

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.07.2020. godine, broj 9700/09-JP, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

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

kandidata Jovane Rajković, zaposlene na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentori su prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica i prof. dr Miodrag Perić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Miroslav Radenković, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Gordana Dragović Lukić, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Svetozar Putnik, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
4. Doc. dr Sofija Glumac, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
5. Prof. dr Milica Atanacković-Krstonošić, Medicinski fakultet Univerzitet u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija Jovane Rajković napisana je na 89 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 49 slika i 26 tabela. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je dat detaljan opis građe kalijumovih (K) kanala, njihova uloga u regulaciji vaskularnog tonusa, prikazani su najvažniji podtipovi K kanala prisutni na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova. Objasnjena je uloga modulatora K kanala, njihova podela, opisana je struktura i funkcija bajpas graftova, kao razlike između arterijskih i venskih graftova. Dodatno, ukazano je na posledice koje dijabetes mellitus tip 2 (DMT2) ima na funkcionalnost ovih graftova.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Oni su obuhvatali ispitivanje vazodilatatornog i antivazokonstriktornog dejstva otvarača K kanala (OKK) na segmentima krvnih sudova bolesnika sa/bez DMT2. Zatim definisanje tipova K-kanala uključenih u vazodilatatorne i antivazokonstriktorne efekte OKK na graftovima bolesnika sa/bez DMT2. Sledeći cilj je bio da se utvrdi da li ispitivani OKK imaju dejstva nezavisna od aktivacije plazma membranskih K-kanala, kao i da se ispita uticaj različitih faktora rizika na vazodilatatorne i antivazokonstriktorne efekte OKK na graftovima bolesnika sa/bez

DMT2. Dodatno, cilj je bio ispitati ekspresiju vaskularnih K-kanala na graftovima bolesnika sa/bez dijabetesa.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su eksperimenti odobreni od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (dozvola br. 29/VII-9 od 1. jula 2015). Eksperimenti su urađeni na segmentima humanih bajpas graftova uzetih od bolesnika sa/bez DMT2 podvrnutih bajpas operaciji. Opisan je eksperimentalni protokol i detalji izvođenja eksperimenata. Preostali neimplantirani segmenti bajpas graftova su nakon operacije stavljeni u bočice sa hladnim Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom i transportovani u laboratoriju gde su isti dan bili rađeni farmakološki eksperimenti sa njima. Ukoliko su segmenti bajpas graftova bili predviđeni za molekularno-biološku analizu (*Western blot* ili imunohistohemijsku analizu), isti su odmah bili zamrznuti u tečnom azotu i ostavljeni u zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$ . za analizu. U farmakološkim eksperimentima humana vena safena (HVS) je kontrahovana fenilefrinom, dok je unutrašnja torakalna arterija (ITA) kontrahovana serotoninom. Rastuće koncentracije OKK pinacidila ( $0.01 - 100 \mu\text{M}$ ), P1075 ( $0.001 - 100 \mu\text{M}$ ) i NS1619 ( $0.001 - 100 \mu\text{M}$ ) dodavane su u kupatilo na kumulativan način. Za proveru uključenosti različitih podtipova K kanala u vazorelaksaciji izazvanoj pinacidilom sledeći antagonisti dodavani su u kupatilo 10 minuta pre kontrakcije: glibenkamid (GLB) – specifični blokator  $K_{\text{ATP}}$  kanala; tetraetilamonijum (TEA) - neselektivni antagonista  $K_{\text{Ca}}$  kanala; iberiotoksin – selektivni antagonista  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  kanala; 4-aminopiridin (4-AP) – neselektivni antagonista  $K_{\text{v}}$  kanala; margatoksin – specifični antagonista  $K_{\text{v}1.3}$  kanala; nifedipin – specifični antagonista voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa; nikl – inhibitor  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  pumpe. Za ispitivanje mehanizama dejstva pinacidila nezavisnih od K kanala druga kontrakcija prouzrokovana je visokim rastvorom  $\text{K}^{+}$  ( $80 \text{ mM K}^{+}$ ). Posle eksperimenata konstruisane su koncentracijski-zavisne krive. Dodatno rađeni su ekperimentima u kojima su ispitivani antivazokonstriktorni efekti pinacidila na neurogenu kontrakciju, kao i kontrakciju izazvanu egzogenim noradrenalinom primenom istih blokatora K-kanala.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 210 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Dobijeni su uzorci od 452 bolesnika, ali je konačna studija obuhvatila ukupno 247 bolesnika, od toga 84 bolesnika bez i 163 sa DMT2. U obe grupe žene su u proseku bile starije od muškaraca, dok je u grupi NDM ta vrednost bila statistički značajna. Srednja vrednost BMI bila je približno ista u obe grupe i pokazuje da su najčešće u pitanju pacijenti sa prekomernom telesnom težinom. U pogledu razlika u glikemiji postojala je značajna statistička razlika između dijabetičnih i nedijabetičnih pacijenata.

