobbett P. Measurement of Smooth Muscle Function in the Isolated Tissue Bath-Applications to Pharmacology Research. *J Vis Exp* 2015;95:52324.

Joseph BK, Thakali KM, Moore CL, Rhee SW. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches. *Pharmacol Res* 2013;70(1):126-38.

Kaczmarek LK, Aldrich RW, Chandy KG, Grissmer S, Wei AD, Wulff H. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. C. Nomenclature and properties of calcium-activated and sodium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2017;69:1–11.

- Kažić T, Gojković Bukarica Lj. Ion channels and drug development, focus on potassium channels and their modulators. *Facta Universitatis* 1999;6(1):23-30.
- 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;178:1027–1034.
- Kibble JD, Halsey CR. *Medicinska fiziologija: klinički kontekst*. Beograd: Data Status 2013:1-28.
- Kim JB. Channelopathies. *Korean J Pediatr* 2014;57:1-18.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of potassium channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 2008;44:65–81.
- Ko EA, Park WS, Firth AL, Kim N, Yuan JX, Han J. Pathophysiology of voltage gated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. *Prog Biophys Mol Bio* 2010;103:95-101.
- Koech A, Ndungu B, Gichangi P. Structural changes in umbilical vessels in pregnancy induced hypertension. *Placenta* 2008;29:210–214.
- Köhler R, Kaistha BP, Wulff H. Vascular K_{Ca}-channels as therapeutic targets in hypertension and restenosis disease. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(2):143-55.
- Korovkina VP, England SK. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29(4):317–323.
- Kyle BD, Braun AP. The regulation of BK channel activity by pre- and post-translational modifications. *Front Physiol* 2014;5:316.
- Landry DW, Oliver JA. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J Clin Invest* 1992;89:2071-4
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:69-78.
- Lee KW, Ching SM, Ramachandran V, Yee A, Hoo FK, Chia YC, Wan Sulaiman WA, Suppiah S, Mohamed MH, Veettil SK. Prevalence and risk factors of gestational diabetes mellitus in Asia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 2018;18(1):494.

- Lee US, Shi J, Cui J. Modulation of BK Channel Gating by the $\alpha 2$ Subunit Involves Both Membrane-Spanning and Cytoplasmic Domains of Slo1. *J Neurosci* 2010;30: 16170–16179.
- Li H, Gutterman DD, Rusch NJ, Bubolz A, Liu Y. Nitration and functional loss of voltage-gated K^+ channels in rat coronary microvessels exposed to high glucose. *Diabetes* 2004;53:2436–2442.
- Li A, Knutsen RH, Zhang H, Osei-Owusu P, Moreno-Dominguez A, Harter TM, Uchida K, Remedi MS, Dietrich HH, Bernal-Mizrachi C, et al. Hypotension due to Kir6.1 gain-of-function in vascular smooth muscle. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000365.
- Li Z, Lu N, Shi L. Exercise training reverses alterations in K_v and BK_{Ca} channel molecular expression in thoracic aorta smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 2014;51:447–457.
- Li H, Shin S, Seo M, An J, Ha K, Han E, Hong S, Kim J, Yim M, Lee J, et al. Alterations of ATP-sensitive K^+ channels in human umbilical arterial smooth muscle during gestational diabetes mellitus. *Pflug Arch Eur J Phy* 2018;470(9):1325-1333.
- Li Q, Yan J. Modulation of BK Channel Function by Auxiliary Beta and Gamma Subunits. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc 2016;128:51–90.
- Liu X, Duan P, Hu X, Li R, Zhu Q. Altered KATP channel subunits expression and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats with age. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016;68:143–149.
- Loussouarn G, Rose T, Nichols CG. Structural basis of inward rectifying potassium channel gating. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:253-258.
- Lu Z, Klem AM, Ramu Y. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 2001;413:809–813.
- Ma R, Liu J, Wu L, Sun J, Yang Z, Yu C, Yuan P, Xiao X. Differential expression of placental 11β -hydroxysteroid dehydrogenases in pregnant women with diet-treated gestational diabetes mellitus. *Steroids* 2012;77:798–805.
- MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Letters* 2003;555:62-65.

- Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E, von Dadelszen P. Diagnosis, Evaluation, and Management of the Hypertensive Disorders of Pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can* 2014;36:416–438.
- Mathie A, Al-Moubarak E, Veale EL. Gating of two pore domain potassium channels. *J Physiol* 2010;588(17):3149-3156.
- Meech RW. Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1972;42(2):493–9.
- Mildenberger E, Siegel G, Versmold HT. Oxygen-dependent regulation of membrane potential and vascular tone of human umbilical vein. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:696–700.
- Miller C. An overview of potassium channel family. *Genome Biology* 2000;1:1-5.
- Mirghani Dirar A, Doupis J. Gestational diabetes from A to Z. *World J Diabetes* 2017;8(12):489–511.
- Mladenovic V, Djukic A, Varjačić M, Macut Dj. Gestacijski diabetes mellitus. *Med Čas (Krag)* 2016;50(1):26-32.
- Mokelke EA, Dietz NJ, Eckman DM, Nelson MT, Sturek M. Diabetic dyslipidemia and exercise affect coronary tone and differential regulation of conduit and microvessel K^+ current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:1233–1241.
- Moreau C, Jacquet H, Prost A-L, D'hahan N, Vivaudou M. The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *The EMBO Journal* 2000;19(24):6644-6651.
- Moshiri M, Zaidi SF, Robinson TJ, Bhargava P, Siebert JR, Dubinsky TJ, Katz DS. Comprehensive imaging review of abnormalities of the umbilical cord. *Radiographics* 2014;34(1):179–96.
- Nacionalni komitet za izradu vodiča kliničke prakse: radna grupa za dijabetes. Diabetes mellitus – Nacionalni vodič dobre kliničke prakse. II izd. Beograd: agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije, 2012.
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol.* 1990;259:3–18.

Nelson MT, Cheng H, Rubart M. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995;270(5236):633–637.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;268:799–822.

Nelson CP, Rainbow RD, Brignell JL. Principal role of adenylyl cyclase 6 in K1 channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2011;91:694-702.

Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D. Genetic Manipulation of Cardiac K⁺ Channel Function in Mice: What Have We Learned, and Where Do We Go from Here? *Circ Res* 2001;89:944–956.

Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ Res* 1999;85:e33–e43.

Nieves-Cintrón M, Syed AU, Buonarati OR, Rigor RR, Nystoriak MA, Ghosh D, Sasse KC, Ward SM, Santana LF, Hell JW, Navedo MF. Impaired BK_{Ca} channel function in native vascular smooth muscle from humans with type 2 diabetes. *Sci Rep* 2017;7:14058.

Nieves-Cintrón M, Syed AU, Nystoriak MA, Navedo MF. Regulation of voltage-gated potassium channels in vascular smooth muscle during hypertension and metabolic disorders. *Microcirculation* 2018;25:e12423.

Nimigean, C. M., Magleby, K. L., 2002. The β Subunit Increases the Ca²⁺ Sensitivity of Large Conductance Ca²⁺-activated Potassium Channels by Retaining the Gating in the Bursting States. *J. Gen. Physiol.*, 113, 425–440.

Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983;305(5930):147-8.

Novakovic A, Pavlovic M, Milojevic P, Stojanovic I, Nenezic D, Jovic M, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Different potassium channels are involved in relaxation of rat renal artery induced by P1075. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;111(1):24-30.

Novaković R, Radunović N, Marković-Lipkovski J, Ćirović S, Beleslin-Čokić B, Ilić B, Ivković B, Heinle H, Živanović V, Gojković-Bukarica LJ. Effects of the polyphenol resveratrol on contractility of human term pregnant myometrium. *Mol Hum Reprod* 2015;21:545–551.

Ohanyan V, Yin L, Bardakjian R, Kolz C, Enrick M, Hakobyan T, Luli J, Graham K, Khayata M, Logan S, Kmetz J, Chilian WM. Kv1.3 channels facilitate the connection between metabolism and blood flow in the heart. *Microcirculation* 2017;24.

Ohya S, Sergeant GP, Greenwood IA, Horowitz B. Molecular variants of KCNQ channels expressed in murine portal vein myocytes: a role in delayed rectifier current. *Circ Res* 2003;92(9):1016–1023.

Olaya-C M, Salcedo-Betancourt J, Galvis SH, Ortiz AM, Gutierrez S, Bernal JE. Umbilical cord and preeclampsia. *J Neonatal Perinatal Med* 2016;9(1):49-57.

Pallotta BS. Calcium-activated potassium channels in rat muscle inactivate from a short-duration open state. *J Physiol* 1985;363:501–16.

Pérez GJ, Bonev AD, Patlak JB, Nelson MT. Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Gen Physiol* 1999;113(2):229–238.

Perez-Garcia MT, Ciudad P, Lopez-Lopez J. The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2018;314:C27–42.

Pinterova M, Kunes J, Zicha J. Altered neuronal and vascular mechanisms in hypertension. *Physiol Res* 2011;30:381-402.

Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3342.

Pongs O, Schwarz JR. Ancillary Subunits Associated With Voltage-Dependent K⁺ Channels. *Physiol Rev* 2010;90:755-796.

Protić D, Beleslin-Čokić B, Spremović-Rađenović S, Radunović N, Heinle H, Šćepanović R, Gojković Bukarica L. The different effects of resveratrol and naringenin on isolated human umbilical vein: the role of ATP-sensitive K⁺ channels. *Phytother Res* 2014;28:1412–1418.

Protić D, Todorović Z, Gojković-Bukarica L. Kalijumovi kanali kao ciljno mesto za delovanje lekova u terapiji kardiovaskularnih oboljenja: 25 godina kasnije. *Sanamed* 2013;8:71-78.

Ptacek LJ, Fu YH. Channels and disease: past, present, and future. *Arch Neurol* 2004;61:1665-8.

Pugnaloni A, Salvolini E, Lucarini G, Staffolani R, Cester N, Mazzanti L, Castaldini C, Tietz C, Biagini G, Romanini C. The Human Umbilical Vein in Normal, Hypertensive and Diabetic Pregnancies: Immunomorphological and Ultrastructural Evidence. *Gynecol Obstet Invest* 1995;39:239-246.

Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 1997;77:1165–1232.

Radenković M, Grbović L, Radunović NV, Momčilov P. Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep* 2007;59:64-73.

Rakocevic J, Kojic S, Orlic D, Stankovic G, Ostojic M, Petrovic O, Zaletel I, Puskas N, Todorovic V, Labudovic-Borovic M. Co-expression of vascular and lymphatic endothelial cell markers on early endothelial cells present in aspirated coronary thrombi from patients with ST-elevation myocardial infarction. *Exp Mol Pathol* 2016;100:31–38.

Rayanagoudar G, Hashi AA, Zamora J, Khan KS, Hitman GA, Thangaratnam S. Quantification of the type 2 diabetes risk in women with gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis of 95,750 women. *Diabetologia* 2016;59:1403–1411.

Rouse CE, Eckert LO, Wylie BJ, Lyell DJ, Jeyabalan A, Kochhar S, McElrath TF, Group BCPW. Hypertensive disorders of pregnancy: case definitions & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine* 2016;34:6069.

Rubaiy HN. The therapeutic agents that target ATP-sensitive potassium channels. *Acta Pharm* 2016;66(1):23–34.

Ryu RJ, Hays KE, Hebert MF. Gestational diabetes mellitus management with oral hypoglycemic agents. *Semin Perinatol* 2014;38(8):508-515.

Sandhiya S, Dkhar SA. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res* 2009;129:223-232.

Senyon C. Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience* 2002;3:115-121.

Shad KF, Salman S, Afridi S, Tariq M, Asghar S. Introductory chapter; Ion channels. In: KF Shad, ed. *Ion Channels in Health and Sickness*. ISBN: 978-1-78984-228-9, InTech, doi.org/10.5772/intechopen.72025; 2018.

Shi WW, Yang Y, Yun S, Chun J. K_{ATP} channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases. *Sheng Li Xue Bao: Acta Physiol Sin* 2012;64(1):1-13.

Singh SD. Gestational diabetes and its effect on the umbilical cord. *Early Hum Dev* 1986;14(2):89–98.

Smirnov SV, Beck R, Tamaro P, Ishii T, Aaronson PI. Electrophysiologically distinct smooth muscle cell subtypes in rat conduit and resistance pulmonary arteries. *J Physiol* 2002;538:867–878.

Smith PD, Brett SE, Luykenaar KD, Sandow SL, Marrelli SP, Vigmond EJ, Welsh DG. K_{IR} channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle. *J Physiol* 2008;586:1147–1160.

Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(1):28-38.

Sorensen CM, Braunstein TH, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:505-518.

Spurway J, Logan P, Pak S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *Australas J Ultrasound Med* 2015;15(3):97-102.

Standen NB, Quayle JM. K^+ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 1998;164(4):549–557.

Stockbridge N, Zhang H, Weir B. Effects of K^+ channel agonists cromakalim and pinacidil on rat basilar artery smooth muscle cells are mediated by Ca^{++} activated K^+ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:172–178.

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;104:122–129.

Straub SV, Girouard H, Doetsch PE, Hannah RM, Wilkerson MK, Nelson MT. Regulation of intracerebral arterial tone by Kv channels: effects of glucose and PKC. *Physiol Cell Psysiol* 2009;297:788-796.

