

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija J. Marinko

**VAZODILATATORNO DELOVANJE DONORA
AZOT MONOKSIDA I VODONIK-SULFIDA NA
IZOLOVANOJ UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ
ARTERIJI I VENI SAFENI ČOVEKA: ULOGA
KALIJUMOVIH KANALA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Marija J. Marinko

**VASODILATORY ACTION OF NITRIC OXIDE
AND HYDROGEN SULFIDE DONORS ON
ISOLATED HUMAN INTERNAL THORACIC
ARTERY AND HUMAN SAPHENOUS VEIN:
ROLE OF POTASSIUM CHANNELS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakologiju, Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

MENTOR:

Dr Aleksandra Novaković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Nina Japundžić Žigon, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

U Beogradu, _____

Iskreno se zahvaljujem,

Mentoru, prof. dr Aleksandri Novaković, na pruženoj mogućnosti da se bavim naučno-istraživačkim radom, na dugogodišnjoj saradnji i svojoj pomoći tokom izrade ove disertacije. Zahvaljujem se što je omogućila međunarodnu saradnju našeg malog istraživačkog tima; bila mi je čast da upoznam energičnog i jedinstvenog profesora Guo-Wei He-a i boravim u njegovoj laboratoriji. Hvala i na lepom druženju tokom zajedničkih putovanja.

Članovima komisije, prof. dr Radici Stepanović-Petrović i prof. dr Nini Japundžić Žigon, na svim korisnim savetima i sugestijama koji su unapredili ovu disertaciju.

Hirurgzima IKVB „Dedinje“ na obezbeđivanju materijala koji je doprineo značaju ovog rada, tehničarima Franji i Daci i sestri Branki na dugogodišnjoj saradnji, strpljenju i izdvojenom vremenu.

Članovima Katedre za farmakologiju na kolegijalnosti.

Kolegi iz laboratorije, Goranu Jankoviću, na pomoći u eksperimentalnom radu, prijateljskoj saradnji i razumevanju.

Svojim roditeljima i sestri koji su me podržali u ideji da uplovim u svet nauke, a posebno da istrajam na tom putu.

Posebnu zahvalnost dugujem svom suprugu Marku na nesebičnoj ljubavi, podršci i razumevanju u svim teškim trenucima tokom izrade ove disertacije. Ovaj rad posvećujem našim anđelima, Mini i Katarini...

Vazodilatatorno delovanje donora azot monoksida i vodonik-sulfida na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka: uloga kalijumovih kanala

SAŽETAK

Gasotransmiteri ostvaruju deo svojih uticaja na organizam regulacijom jonskih kanala, posebno kalijumovih (K^+) kanala. Promenjena struktura/funkcija jonskih kanala, ali i poremećaji metabolizma i/ili nivoa gasotransmitera, povezani su sa nekoliko patofizioloških stanja, uključujući kardiovaskularne bolesti.

Glavni cilj našeg istraživanja bio je ispitivanje mehanizama vazodilatatornog dejstva nikorandila, donora azot monoksida (NO), i natrijum-hidrogensulfida, donora vodonik-sulfida (H_2S), na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka.

Neiskorišćeni segmenti unutrašnje torakalne arterije i vene safene uzimani su od pacijenata tokom bajpas operacija. Ispitivanje je rađeno u *in vitro* uslovima u sistemu za izolovane organe. Koncentracijski-zavisne krive relaksacije konstruisane su na prekontrahovanim preparatima sa i bez endotela u prisustvu/odsustvu blokatora K^+ kanala i/ili inhibitora signalnog puta cikličnog gvanozin-monofosfata (cGMP).

Naši rezultati su pokazali da nikorandil i natrijum-hidrogensulfid prouzrokuju koncentracijski-zavisnu relaksaciju izolovane humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom. Nikorandil izaziva endotel-nezavisnu, a natrijum-hidrogensulfid endotel-zavisnu relaksaciju oba krvna suda. Signalni put cGMP-a ima značajnu ulogu u vazorelaksantnom efektu nikorandila. Takođe, mehanizam dejstva natrijum-hidrogensulfida uključuje pojačanje NO/cGMP signalnog puta na oba krvna suda. Kalijumovi kanali doprinose relaksantnom dejstvu oba ispitivana agensa, s tim da postoje razlike u tipovima K^+ kanala i njihovom relativnom značaju.

S obzirom da se spazam vene safene i unutrašnje torakalne arterije i dalje javlja u kliničkim uslovima, a njegova prevencija i reverzija još uvek predstavljaju izazov, rezultati naše studije mogu ukazati na nove terapijske ciljeve u lečenju spazma bajpas graftova i potencijalno dati farmakološku osnovu za razvoj novih vazodilatatornih lekova.

Ključne reči: azot monoksid, vodonik-sulfid, nikorandil, natrijum-hidrogensulfid, arterijski graft, venski graft, vazorelaksacija, kalijumovi kanali.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

Vasodilatory action of nitric oxide and hydrogen sulfide donors on isolated internal thoracic artery and human saphenous vein: role of potassium channels

ABSTRACT

Gasotransmitters exert part of their impact on the organism via regulation of ion channels, especially potassium (K^+) channels. Altered structure/function of ion channels, as well disorders of the metabolism and/or levels of the gasotransmitters are associated with several pathophysiological conditions, including cardiovascular diseases.

The principal aim of our study was to investigate the mechanisms of vasodilator action of nicorandil, a nitric oxide (NO) donor, and of sodium hydrosulfide, a hydrogen sulfide (H_2S) donor, on the isolated human internal thoracic artery and saphenous vein.

Discarded segments of the internal thoracic artery and saphenous vein were collected from patients undergoing coronary artery bypass grafting. The investigation was performed *in vitro* in an isolated organs system. Concentration-response curves were constructed on pre-contracted preparations with and without endothelium in the presence/absence of K^+ channel blockers and/or cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway inhibitors.