Pinacidil ima vazodilatorno i antivazokonstriktorno dejstvo na ispitivanim humanim bajpas graftovima. Prisustvo dijabetesa utiče na razlike u relaksantnim efektima pinacidila na HVS kod osoba

muškog pola. Takođe, gojaznost može biti jedan od faktora koji dovodi do razlika u vazodilatatornim efektima pinacidila na HVS NDM pacijenata muškog pola. Nije bila prisutna razlika u relaksantnim efektima pinacidila između polova, a nije uočeno ni postojanje razlike u zavisnosti od toga da li je pacijent insulin-zavisan ili uzima samo oralne antidijabetike.

Vazodilatatorni i antivazokonstriktorni efekti pinacidila se delimično ostvaruju interakcijom sa K-kanalima. Pinacidil ostvaruje uporedivu relaksaciju HVS pacijenata sa i bez DMT2. Takođe, pinacidil prouzrokuje relaksaciju dijabetične ITA uporedivu sa dijabetičnom HVS, bez razlike u senzitivnosti. Drugi OKK, P1075, kao i NS1619, na koncentracijski-zavisan način relaksiraju HVS delujući na  $K_{ATP}$ , odnosno  $BK_{Ca}$  kanale. P1075 možda ima i dodatne mehanizme dejstva koji su nezavisni od  $K_{ATP}$  kanala.

Pinacidil stvara uporedivu relaksaciju HVS posredovanu  $K_{ATP}$  kanalima kod pacijenata sa i bez DMT2. Veća osetljivost na GLB HVS kod pacijenata sa NDM verovatno je povezana sa većom ekspresijom funkcionalnih  $K_{ATP}$  kanala u vaskularnom glatkom mišiću (SUR2B / Kir6.1). Ovo može implicirati da prisustvo dijabetesa smanjuje nivo ekspresije SUR2B subjedinice. Potvrda ovih nalaza na široj grupi segmenata HVS je potrebna, kao i detaljna analiza koja bi uključila i podelu segmenata HVS u zavisnosti od tipa antidijabetika (oralni vs. insulin) korišćenih za tretman DMT2.

Kod ITA dijabetičnih pacijenata, pinacidil izaziva relaksaciju predominantno interagujući sa Kv kanalima, i to Kv1.0 – Kv4.0. Ulogu u ovoj relaksaciji nema Kv1.3 kanal niti  $BK_{Ca}$  kanal. Dodatno, kao potvrda izostanka vasorelaksantnog efekta pinacidila na dijabetičnim ITA detektovana je značajno manja ekspresija Kir6.1 subjedinice, u poređenju sa uzorcima ITA pacijenata bez dijabetesa. Takođe, pored uočene smanjene ekspresije Kir6.1 subjedinice bila je smanjena i ekspresija Kir6.2 subjedinice, ali kod NDM pacijenata. Potrebno je dodatnim farmakološkim eksperimentima na široj grupi ITA pacijenata bez dijabetesa potvrditi ovaj rezultat.