Szûts V, Ötvös F, Dézsi L, Vágvölgyi C, Szalontai B, Dobrzynski H, et al. What have we learn from two-pore potassium channels? Their molecular configuration and function in the human heart. *Acta Biologica Szegediensis* 2012;56(2):93-107.

Tajada S, Ciudad P, Moreno-Domínguez A, Pérez-García MT, López-López JR. High blood pressure associates with the remodelling of inward rectifier K⁺ channels in mice mesenteric vascular smooth muscle cells. *J Physiol* 2012;590(23):6075-6091.

Tanbe AF, Khalil RA. Circulating and vascular bioactive factors during hypertension in pregnancy. *Curr Bioact Compd* 2010;6:60–75.

Taricco E, Radaelli T, Rossi G, Nobile De Santis MS, Bulfamante GP, Avagliano, L, Cetin I. Effects of gestational diabetes on fetal oxygen and glucose levels in vivo. *BJOG* 2009;116(13):1729–1735.

Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol* 2006;572(3):617–624.

Thorne GD, Conforti L, Paul RJ. Hypoxic vasorelaxation inhibition by organ culture correlates with loss of Kv channels but not Ca(2+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:247–253.

Toljic M, Egic A, Munjas J, Karadzov Orlic N, Milovanovic Z, Radenkovic A, Vuceljic J, Joksic I. Increased oxidative stress and cytokines-block micronucleus cytome assay parameters in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension. *Reprod Toxicol* 2017;71:55–62.

Tsang SY, Yao X, Wong CM, Au CL, Chen ZY, Huang Y. Contribution of Na⁺-Ca²⁺ exchanger to pinacidil-induced relaxation in the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2003;138:453–460.

Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol* 2017;7(2): 485–581.

Veličković Radovanović T, Cvetković T, Mitić B, Stefanović N. Antihipertenzivna terapija u trudnoći. *Biomedicinska istraživanja* 2011;2(2):65-71.

Ville Y, Sideris I, Hecher K, Snijders RJ, Nicolaides KH. Umbilical venous pressure in normal, growth-retarded, and anemic fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:487–94.

Wareing M, Greenwood SL, Fyfe GK, Baker PN. Reactivity of Human Placental Chorionic Plate Vessels from Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Restriction (IUGR). *Biol Reprod* 2006;75:518–523.

Wareing M. Oxygen sensitivity, potassium channels, and regulation of placental vascular tone. *Microcirculation* 2014;21(1):58–66.

Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H. International Union of Pharmacology. LII Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:463–472.

Werner EM, Ledoux J. K^+ channels in biological processes: vascular K^+ channels in the regulation of blood pressure. *J Receptor Ligand Channel Res* 2014;7:51-60.

Wulff H, Köhler R. Endothelial small-conductance and intermediate-conductance KCa channels: an update on their pharmacology and usefulness as cardiovascular targets. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013;61(2):102–112.

Xiao D, Longo LD, Zhang L. Role of $KATP$ and L-type Ca^{2+} channel activities in regulation of ovine uterine vascular contractility: effect of pregnancy and chronic hypoxia. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:596–512.

Yan J, Olsen JV, Park KS, Li W, Bildl W, Schulte U, Aldrich RW, Fakler B, Trimmer JS. Profiling the phospho-status of the $BKCa$ channel α subunit in rat brain reveals unexpected patterns and complexity. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:2188–2198.

Yang J, Krishnamoorthy G, Saxena A, Zhang G, Shi J, Yang H, et al. An epilepsy/ dyskinesia-associated mutation enhances BK channel activation by potentiating Ca^{2+} sensing. *Neuron* 2010;66(6):871–83.

Yang C, Tang P, Liu P, Huang W, Chen Y, Wang H, Chang J, Lin L. Maternal pregnancy-induced hypertension increases subsequent neonatal necrotizing enterocolitis risk: A nationwide population-based retrospective cohort study in Taiwan. *Medicine* 2018;97(31):e11739.

Yildiz O, Seyrek M, Gul H. Pharmacology of arterial grafts for coronary artery bypass surgery. In: WS Aronow, ed. Artery bypass. ISBN: 978- 953- 51- 1025- 5, InTech, doi:10.5772/54723; 2013.

Yoder SR, Thornburg LL, Bisognano JD. Hypertension in pregnancy and women of childbearing age. *Am J Med* 2009;122(10):890–895.

Zhu R, Xiao D, Zhang L. Potassium channels and uterine vascular adaptation to pregnancy and chronic hypoxia. *Curr Vasc Pharmacol* 2013;11:737–747.

Zhu Y, Ye P, Chen SL, Zhang DM. Functional regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular diseases. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2018;83:75-80.