Our results showed that nicorandil and sodium hydrosulfide cause a concentration-dependent relaxation of the isolated human saphenous vein and internal thoracic artery pre-contracted by phenylephrine. Nicorandil exerts endothelium-independent and sodium hydrosulfide endothelium-dependent relaxation of both blood vessels. cGMP signalling pathway plays a significant role in the vasorelaxant effect of nicorandil. Also, sodium hydrosulfide mechanism of action involves enhancement of the NO/cGMP signalling pathway in both vessels. Potassium channels contribute to the relaxant effect of both investigated agents, although differences exist in K^+ channel subtypes and their relative importance.

Since the spasm of saphenous vein and internal thoracic artery still occurs in clinical settings, and its prevention and reversion is still challenging, the results of our study may indicate new targets in the treatment of bypass grafts spasm, and potentially provide a pharmacological basis for the development of new vasodilator drugs.

Key words: nitric oxide, hydrogen sulfide, nicorandil, sodium hydrosulfide, arterial graft, vein graft, vasorelaxation, potassium channels.

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmacology

SADRŽAJ

UVOD	1
KALIJUMOVI KANALI	1
VASKULARNI K⁺ KANALI	3
Uloga vaskularnih K⁺ kanala	3
Tipovi vaskularnih K⁺ kanala	3
<i>K_V kanali</i>	3
<i>K_{Ca} kanali</i>	4
<i>K_{ATP} kanali</i>	5
PROMENA K⁺ KANALA U PATOLOŠKIM STANJIMA	6
AZOT MONOKSID	7
SINTEZA NO	7
Distribucija NOS	8
VODONIK-SULFID	9
SINTEZA H₂S	9
Distribucija enzima koji sintetišu H₂S	10
GASOTRANSMITERI I VASKULARNI TONUS	11
NO I VASKULARNI TONUS	12
cGMP-zavisno dejstvo NO	12
cGMP-nezavisno dejstvo NO	14
Uloga K⁺ kanala u vazorelaksaciji izazvanoj NO-om	15
H₂S I VASKULARNI TONUS	16
Uloga K⁺ kanala u vazorelaksaciji izazvanoj H₂S-om	16
Regulacija NO/cGMP puta dejstvom H₂S	17
Ostali potencijalni mehanizmi vazorelaksantnog delovanja H₂S	18
ULOGA GASOTRANSMITERA U KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA	18
NO I KARDIOVASKULARNE BOLESTI	18
Donori NO	19
<i>Nikorandil</i>	19
VAZORELAKSANTNO DELOVANJE NIKORANDILA	20

H₂S I KARDIOVASKULARNE BOLESTI	20
Donori H₂S	21
<i>Natrijum-hidrogensulfid</i>	21
VAZORELAKSANTNO DELOVANJE NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA.....	21
HUMANI BAJPAS GRAFTOVI KAO MODEL ZA ISPITIVANJE VAZORELAKSANTNOG DELOVANJA DONORA NO I H ₂ S	22
CILJEVI ISTRAŽIVANJA	23
MATERIJAL I METODE	25
PRIPREMA TKIVA.....	25
EKSPERIMENTALNI PROTOKOL.....	25
STATISTIČKA ANALIZA	26
EKSPERIMENTALNE SUPSTANCE.....	27
REZULTATI	29
VAZODILATATORNI EFEKAT DONORA NO, NIKORANDILA.....	29
EFEKAT NIKORANDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI PREKONTRAHOVANOJ FENILEFRINOM	29
ISPITIVANJE MEHANIZMA VAZODILATATORNOG DEJSTVA NIKORANDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI	30
Uticaj blokatora K⁺ kanala na endotel-nezavisnu relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom	31
<i>Uticaj blokatora K_{ATP} kanala</i>	31
<i>Uticaj blokatora K_{Ca} kanala</i>	31
<i>Uticaj blokatora K_V kanala</i>	31
Uticaj ODQ na endotel-nezavisnu relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom	35
Uticaj kombinacije ODQ i blokatora K⁺ kanala na endotel-nezavisnu relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom	35
VAZODILATATORNI EFEKAT DONORA H ₂ S, NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA.....	38
EFEKAT NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI PREKONTRAHOVANOJ FENILEFRINOM	38
ISPITIVANJE MEHANIZMA VAZODILATATORNOG DEJSTVA NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI	39
Uticaj blokatora K⁺ kanala na endotel-zavisnu relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanu natrijum-hidrogensulfidom	40

<i>Uticaj blokatora K_{Ca} kanala</i>	41
<i>Uticaj blokatora K_{ATP} kanala</i>	42
<i>Uticaj blokatora K_V kanala</i>	42
Uloga NO/cGMP/PKG signalnog puta u relaksaciji izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanoj natrijum-hidrogensulfidom	43
Uloga NO i cGMP-a u aktivaciji K^+ kanala izazvanoj natrijum-hidrogensulfidom	45
<i>Uticaj blokatora K^+ kanala u prisustvu kombinacije L-NAME/indometacin/hidroksokobalamin na relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije indukovanu natrijum-hidrogensulfidom</i>	43
<i>Uticaj blokatora K^+ kanala u prisustvu ODQ na relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije indukovanu natrijum-hidrogensulfidom</i>	47
DISKUSIJA	50
VAZODILATATORNI EFEKAT NIKORANDILA, DONORA NO.....	50
VAZODILATATORNI EFEKAT NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA, DONORA H_2S	55
OSNOVNE RAZLIKE U VAZODILATATORNOM DEJSTVU DONORA NO I H_2S NA HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKANOJ ARTERIJI	61
ZAKLJUČCI	63
LITERATURA	64