Antivazokonstriktorni mehanizmi delovanja pinacidila na fazne kontrakcije izazvane egzogenim noradrenalinom su posredovani K-kanalima na ispitivanim bajpas graftovima. Kod HVS dijabetičnih pacijenata u mehanizme delovanja pinacidila su uključene sve tri ispitivane grupe K-kanala:  $K_{ATP}$ , Kv i  $K_{Ca}$ , dok je kod ITA dijabetičnih bolesnika, potvrđena uloga  $K_{ATP}$  i  $K_{Ca}$  kanala. Kada je u pitanju antivazokonstriktorni efekat, uočena je manja senzitivnost na pinacidil kod arterijskog grafta u poređenju sa graftom vene. Kada su fazne kontrakcije bile prouzrokovane električnom stimulacijom kod HVS bolesnika sa DMT2, potvrđena je isključivo uloga  $K_{ATP}$  kanala. Električna stimulacija dijabetične ITA nije bila moguća. Dodatni eksperimenti na nedijabetičnim graftovima bi ukazali na potencijalne sličnosti/razlike u efektima među nedijabetičnim i dijabetičnim krvnim sudovima.

Pinacidil svoje vazodilatorne efekte na bajpas graftovima ostvaruje delom kroz K-kanale potvrđujući da svoj pun efekat ostvaruje i kroz mehanizme nezavisne od K-kanala. Potvrđeno je da primena pinacidila u koncentracijama višim od 1  $\mu$ M u prisustvu rastvora sa visoko molarnom koncentracijom  $K^+$  relaksira bajpas graftove mehanizmima nezavisnim od K-kanala. U slučaju HVS možemo isključiti ulogu  $Na^+/Ca^{2+}$  pumpe u ovim efektima. Potencijalnu ulogu u K-nezavisnim efektima pinacidila imaju voltažno-zavisni Ca-kanali L-tipa, posebno kod nedijabetične HVS,

ukazujući na neophodnost daljih ispitivanja kako bi se potvrdila/opovrgla potencijalna razlika u ekspresiji ovih kanala između HVS pacijenata sa i bez DMT2.

Dobijeni rezultati studije mogu biti klinički korisni pružajući dokaz da dijabetes izaziva oslabljenu dilataciju humane vene, ali i arterije interakcijom sa  $K_{ATP}$  kanalima. Ovakva smanjena vazodilatacija, može se povezati i sa vaskularnim komplikacijama izazvanim dijabetesom, kao što su vazospazam ili hipertenzija. Shodno tome, kako se segmenti velike vene safene i unutrašnje torakalne arterije koriste kao graftovi u bajpas operaciji, dobijeni rezultati, takođe, ukazuju na to da izmenjena dilatacija koja se odvija posredstvom  $K_{ATP}$  može igrati bitnu ulogu u odabiru/definisanju karakteristika grafta kod pacijenata sa DMT2. Time bi moglo preciznije da se predvidi funkcionalnost odabranog grafta i nekoliko godina nakon operacije.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Krvni sudovi dobijeni od pacijenata podvrgnutim bajpas operaciji podeljeni su u dve grupe: DMT2 i NDM, u zavisnosti od potvrđene dijagnoze dijabetesa. U obe grupe bilo je više pacijenata muškog pola, dok su osobe ženskog pola činile oko 20-25%. Ovakvi podaci su u skladu sa drugim retrospektivnim studijama (Koch i sar., 2003; Nielsen i sar., 2019). U obe grupe, DMT2 i NDM, uočena je homogenost u glavnim karakteristikama tipičnim za pacijente sa većim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti. U pogledu razlika u glikemiji, postojala je značajna statistička razlika između dijabetičnih i nedijabetičnih pacijenata. U nekoliko kliničkih ispitivanja pokazano je da rana kontrola glikemije kod pacijenata sa DMT2 ima povoljan uticaj na kardiovaskularne funkcije, dok se to ne primećuje kod pacijenata sa dugom istorijom dijabetesa sa lošom kontrolom glikemije (Porter i Riches, 2013).