Zhu Y, Jiang XX, Ye P, Chen SL, Zhang DM. Potassium Channels in the Vascular Diseases. In: M Gonzalez, ed. *Vascular biology*. InTech 2018.

Zhuo ML, Huang Y, Liu DP, Liang CC. KATP channel: relation with cell metabolism and role in the cardiovascular system. *Int J of Biochem Cell B* 2005;37(4):751–764.

SPISAK SKRAĆENICA KOJE SU KORIŠĆENE U TEKSTU

4-AP – 4-aminopiridin

BK_{Ca} kanali – K_{Ca} kanali sa velikom provodljivošću

c-Src – Tirozin kinaza

EDH – Endotel-zavisna hiperpolarizacija

EDHF – Endotel-zavisni hiperpolarizujući faktor

EDRF – Endotel-zavisni relaksirajući faktor

GDM – Gestacijski dijabetes melitus

I_A – Prolazno-izlazna K⁺ struja

I_K – Kasno-ispravljačka izlazna K⁺ struja

IK_{Ca} kanali – K_{Ca} kanali sa intermedijernom provodljivošću

K kanali – Kalijumovi kanali

K_{2p} kanali – K kanali sa dve pore

K_{ATP} kanali – ATP-senzitivni K kanali

K_{Ca} kanali – Kalcijum-zavisni K kanali

K_{ir} kanali – Ulazno-ispravljački K kanali

K_v kanali – Voltažno-zavisni K kanali

L-Ca kanali – Voltažno-zavisni Ca²⁺ kanali

OKK – Otvarači kalijumovih kanala

PIH – Trudnoćom izazvana hipertenzija

PIP₃ – Fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat

PKA – Protein kinaza A

PKC – Protein kinaza C

PKG – Protein kinaza G

PLC – Fosfolipaza C

RyR – Receptori za rijanodin

SK_{Ca} kanali – K_{Ca} kanali sa malom provodljivošću

SUR subjedinica – Sulfonilurea subjedinica

TEA – Tetraetilamonijum

TMD – Transmembranski domen

TRPC – Tranzitorni receptor-potencionalni kanali

V_m – Mirovni membranski potencijal

BIOGRAFIJA

Vladimir Đokić rođen je 03.05.1987. godine u Loznici gde je završio osnovnu i srednju školu.

Medicinski fakultet u Beogradu upisao je 2006. godine, a diplomirao je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9.81.

Specijalističke akademske studije iz modula „Eksperimentalna fiziologija i patološka fiziologija“ na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisao je školske 2013/2014 godine, a završni akademski specijalistički rad pod nazivom „Značaj kalijumovih kanala u ekscitabilnosti glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova“ odbranio je 28.12.2015. godine.

Maja 2014. zaposlio se na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao saradnik u nastavi, a od 2016. godine kao asistent.

Od 2014. godine istraživač je na projektu „Razvoj tehnologije proizvodnje crvenog vina i dijetetskih proizvoda iz vina bogatih biološki aktivnim polifenolima sa kardioprotektivnim dejstvima“ Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, TR 31020 (ciklus 2011-2020. god.), čiji je rukovodilac prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica.

Školske 2014/2015. upisao je doktorske studije iz Medicinske farmakologije.

Iste godine započeo je i specijalizaciju iz Kliničke farmakologije, a specijalistički ispit položio je jula 2019. godine.

Uz obavljanje redovnih poslova na mestu asistenta na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, prezentovao je više radova na kongresima u zemlji i inostranstvu, a u dva navrata boravio je na stručnom usavršavanju na Max Planck Institutu za eksperimentalnu medicinu u Getingenu, Nemačka.

Živi na relaciji Beograd-Loznica, govori engleski i nemački jezik.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Vladimir Đokić

broj upisa MF-05/14

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Efekat otvarača kalijumovih kanala pinacidila na tonus izolovane humane umbilikalne vene porodilja sa gestacijskim dijabetesom i hipertenzijom“

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.01.2020.

Tjeruht B.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Vladimir Đokić

Broj upisa MF-05/14

Studijski program Medicinska farmakologija

Naslov rada „**Efekat otvarača kalijumovih kanala pinacidila na tonus izolovane humane umbilikalne vene porodilja sa gestacijskim dijabetesom i hipertenzijom**“

Mentor prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica

Potpisani Vladimir Đokić

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.01.2020.

Igor B.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Efekat otvarača kalijumovih kanala pinacidila na tonus izolovane humane umbilikalne vene porodilja sa gestacijskim dijabetesom i hipertenzijom“

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.01.2020.

Igor B.