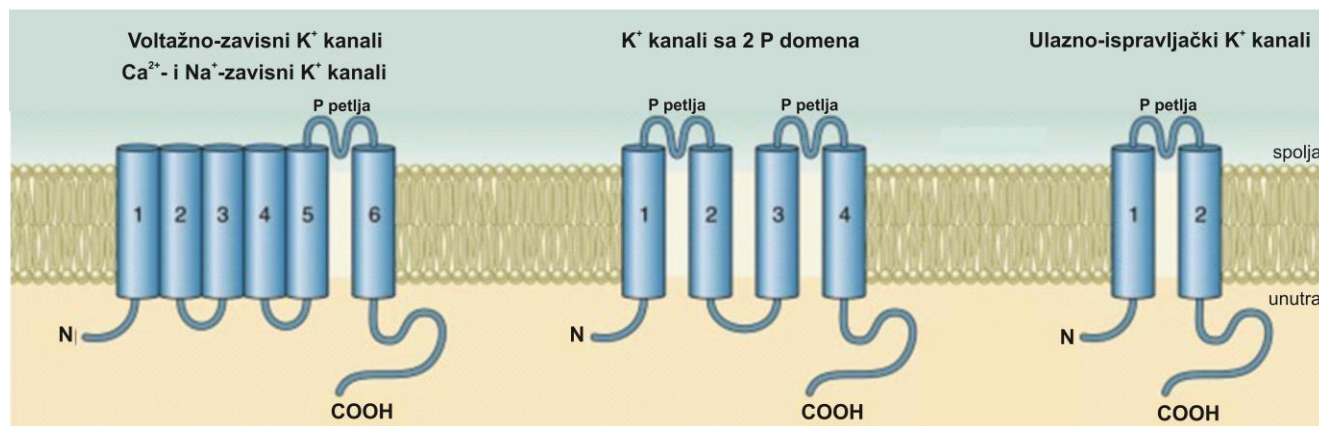
UVOD

Gasoviti medijatori ili gasotransmiteri su endogeno stvoreni molekuli gasa sa dokazanom ulogom u prenosu signala, uključeni u regulaciju kako intraćelijskih procesa, tako i međućelijskih interakcija. Azot monoksid (NO) je prvi gasoviti molekul prihvaćen kao signalni medijator u organizmu, a nakon ugljen monoksida (CO), vodonik-sulfid (H_2S) je postao treći, najmlađi član ove porodice gasovitih transmitera (Beltowski i Jamroz-Wisniewska, 2014). Sva tri medijatora su u početku smatrana samo toksičnim i otrovnim gasovima, dok nije otkriveno da sisari, pored mnogih drugih organizama, poseduju specifične enzime za njihovu sintezu, i da ostvaruju specifične fiziološke funkcije. Ovi gasoviti transmiteri regulišu, često kroz slične molekulske procese, vazodilataciju, energetske metabolizam, apoptozu, neuralne i mnoge druge funkcije, a poremećaji metabolizma i/ili nivoa ovih gasovitih medijatora povezani su sa nekoliko patofizioloških stanja, od kardiovaskularnih i neurodegenerativnih, do dijabetesa i kancera (Giuffrè i Vicente, 2018). Takođe, nije moguće posmatrati ih kao izolovane entitete sa nezavisnim ulogama, već je jasno da oni mogu da potenciraju ili antagonizuju međusobne ćelijske efekte, kako uticajem na nivou sinteze, tako i na nivou ciljnih molekula ili direktnom interakcijom (Cebova i sar., 2016).

Jonski kanali predstavljaju važne membranske proteine koji sprovode jone kroz membranu kontrolišući, na taj način, intraćelijsku koncentraciju jona, membranski potencijal i akcioni potencijal. Promenjena struktura i/ili funkcija jonskih kanala može voditi razvoju različitih bolesti. Gasoviti signalni molekuli regulacijom jonskih kanala, posebno kalijumovih (K^+) kanala, ostvaruju deo svojih uticaja na organizam, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim uslovima (Yu i sar., 2018). Stoga lekovi koji menjaju sintezu/nivoje samih gasovitih transmitera ili utiču na njihove signalne puteve predstavljaju atraktivne farmakološke agense. Danas, donori NO predstavljaju važne lekove u terapiji kardiovaskularnih bolesti, dok se donori H_2S intenzivno ispituju na različitim animalnim modelima i očekuje se da će rezultovati pojavom novih farmaceutika sa primenom u prevenciji ili terapiji više patoloških stanja, pre svega kardiovaskularnih bolesti.

KALIJUMOVI KANALI

Kalijumovi kanali predstavljaju najveću i najheterogeniju grupu jonskih kanala sa preko 75 do danas identifikovanih humanih gena koji kodiraju subjedinice kanala (Gutman i sar., 2005; Jenkinson, 2006). Prema strukturnim i funkcionalnim osobinama podeljeni su u familije na osnovu gena koji ih kodiraju i strukture α subjedinica, odnosno broja transmembranskih (TM) domena koje poseduju (6, 4 ili 2 TM domena) (Alexander i sar., 2019) (Slika 1; Tabela 1).



Slika 1. Šematski prikaz strukture α subjedinica kalijumovih (K^+) kanala (preuzeto i prilagođeno prema Foster i Coetzee, 2016)

Alfa subjedinice učestvuju u formiranju pore kanala i, bez obzira kojoj grupi pripadaju, sadrže specifičnu sekvencu od 5 aminokiselina (treonin, valin, glicin, tirozin, glicin) koja formira esencijalni deo pore, odnosno selektivni filter za K^+ jone, a često su udružene i sa pomoćnim subjedinicama (Jenkinson, 2006).