Farmakološkim eksperimentima je pokazano da pinacidil proizvodi uporedive vazodilatatorne efekte na venskim graftovima poreklom od NDM i DMT2 pacijenata. Ranije, Muller-Schweinitze i sar. (2008) su registrovali slične  $pD_2$  vrednost za pinacidil na HVS kod pacijenata koji su NDM, kao i na humanoj ITA (Gojkovic-Bukarica i sar., 1997). Dobijeni rezultati sugerišu da dijabetes nema značajan uticaj na senzitivnost i maksimalnu relaksaciju HVS izazvanu pinacidilom. Zimmermann i sar. (1997) dali su jedno od mogućih objašnjenja za ovaj nalaz. Pokazali su da uklanjanje endotela ili inhibicija NO-sintaze u cerebralnim arterijama pacova ukida razlike u osetljivosti otvarača  $K_{ATP}$  kanala između kontrolne i dijabetične arterije. Bitno je naglasiti da su studije ukazale na već prisutnu manjkavost grafta HVS nevezano od prisustva dijabetesa jer je IHH analizom ovih graftova pre implementacije potvrđeno oštećenje endotela nastalo usled preparisanja, ispiranja lumena i rastezanja (Tatic i sar., 2004). Stoga, pored endotela, kod dijabetesa je takođe vrlo važno istražiti i promene funkcije vaskularnog glatkog mišića.

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. Pinacidil svoje efekte ostvaruje vezujući se za SUR subjedinicu  $K_{ATP}$  kanala, koja predstavlja molekularnu metu i za druge OKK, ali i za antidijabetične lekove na bazi sulfonilureje, poput GLB, selektivnog blokatora  $K_{ATP}$  kanala (Hambrock i sar., 2002). Subjedinica SUR određuje specifičnost i selektivnost agonista i

antagonista  $K_{ATP}$  kanala (Liu i sar., 2001). Prisustvo regulatorne subjediniice SUR2B na HVS obe grupe pacijenata je potvrđeno molekularno-biološkim metodama, ali, iznenađujuće, subjediniica SUR2B bila je statistički značajno manje prisutna u graftovima DMT2 pacijenata. Kako su obe subjediniice, Kir6.1 i SUR2B u odnosu 4 prema 4, potrebne za funkcionalne  $K_{ATP}$  kanale vaskularnih glatkih mišića, manje izražena supresija efekta pinacidila od strane GLB na HVS kod DMT2 pacijenata verovatno je posledica smanjene ekspresije funkcionalnih  $K_{ATP}$  kanala na plazma membrani VGMĆ. Li i sar. (2018) uočili su smanjenu ekspresiju  $K_{ATP}$  kanala i smanjenu relaksaciju izazvanu pinacidilom kod pacijentkinja sa gestacijskim DM na modelu humane pupčane arterije. Zanimljivo, oni su pokazali i da su  $K_{ATP}$ -povezani signalni putevi ostali nepromenjeni u tom slučaju. Moguće objašnjenje za smanjene ekspresije SUR2B subjediniice pruža studija sa metiglioksalom (MGO) na vaskularnoj glatko-mišićnoj ćelijskoj liniji dijabetičara (Yang i sar., 2012). Ovde autori sugerišu da MGO, visoko reaktivno jedinjenje, koje se preterano proizvodi tokom produžene hiperglikemije, dovodi do nestabilnosti iRNK koja kodira subjediniice  $K_{ATP}$  kanala što snažno doprinosi dijabetičnim vaskularnim komplikacijama. Pretpostavlja se da izloženost MGO-u povećava ekspresiju miR-9a-3p, koja potom smanjuje (eng. *downregulate*) količinu iRNK za SUR2B subjediniicu, ugrožavajući funkciju  $K_{ATP}$  kanala (Li i sar., 2015). Istovremeno, uporediva relaksacija koju indukuje pinacidil u obe eksperimentalne grupe može se objasniti dodatnim mehanizmima nezavisnim od delovanja preko  $K_{ATP}$  kanala.