Familiju K^+ kanala sa 6 TM domena čine voltažno-zavisni K^+ (K_V) kanali i Ca^{2+} - (K_{Ca}) i Na^+ -zavisni K^+ (K_{Na}) kanali (Tabela 1). Subjedinice koje formiraju kanal sadrže 6 (ili 7) TM regiona. Segmenti S5 i S6 i petlja koja ih povezuje (P petlja) učestvuju u formiranju pore kanala, a prva četiri segmenta (S1-S4) čine voltažni senzor (Slika 1). Funkcionalni kanal predstavlja homo- ili heteromerni kompleks sastavljen od 4 α subjedinice (Alexander i sar., 2019; Sokolova i sar., 2001).

Familija K^+ kanala sa 4 TM domena prouzrokuje pozadinsku provodljivost za K^+ koja učestvuje u kontroli ćelijske ekscitabilnosti. Podeljena je u podfamilije čiji su nazivi i dalje kombinacija zvaničnih IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) i tradicionalnih imena (Tabela 1). Glavna α subjedinica ovih kanala se sastoji od 4 TM regiona i 2 P petlje (Slika 1). Za razliku od familija sa 6 TM i 2 TM domena, funkcionalni kanal je sastavljen iz 2 subjedinice kako bi se zadržala tetramerna struktura pore. Ovi kanali se označavaju kao K_{2P} , pri čemu treba naglasiti da to nisu kanali sa dve pore, kako se može naći negde u literaturi, već kanali čije subjedinice sadrže 2 P domena, odnosno 2 domena koja ulaze u sastav pore (Bayliss i sar., 2019).

Kanali sa 2 TM domena su familija ulazno-ispravljачkih K^+ (K_{ir}) kanala, koja obuhvata, kao najznačajnije, konstitutivno aktivne K_{ir} kanale ($K_{ir2.x}$), G-proteinom aktivirane K_{ir} kanale ($K_{ir3.x}$) i adenzin-trifosfat (ATP)-senzitivne K^+ (K_{ATP}) kanale ($K_{ir6.x}$ u kombinaciji sa receptorom za sulfonilureu (SUR)) (Tabela 1). Glavna subjedinica sastavljena je od 2 TM regiona i jedne P petlje (Slika 1). Kao i 6 TM familija, funkcionalni kanal predstavlja tetramernu strukturu, sa mogućnošću formiranja heteromera unutar podfamilija (Alexander i sar., 2019).

Tabela 1. Strukturna klasifikacija K^+ kanala (prilagođeno prema IUPHAR-u).

6 TM familija		4 TM familija	2 TM familija
Voltažno-zavisni K^+ kanali	Ca^{2+} - i Na^+ -zavisni K^+ kanali	K^+ kanali sa 2 P domena	Ulazno-ispravljачki K^+ kanali
K_V1 ($K_V1.1$ - $K_V1.8$) $K_V2.1$, $K_V2.2$ K_V3 ($K_V3.1$ - $K_V3.4$) $K_V4.1$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ $K_V5.1$ K_V6 ($K_V6.1$ - $K_V6.4$) K_V7 ($K_V7.1$ - $K_V7.5$) $K_V8.1$, $K_V8.2$ $K_V9.1$, $K_V9.2$, $K_V9.3$ $K_V10.1$ (eag1) $K_V10.2$ (eag2) $K_V11.1$ (HERG) $K_V11.2$ (HERG2) $K_V11.3$ (HERG3) $K_V12.1$ (elk1, elk3) $K_V12.2$ (elk2) $K_V12.3$ (elk1)	$K_{Ca}1.1$ (BK, Maxi K^+ , Slo α) $K_{Ca}2.1$ (SK $_{Ca}1$) $K_{Ca}2.2$ (SK $_{Ca}2$) $K_{Ca}2.3$ (SK $_{Ca}3$) $K_{Ca}3.1$ (IK $_{Ca}$, SK4) $K_{Na}1.1$ ($K_{Ca}4.1$, Slo2.2) $K_{Na}1.2$ ($K_{Ca}4.2$, Slo2.1) $K_{Ca}5.1$ (Slo3)	$K_{2P}1.1$ (TWIK1) $K_{2P}2.1$ (TREK1) $K_{2P}3.1$ (TASK1) $K_{2P}4.1$ (TRAAK) $K_{2P}5.1$ (TASK2) $K_{2P}6.1$ (TWIK2) $K_{2P}7.1$ $K_{2P}9.1$ (TASK3) $K_{2P}10.1$ (TREK2) $K_{2P}12.1$ (THIK2) $K_{2P}13.1$ (THIK1) $K_{2P}15.1$ (TASK5) $K_{2P}16.1$ (TALK1) $K_{2P}17.1$ (TALK2) $K_{2P}18.1$ (TRESK)	$K_{ir}1.1$ $K_{ir}2$ ($K_{ir}2.1$ - $K_{ir}2.4$) $K_{ir}3$ ($K_{ir}3.1$ - $K_{ir}3.4$) $K_{ir}4.1$, $K_{ir}4.2$ $K_{ir}5.1$ $K_{ir}6.1$, $K_{ir}6.2$ $K_{ir}7.1$

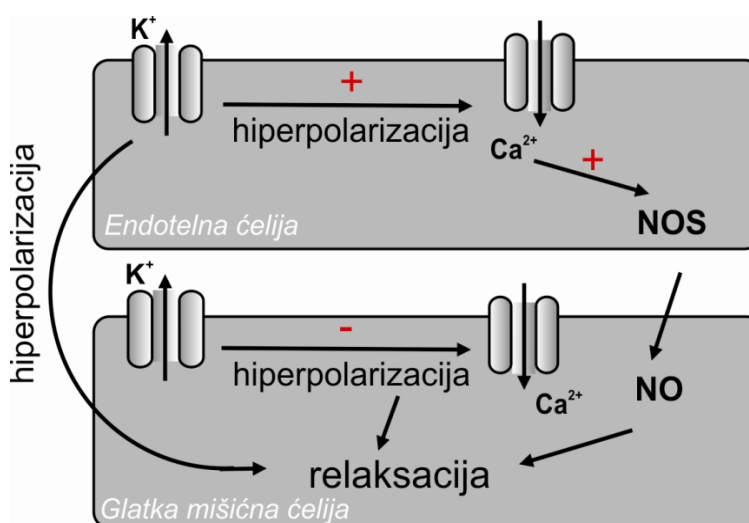
TM, transmembranski.

VASKULARNI K^+ KANALI

Uloga vaskularnih K^+ kanala

Kontrolišući protok K^+ jona kroz plazma membranu, K^+ kanali imaju ključnu ulogu u određivanju i regulisanju vaskularne reaktivnosti (Jackson, 2017; Jepps, 2017).

Otvaranjem K^+ kanala dolazi do izlaska K^+ i hiperpolarizacije membrane (Slika 2). U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama posledično dolazi do zatvaranja voltažno-zavisnih kanala za Ca^{2+} , smanjenog ulaska Ca^{2+} i vazorelaksacije (Nelson i Quayle, 1995). S druge strane, hiperpolarizacija membrane endotelnih ćelija ne smanjuje već stimuliše ulazak Ca^{2+} , što vodi relaksaciji usled stimulacije oslobađanja relaksantnih faktora iz endotela, poput NO (Ledoux i sar., 2006) (Slika 2). Suprotno, zatvaranje K^+ kanala dovodi do depolarizacije membrane i vazokonstrukcije (Ko i sar., 2008). Vazokonstriktorne i vazodilatatorne supstance, barem delimično, svoj efekat ostvaruju delujući na K^+ kanale, što uključuje ove kanale u sve aspekte regulacije vaskularnog tonusa.



Slika 2. Uloga K^+ kanala u regulaciji vaskularnog tonusa. NO, azot monoksid; NOS, NO sintaza.

Tipovi vaskularnih K^+ kanala

U vaskulaturi je eksprimiran veći broj izoformi najmanje 5 klasa K^+ kanala uključujući: K_V kanale, K_{Ca} kanale, K_{ir} i K_{ATP} kanale, kao i nekoliko članova K_{2P} familije kanala (Jackson, 2017). Pokazano je da ekspresija ovih kanala može značajno da varira među vaskularnim koritima, sa promenom veličine krvnog suda, ali i među ćelijama istog vaskularnog segmenta (Cox, 2005). Predmet našeg istraživanja bili su K_V , K_{Ca} i K_{ATP} kanali s obzirom da je njihova uloga u dejstvu gasovitih medijatora, NO i H_2S , sugerisana u prethodnim studijama.

K_V kanali

Sa 12 podfamilija (K_{V1} - K_{V12}) (Tabela 1), K_V kanali čine najveću familiju K^+ kanala sa identifikovanih 40 kodirajućih gena kod sisara (Tykocki i sar., 2017). U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama široko su distribuirani, posebno K_{V1} podfamilija.

Fiziološki, K_V kanali doprinose generisanju membranskog potencijala mirovanja i regulaciji vaskularnog tonusa (Jackson, 2005). Pokazano je da je potencijal mirovanja glatkih mišićnih ćelija, posebno u vaskulaturi, blizu praga aktivacije K_V kanala (Nelson i Quayle, 1995), kao i da blokatori K_V kanala, kao što su 3,4-diaminopiridin ili 4-aminopiridin, uzrokuju kontrakciju različitih krvnih sudova

(Cook, 1989; Hara i sar., 1980; Uchida i sar., 1986). K_V kanali se otvaraju kao odgovor na depolarizaciju membrane ograničavajući stepen depolarizacije i naknadnu vazokonstrikciju (Ko i sar., 2008). U skladu sa tim, blokada K_V kanala potencira kontrakciju indukovanu vazokonstriktorima (Jackson, 2017), ali i mehanizam dejstva pojedinih vazokonstrikturnih supstanci uključuje zatvaranje K_V kanala (Clément-Chomienne i sar., 1996; Mistry i Garland, 1999; Sung i sar., 2013).

K_V kanali su uključeni i u mehanizam dejstva brojnih vazodilatatornih supstanci. Pokazano je da dilatatori koji deluju preko signalnog puta ciklični adenozin-monofosfat (cAMP)/protein kinaza A (PKA) aktiviraju 4-aminopiridin-senzitivne K_V kanale (Berwick i sar., 2010; Dong i sar., 1998; Li i sar., 2003) i modulišu aktivnost K_{V7} kanala (Chadha i sar., 2012; 2014). Pored toga, u nekim vaskularnim koritima, vazodilatacija izazvana NO-om i NO donorima, H_2S -om, antikonaltilnim supstancama iz perivaskularnog tkiva, posredovana je aktivacijom K_V kanala.

K_{Ca} kanali

Drugu veliku grupu K^+ kanala čine K_{Ca} kanali. Na osnovu provodljivosti, podeljeni su na kanale velike provodljivosti (BK_{Ca} ili $K_{Ca1.1}$), srednje provodljivosti (IK_{Ca} ili $K_{Ca3.1}$) i male provodljivosti (SK_{Ca}) koja uključuje 3 člana ($K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.2}$ i $K_{Ca2.3}$) (Tabela 1) (Alexander i sar., 2019; Hu i Zhang, 2012).

BK_{Ca} kanali pokazuju delimičnu homologiju sa K_V kanalima. Mogu biti aktivirani depolarizacijom membrane, ali za razliku od K_V kanala imaju citoplazmatski deo koji sadrži 2 domena odgovorna za osetljivost kanala na Ca^{2+} (Hu i Zhang, 2012; Ledoux i sar., 2006). Povezivanje sa β subjedinicama, među kojima je najčešća izoforma eksprimirana u vaskularnim glatkim mišićima $K_{Ca\beta1}$, povećava osetljivost kanala na Ca^{2+} (Hu i Zhang, 2012).