Činjenica da GLB nije poništio relaksirajući efekat pinacidila na HVS prekontrahovanoj fenilefrinom (FE) ukazuje da pinacidil poseduje dodatne mehanizme delovanja nezavisne od  $K_{ATP}$  kanala. Ovakav nalaz je ranije prijavljen u različitim eksperimentalnim modelima (Tsang i sar., 2003; Meisheri i sar., 1991; Cai i sar., 1994), kao i na uzorcima humane ITA (Gojkovic-Bukarica i sar., 1997) i radijalne arterije (Stojnic i sar., 2007), kao i na uterusu pacova (Novakovic i sar., 2007). Dodatni efekti pinacidila, nezavisni od  $K_{ATP}$  kanala, uključuju interakciju sa K-kanalima kao što su  $K_v$  i  $K_{Ca}$  kanali ili  $Na^+/Ca^{2+}$  pumpom i voltažno-zavisnim Ca-kanalima L-tipa (Tsang i sar., 2003; Stojnic i sar., 2007). Eksperimenti sa rastvorom visoke koncentracije  $K^+$  potvrdili su prisustvo dodatnih mehanizama dejstva pinacidila koji uopšte ne zavise od K kanala (Stojnic i sar., 2007).

Jedan od tipova K-kanala za koji je ranije pokazana različita ekspresija na vaskularnom zidu dijabetičnih životinja jesu  $K_{Ca}$  kanali, tj. njihova podgrupa-  $BK_{Ca}$  kanali. Međutim, TEA (1mM) predominantni blokator  $K_{Ca}$  kanala, nije uticao na vazodilatatorne efekte pinacidila na HVS. Povećanjem koncentracije TEA (3 mM) uočena je statistički značajna razlika u senzitivnosti na pinacidil kod pacijenata sa DMT2, bez uticaja na maksimalnu relaksaciju u obe grupe. Ovakvi efekti TEA mogu se obrazložiti potencijalnim delovanjem i na  $K_v$  kanala. Pokazano je da se u visokim koncentracijama, pored  $K_{Ca}$  kanala, TEA neselektivno vezuje i za  $K_v$  kanale (Smirnov i sar., 2002).

Prethodna istraživanja na animalnim modelima dijabetesa tip 1 pokazala su smanjenu ekspresiju i funkciju vaskularnih  $K_v$  kanala (Chai i sar., 2005; Chai i sar., 2007; Ko i sar., 2010). Mehanizmi koji su se nalazili u osnovi efekta smanjenja funkcije/ekspresije  $K_v$  kanala uključivali su nitiranje  $K_v$  kanala (Li i sar., 2004), reaktivne kiseonične vrste (engl. *ROS*) (Bubolz i sar., 2005) i/ili protein kinaza C (PKC)- zavisne puteve (Rainbow i sar., 2006). Primena 4-AP, nespecifičnog blokatora  $K_v$  kanala i margatoksina, specifičnog blokatora  $K_v1.3$  kanala isključila je ulogu ovih kanala u vazorelaksantnim efektima pinacidila na HVS pacijenata sa i bez DMT2.

Upotrebom P1075, koji je sintetski analog pinacidila i visoko selektivni otvarač  $K_{ATP}$  kanala (Sargent i sar., 1993), na HVS pacijenata sa i bez DMT2 dobijena je koncentracijski-zavisna relaksacija krvnog suda. Izraženija osetljivost na P1075 u poređenju sa pinacidilom, koja je uočena u ovom istraživanju, u skladu je sa ranije publikovanim rezultatima na humanim bajpas graftovima (Gojkovic-Bukarica i sar., 2011). P1075 je bio 3 do 4 puta potentniji u odnosu na pinacidil kod obe grupe pacijenata, iako je HVS DMT2 pacijenata bila nešto senzitivnija na efekte P1075. Zanimljivo je da je samo primena najniže koncentracije P1075 u ovom istraživanju dovela do statistički značajne razlike između grupa pacijenata, pri čemu je NDM grupa bila senzitivnija na vrlo niske koncentracije P1075.