Za razliku od BK_{Ca} kanala, SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali su neosetljivi na promenu membranskog potencijala. Aktiviraju se isključivo vezivanjem Ca^{2+} , i to ne direktno za kanal, već za kalmodulin koji je konstitutivno vezan za C-terminalni kraj ovih kanala (Hu i Zhang, 2012; Wei i sar., 2005). Jedina sličnost sa ostalim K^+ kanalima jeste region koji gradi poru S5-S6 (Ledoux i sar., 2006).

Sva tri podtipa K_{Ca} kanala su eksprimirana u vaskularnom zidu, ali sa različitom ćelijskom i subćelijskom lokalizacijom (Félétou, 2016). BK_{Ca} kanali su dominantno eksprimirani na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. Njihova aktivacija posledica je porasta intraćelijskog Ca^{2+} , bilo oslobađanjem Ca^{2+} iz ćelijskih depoa (spontano ili stimulirano agonistima) ili ulaskom spoljašnjeg Ca^{2+} otvaranjem voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala L-tipa. Generalno, oni učestvuju u generisanju membranskog potencijala mirovanja, regulaciji vaskularnog tonusa i deluju kao kompenzatorni mehanizam za ublažavanje vazokonstrikcije (Hu i Zhang, 2012). Tako, na primer, pokazano je da primena blokatora BK_{Ca} kanala dovodi do kontrakcije različitih izolovanih životinjskih krvnih sudova i da povećava vaskularni otpor u krvnim sudovima podlaktice kod ljudi (Ozkor i sar., 2011).

Vaskularni BK_{Ca} kanali učestvuju u dejstvu različitih vazoaktivnih supstanci, a jedan od mehanizama regulacije aktivnosti ovih kanala jeste fosforilacija. Vazokonstriktorne supstance mogu inhibirati BK_{Ca} kanale posredstvom protein kinaze C (PKC) ili tirozin kinaze c-*Src* (Alioua i sar., 2002; Lange i sar., 1997), ali i aktivirati ove kanale što ima za cilj da limitira kontrakciju i mogući vazospazam (Jackson, 2017). Vazodilatatori koji deluju posredstvom cAMP/PKA (npr. izoproterenol) ili ciklični gvanozin-monofosfat (cGMP)/protein kinaza G (PKG) signalnog puta (npr. NO) generalno dovode do aktivacije BK_{Ca} kanala (Jackson, 2017).

Sa druge strane, SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali se dominantno nalaze na endotelnim ćelijama, ali različito lokalizovani: IK_{Ca} kanali uglavnom na mestima kontakta endotelnih i glatkih mišićnih ćelija, a SK_{Ca} (naročito $K_{Ca2.3}$) na površini endotelnih ćelija, najvećim delom na mestima kontakta samih endotelnih ćelija (Félétou, 2016). Endotelni K_{Ca} kanali imaju važnu ulogu u endotel-zavisnoj hiperpolarizaciji (engl. *endothelium-dependent hyperpolarization*, EDH), kao i u sintezi NO i drugih relaksantnih faktora iz endotela. Porast nivoa Ca^{2+} u endotelnim ćelijama vodi aktivaciji ova dva tipa K_{Ca} kanala

uzrokujući hiperpolarizaciju koja se širi duž endotela ili prenosi na glatke mišićne ćelije (Yang i sar., 2014). Posledična endotel-zavisna hiperpolarizacija bliskih glatkih mišićnih ćelija vodi zatvaranju voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala L-tipa i vazorelaksaciji. Osim toga, hiperpolarizacija izazvana aktivacijom K_{Ca} kanala favorizuje ulazak Ca^{2+} u endotelne ćelije povećanjem elektrohemijskog gradijenta za Ca^{2+} , što vodi aktivaciji Ca^{2+} -senzitivnih enzima, uključujući NO sintazu (NOS) (Félétou, 2016), još jednom pokazujući značaj ovih kanala u regulaciji vaskularnog tonusa. U prilog tome, osim u studijama na životinjama (Brähler i sar., 2009; Doughty i sar., 1999), značaj IK_{Ca} i SK_{Ca} ($\text{K}_{\text{Ca}2.3}$) kanala pokazan je u regulaciji arterijskog tonusa na humanim krvnim sudovima, i to gastroepiploičnoj arteriji, arterijama omentuma i miometrijuma i arteriolama skeletnih mišića kod pacijenata nakon kardiopulmonalne bajpas operacije (Grgić i sar., 2010).

K_{ATP} kanali

Kalijumovi kanali čija aktivnost nije regulisana depolarizacijom i/ili nivoom Ca^{2+} (kao kod K_{V} i K_{Ca} kanala) označavaju se kao ulazno-ispravljački kanali. Ime im potiče od svojstva rektifikacije koju poseduju, tj. smanjenju izlazne struje na potencijalu pozitivnijem od ekvilibrijuma za K^{+} . Podfamilija $\text{K}_{\text{ir}6}$ je jedinstvena među K_{ir} kanalima jer je prisustvo pomoćne subjedinice apsolutno neophodno za izgradnju funkcionalnog kanala. Članovi ove podfamilije ($\text{K}_{\text{ir}6.1}$ i $\text{K}_{\text{ir}6.2}$) učestvuju kao subjedinice u izgradnji pore K_{ATP} kanala (Foster i Coetzee, 2016). Funkcionalni K_{ATP} kanali su hetero-oktamerni kompleksi sastavljeni iz 4 $\text{K}_{\text{ir}6.x}$ subjedinice i 4 regulatorne SUR subjedinice (SUR1, SUR2A ili SUR2B) (Olson i Terzic, 2010).

Ime samih kanala (ATP-senzitivni) potiče od osobine da se otvaranje kanala smanjuje sa povećanjem intraćelijske koncentracije ATP-a, dok su drugi tipovi K^{+} kanala uglavnom neosetljivi na intraćelijski ATP (Foster i Coetzee, 2016). Deo kanala odgovoran za osetljivost na ATP nalazi se u $\text{K}_{\text{ir}6.x}$ subjedinici (Tucker i sar., 1998), dok je SUR subjedinica mesto vezivanja derivata sulfoniluree, kao što je glibenklamid, koji blokiraju kanal i raznolike grupe otvarača K_{ATP} kanala, poput pinacidila, diazoksida, kromakilima, nikorandila i nukleozid-difosfata (Quayle i sar., 1997).

Raznolikost podtipova K_{ATP} kanala eksprimiranih u različitim ćelijama i tkivima, u pogledu biofizičkih i farmakoloških karakteristika (osetljivosti na nukleotide i farmakološke agense), delom potiče od specifičnih kombinacija $\text{K}_{\text{ir}6.x}$ i SURx subjedinica. Tako, na primer, ventrikularni kardiomiociti eksprimiraju K_{ATP} kanale sastavljene od $\text{K}_{\text{ir}6.2}/\text{SUR2A}$ subjedinica, ćelije pankreasa $\text{K}_{\text{ir}6.2}/\text{SUR1}$ subjedinica, dok su u vaskularnim glatkim mišićima dominantni kanali sa $\text{K}_{\text{ir}6.1}/\text{SUR2B}$ subjedinicama. Za otvaranje vaskularnih K_{ATP} kanala, za razliku od K_{ATP} kanala u srcu ili pankreasu, neophodno je prisustvo nukleozid-difosfata (ADP, uridil-difosfata (UDP), gvanozin-difosfata (GDP)). Zbog toga se funkcionalno ovi kanali često označavaju kao K_{NDP} , a kao rezultat njihovog otvaranja dolazi do hiperpolarizacije glatkih mišićnih ćelija, vazodilatacije i povećanja protoka krvi (Quayle i sar., 1997). Vaskularni $\text{K}_{\text{ATP}}/\text{K}_{\text{NDP}}$ kanali doprinose održavanju vaskularnog tonusa i regulaciji protoka krvi u koronarnoj, splanhičnoj, renalnoj cirkulaciji i u koži (Tykocki i sar., 2017). S obzirom na značajnu ulogu u vazoaktivnom dejstvu adenozina, angiotenzina II, hipoksije, fizičke aktivnosti i metaboličkih potreba, K_{ATP} kanali su esencijalni u održavanju bazalnog tonusa koronarnih arterija *in vivo* (Foster i Coetzee, 2016). Smatra se da su K_{ATP} kanali uključeni u proces autoregulacije na nivou srca (i mozga), koji podrazumeva održavanje relativno konstantnog protoka krvi uprkos promenama krvnog pritiska ili perfuzionog pritiska ovih organa (Tykocki i sar., 2017). Dodatno, otvaranje K_{ATP} kanala u kardiomiocitima tokom ishemije deluje kardioprotektivno (Tinker i sar., 2014).

Vazokonstriktorne supstance, kao što su noradrenalin, endotelin i fenilefrin, smanjuju aktivnost K_{ATP} kanala. Ovaj efekat može biti rezultat inhibicije adenilat-ciklaze i PKA ili aktivacije PKC i posledične direktne fosforilacije $\text{K}_{\text{ir}6.1}$ subjedinice (Tinker i sar., 2014). S druge strane, aktivacija PKA u glatkim mišićnim ćelijama, dejstvom, na primer, adenozina, prostaglandina i agonista β adrenergičkih receptora, vodi otvaranju K_{ATP} kanala i vazodilataciji. Pokazano je da direktna fosforilacija obe

subjedinice, $K_{ir6.1}$ i SUR2B, posreduje u ovom efektu (Quinn i sar., 2004; Shi i sar., 2007). Takođe, K_{ATP} kanali imaju ulogu i u efektima NO i NO donora, i aktivacije cGMP/PKG puta u određenim vaskularnim koritima, kao i u vazodilatatornom delovanju H_2S .

PROMENA K^+ KANALA U PATOLOŠKIM STANJIMA

S obzirom na značajne fiziološke uloge K^+ kanala na nivou krvnih sudova, poput održavanja bazalnog tonusa i adekvatne perfuzije organa, odgovora vaskulature na promene pritiska, vazokonstriktorne i vazodilatatorne supstance, ne iznenađuje činjenica da se upravo poremećaj njihove funkcije povezuje sa poremećajem vaskularne reaktivnosti u različitim patološkim stanjima. Uticaj bolesti na vaskularni odgovor posredovan K^+ kanalima može biti posledica direktnog uticaja na ekspresiju ili funkciju kanala, ali i posredan, usled ometanja sinteze ili dejstva relaksantnih faktora iz endotela koji svoje efekte ostvaruju, barem delimično, preko K^+ kanala (Gutterman i sar., 2016). U određenim situacijama, povećana funkcija K^+ kanala može kompenzovati povećanje vaskularnog tonusa (Asano i sar., 1995; Wiecha i sar., 1997), ali u većini slučajeva protok K^+ je smanjen (Cox, 2005; Hu i Zhang, 2012; Miura i sar., 2003).