Pinacidil je dovodio do relaksacije HVS NDM i DMT2 pacijenata prekontrahovane rastvorom sa visokom koncentracijom  $K^+$ , pri čemu je koncentracijski-zavisna kriva bila značajno pomerena udesno u poređenju sa koncentracijski-zavisnom krivom dobijenom kada je HVS bila prekontrahovana FE. Razlika između  $E_{max}$  je, takođe, bila statistički značajna. Ovakvi rezultati prijavljeni su i ranije na različitim modelima (Novakovic i sar., 2007; Gojkovic-Bukarica i sar., 1997; Stojnic i sar., 2007). Između grupa nisu uočene značajne razlike kako u senzitivnosti, tako ni u maksimalnim relaksacijama. Mehanizmi kojima pinacidil ostvaruje svoje K-nezavisne efekte nisu još uvek dovoljno razjašnjeni. Ispitivanje ovih mehanizama uključilo je primenu različitih inhibitora jonskih kanala uz rastvor sa visokom koncentracijom  $K^+$ , istovremeno ispitujući potencijalne razlike u funkciji nekih drugih jonskih kanala između DMT2 i NDM pacijenata. Na nedijabetičnoj HVS je pokazano da voltažno-zavisni Ca-kanali L-tipa posreduju u K-nezavisnim efektima pinacidila, dok  $Na^+/Ca^{2+}$  pumpa nema ulogu u ovim efektima. Nasuprot tome rezultati na humanoj radijalnoj arteriji su pokazali uključenost pumpe u ovim efektima dok voltažno-zavisni Ca-kanali L-tipa nisu posredovali u K-nezavisnim efektima pinacidila (Stojnic i sar., 2007). Dobijene razlike, pre svega, mogu ukazati na različitu distribuciju  $Na^+/Ca^{2+}$  pumpe i voltažno-zavisnih Ca-kanala L-tipa između arterijskih i venskih krvnih sudova.

GLB u nižim koncentracijama nije uticao na inhibiciju vazodilatacije dijabetične ITA. Tek je primena GLB u visokoj koncentraciji antagonizovala efekte pinacidila, značajno utičući i na  $E_{max}$ . Moguće je da ovaj rezultat ukazuje da pinacidil manjim delom svoje vazodilatatorne efekte na ITA ostvaruje kroz  $K_{ATP}$ -nezavisne mehanizme dejstva. Patološke izmene  $K_{ATP}$  kanala u različitim arterijama su ranije uočene i okarakterisane u slučajevima dijabetesa, ishemije i hipertenzije, pokazujući izmenjenu funkciju  $K_{ATP}$  kanala i smanjenu gensku ekspresiju (Mayhan, 1994; Bari i sar., 1996; Ghosh i sar., 2004). U prikazanom istraživanju potvrđena je statistički značajno smanjena ekspresija Kir6.1 subjedinice na preparatima ITA kod DMT2 pacijenata. U skladu sa tim, interesantno je istraživanje na endotel nezavisnim segmentima aorte izolovanim iz Wistar i spontano hipertenzivnih sojeva pacova (Blanco-Rivero i sar., 2008). Dok je smanjena ekspresija Kir6.1 i SUR2B subjedinice detektovana kod spontano hipertenzivnih pacova, vazodilatatorni odgovor aorte na pinacidil i kromakalim je bio sličan kod oba soja. WB analiza je potvrdila odsustvo kvantitativne razlike u ekspresiji  $\alpha$  subjedinice  $BK_{Ca}$  kanala između uzoraka ITA uzetih od pacijenata sa i bez DMT2, dok je IHH analiza pokazala snažnu ekspresiju  $\alpha$  subjedinice  $BK_{Ca}$  kanala u VGM sloju, ali i u endotelu ITA. Velika gustina  $BK_{Ca}$  kanala na ITA može delimično da objasni ređu pojavu spazma ovog grafta u poređenju sa graftom radijalne arterije (Shao i sar., 2011).

Primenom 4-AP ispitana je uloga Kv kanala u procesima vazorelaksacije na ITA poreklom od pacijenata sa dijabetesom. Vazodilatatorni efekti pinacidila nisu bili inhibirani pri nižim koncentracijama 4-AP, ali je pri većim koncentracijama postignuta statistički značajna inhibicija vazorelaksacije, kao i značajna inhibicija maksimalne postignute relaksacije. Ovi rezultati su u skladu sa ranije dobijenim rezultatima na ITA bez endotela nakon primene rezveratrola, potencijalnog OKK (Novakovic i sar., 2006). Ipak, nasuprot rezultatima koji su tada potvrdili ulogu Kv1.3 kanala u relaksantnim efektima rezveratrola, u slučaju pinacidila primenom margatoksina pokazano je da Kv1.3 kanal nije imao ulogu u vazodilatatornom efektu. Studija rađena na mezenteričnim arterijalnim GMĆ izolovanim iz dijabetičnog i nedijabetičnog soja pacova ukazala je na razliku u ekspresiji većine Kv kanala (Hong i sar., 2016), ali ne i Kv1.3 kanala.

Električna stimulacija (ES) dovodi do aktivacije perivaskularnih nervnih završetaka koji oslobađajući različite neurotransmitere i ko-transmitere (noradrenalin (NOR), ATP i neuropeptid Y), dovode do kontrakcije krvnog suda (Smyth i sar., 2000). Pored toga, mnogo ranije je pokazano da ES ne prouzrokuje nikakav odgovor segmenata umbilikalne arterije i vene koje nemaju inervaciju, dok NOR i serotonin prouzrokuju kontrakcije ovih krvnih sudova (Holman i sar., 1968). Pinacidil je uticao na endotel-nezavisnu inhibiciju kontrakcija HVS dijabetičara prouzrokovane ES. Prikazani rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim na veni porti kunića primenom levkromakalima (Gojkovic-Bukarica i Kazic, 1999), kao i na HVS primenom kromakalima (de Moura i Jاسبik, 1992). Sasvim očekivano GLB je blokirao  $K_{ATP}$  kanale na VGMC segmenata HVS onemogućavajući da pinacidil ostvari hiperpolarizaciju VGMC i na taj način podstakao neurogenu kontrakciju. Ovaj nalaz je u skladu sa primenom GLB na veni porti kunića gde je antagonizovana inhibicija neurogenih i NOR kontrakcija bila prouzrokovana levkromakalimom (Gojkovic-Bukarica i Kazic, 1999). S druge strane, interesantni su rezultati dobijeni posle primene 4-AP koji je umanjio inhibitorno delovanje pinacidila na istom tipu kontrakcija, povećavajući senzitivnost preparata na pinacidil. U navedenim eksperimentima Kv kanali su bili blokirani što je sprečilo njihovu aktivaciju, kako postsinaptički na VGMC, tako i presinaptički na nivou nervnog završetka. Blokiranje Kv kanala na nervnim završecima pak može uticati na smanjeno oslobađanje NOR pod uticajem ES. Detekcija K-kanala na nervnim završecima ostavlja mogućnost da OKK ostvare svoje efekte delujući presinaptički. Dodatno, pokazano je i da sam pinacidil inhibira oslobađanje NOR iz električki stimulisanih neurona *vas deferens* pacova (Soares-da-Silva i Fernandes, 1990). U pomenutom istraživanju primena TEA u visokoj koncentraciji je antagonizovala efekat pinacidila, dok manja koncentracija TEA, koja je korišćena u prikazanom eksperimentalnom istraživanju i koja je selektivnija za  $BK_{Ca}$  kanale, nije antagonizovala inhibiciju ES kontrakcija prouzrokovanu pinacidilom. Antagonizovanje efekata primenom TEA u visokomolarnoj koncentraciji se može tumačiti potencijalnim neselektivnim blokiranjem ne samo  $K_{Ca}$  kanala već i drugih K-kanala (Smirnov i sar., 2002). Pored toga, pokazano je da pinacidil i kromakalim izazivaju hiperpolarizaciju membrane neurona i smanjuju oslobađanje neurotransmitera (Cook i Quast, 1990).

Ukazano je da višestruki pokušaji ES dijabetične ITA nisu dali rezultate. ITA je inervisana simpatičkim nervnim završecima za koje je pokazano da ne dolaze u direktan kontakt sa VGMC i da su lokalizovani u adventiciji što može objasniti slabiju sklonost ka razvoju spazma u poređenju sa drugim tipovima arterija, poput radijalne (Reddy i sar., 2011), pa i manjom osetljivošću na ES.

Kao kontrola kontrakciji izazvanoj ES, dejstva pinacidila su ispitivana i na kontrakciji prouzrokovanoj spolja dodatim noradrenalinom (Protic i sar., 2013). Pinacidil je koncentracijski-zavisno inhibirao NOR-indukovane kontrakcije na bajpas graftovima, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima na animalnim i humanim krvnim sudovima (Mikkelsen i sar., 1982; Videbaek i sar., 1988). U prikazanom istraživanju antivazokonstriktornih efekata pinacidila na kontrakcije izazvane noradrenalinom na HVS dijabetičara uočen je slabiji efekat pinacidila na inhibiciju NOR-kontrakcija u poređenju sa neurogenim kontrakcijama izazvanim ES. Ovi nalazi su u skladu sa ispitivanjem istih efekata pinacidila na humanoj radijalnoj arteriji (Gojkovic-Bukarica i sar., 2011). Veća osetljivost neurogene kontrakcije HVS na inhibitorni efekat pinacidila nego NOR-kontrakcije, sugerise da inhibicija oslobađanja različitih neurotransmitera može da bude vrlo važna u sprečavanju spazma grafta.

Kod ITA uočena je manja osetljivost faznih kontrakcija izazvanih noradrenalinom na pinacidil. U ovom slabom antivazokonstriktornom efektu pinacidila moguće je da svoju ulogu imaju  $K_{ATP}$  i  $K_{Ca}$  kanali, dok je izostao efekat kroz Kv kanale. Ranije je i na humanoj radijalnoj arteriji demonstrirano da na fazne kontrakcije izazvane noradrenalinom pinacidil utiče delujući na  $K_{ATP}$  i  $K_{Ca}$  kanale, dok Kv kanali nisu bili uključeni u ove efekte (Gojkovic-Bukarica i sar., 2011).

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

1. **Rajkovic J**, Peric M, Stanisic J, Novakovic R, Djokic V, Rakocevic J, Tepavcevic S, Labudovic-Borovic M, Gostimirovic M, Heinle H, Gojkovic-Bukarica L. The role of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in pinacidil-induced vasodilatation of the human saphenous vein in patients with and without type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pharmacol* 2020;71(1):125-135 DOI: 10.26402/jpp.2020.1.12 (IF 2.64, M22).

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Efekti otvarača kalijumovih kanala na izolovane bajpas graftove bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2“ Jovane Rajković predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja DMT2 na funkciju i ekspresiju kalijumovih kanala na glatko-mišićnom sloju humanih bajpas graftova. U ovom istraživanju je po prvi put detektovana statistički značajno smanjena ekspresija SUR2B subjedinice  $K_{ATP}$  kanala na HVS kod DMT2 pacijenata, što ukazuje na smanjenu ekspresiju funkcionalnih  $K_{ATP}$  kanala. Ovo je i prva studija koja je demonstrirala da je Kir6.1 subjedinica statistički značajno manje ekspimirana na dijabetičnoj ITA.

Eksperimentalni podaci potvrđuju da pinacidil svoje vazodilatorne efekte ostvaruje i kroz  $K_{ATP}$ - nezavisne mehanizme dejstva, ali i kroz K-nezavisne mehanizme dejstva koji doprinose komparabilnim efektima pinacidila na dijabetičnim i nedijabetičnim graftovima.

Doktorska disertacija Jovane Rajković urađena je u skladu sa principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.



Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Jovane Rajković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 16.07.2020.

Članovi komisije:

Prof. dr Miroslav Radenković

---

Prof. dr Gordana Dragović-Lukić

---

Prof. dr Svetozar Putnik

---

Doc. dr Sofija Glumac

---

Prof. dr Milica Atanacković-Krstonošić

---

Mentor:

Prof. dr Ljiljana Gojković Bukarica

---

Komentor:

Prof. dr Miodrag Perić

---