Smanjena funkcija/ekspresija K_V kanali pokazana je u hipertenziji, hipertrofiji miokarda i gojaznosti, a može doprineti i vaskularnim komplikacijama dijabetesa (Jackson, 2017; Ko i sar., 2008; Nieves-Cintrón i sar., 2018). Malobrojna ispitivanja na humanim krvnim sudovima pokazala su, na primer, da na koronarnim arterijama i arterijama adipoznog tkiva pacijenata sa ishemijskom bolešću srca dolazi do smanjene funkcije 4-aminopiridin-senzitivnih K_V kanala, posebno $K_V1.5$ kanala, kao i da to doprinosi smanjenoj vazodilataciji u odgovoru na fiziološke stimuluse (cAMP-zavisne vazodilatatore) (Nishijima i sar., 2017; 2018).

Dijabetes, gojaznost i hipertenzija mogu uticati i na funkciju BK_{Ca} kanala, a njihova promenjena funkcija pokazana je i u stanjima hipoksije, šoka, ishemijskoj bolesti srca, kao i kod starije populacije (Hu i Zhang, 2012; Jackson, 2017). Jedna epidemiološka studija je pokazala da je polimorfizam $\beta 1$ subjedinice humanih BK_{Ca} kanala, koji vodi povećanoj osetljivosti kanala na Ca^{2+} (*gain-of-function* mutacija), povezan sa niskom prevalencom umerene i teške dijastolne hipertenzije (Fernández-Fernández i sar., 2004). Takođe, nedavno je pokazano da kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 dolazi do smanjene sposobnosti BK_{Ca} kanala u arterijama otpora da se suprotstave vazokonstrikciji izazvanoj pritiskom (Nieves-Cintrón i sar., 2017), a njihova smanjena aktivnost i ekspresija verovatno doprinose povećanom riziku od koronarnog spazma i ishemije miokarda kod starije populacije (Hu i Zhang, 2012).

Promene na nivou K_{ATP} kanala javljaju se u hipertenziji, ishemiji i dijabetesu (Ko i sar., 2008), a njihova smanjena funkcija/ekspresija sugerisana je i na animalnim modelima gojaznosti i metaboličkog sindroma (Hodnett i sar., 2008; Miller i sar., 2002). Tako, na primer, pored poznate uloge pankreasnih K_{ATP} kanala u dijabetesu, pacijenti sa dijabetesom pokazuju i izmenjenu funkciju vaskularnih K_{ATP} kanala. Smanjena relaksacija izolovane mamilarne arterije izazvana kromakalimom (Irat i sar., 2006), kao i redukovana vazodilatacija koronarnih arterija u odgovoru na hipoksiju i K_{ATP} stimulaciju, pokazane su kod pacijenata sa dijabetesom u odnosu na osobe bez dijabetesa, što može doprineti povećanom ishemijskom oštećenju miokarda kod ovih pacijenata (Miura i sar., 2003).

Promene u funkciji i/ili ekspresiji endotelnih K_{Ca} kanala, barem delimično, mogu doprineti oštećenju EDH-posredovanog relaksantnog odgovora i endotelnoj disfunkciji koja postoji kod kardiovaskularnih bolesti (Goto i Kitazono, 2019; Goto i sar., 2018). Poremećaj i NO-zavisne i EDH-zavisne relaksacije pokazan je na arterijama omentuma pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom (Li i sar., 2007), kao i na nivou potkožnih arterija pacijenata sa akromegalijom, kod kojih je prevalenca hipertenzije i dijabetesa povećana (Paisley i sar., 2009). Takođe, pokazano je da smanjena funkcija SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala, bez promenjene ekspresije, doprinosi disfunkciji koronarnih arterija pacijenata sa

dijabetesom tipa 2, podvrgnutih aorto-koronarnoj bajpas operaciji (Liu i sar., 2015), a da smanjenje endotelnih IK_{Ca} kanala na nivou arterija miometrijuma doprinosi razvoju preeklampsije (Kenny i sar., 2002).

Dokazi o promeni ekspresije/funkcije K^+ kanala u određenim patofiziološkim stanjima čine ih pogodnom terapijskom metom u farmakološkim intervencijama. Terapijski potencijal agenasa koji deluju na ove kanale je veliki, a bolje razumevanje njihovog mehanizama delovanja može pomoći adekvatnijoj terapijskoj primeni. Istovremeno, relativno mali broj otvarača i blokatora K^+ kanala je trenutno u kliničkoj upotrebi, uključujući blokatore K_{ATP} kanala, kao antidijabetike, blokatore HERG kanala kao antiaritmike i otvarače K_{ATP} kanala, kao što je nikorandil, u terapiji angine pektoris.

AZOT MONOKSID

Činjenica da acetilholin kontrahuje sve glatke mišiće u organizmu, a dovodi do relaksacije krvnih sudova, dugo je predstavljala misteriju za naučnike. Početkom osamdesetih godina 20. veka, Robert Furchgott pokazao je da je za efekat acetilholina neophodno prisustvo endotelnih ćelija i da, delujući na muskarinske receptore, acetilholin stimuliše oslobađanje nepoznatog signalnog molekula koji dovodi do relaksacije glatkih mišića krvnih sudova (Furchgott i Zawadzki, 1980). Taj signalni molekul je nazvan relaksantni faktor poreklom iz endotela (engl. *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF), a 1986. god. su, nezavisno jedan od drugog, Robert Furchgott i Loius Ignarro izneli potvrde da je to slobodni radikal, gas NO (Furchgott, 1998). To je bilo prvo otkriće da gas može biti signalni molekul u organizmu. Iznenadujuće je bilo da jednostavan molekul, uobičajeni zagađivač vazduha, može imati tako važnu funkciju. Dalje studije su pokazale da je NO ključni molekul u kardiovaskularnom sistemu, ali da ima i brojne druge funkcije u organizmu. Časopis Science je 1992. god. proglasio NO „Molekulom godine“, a 1998. god. Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu zajedno su dobili Robert Furchgott, Ferid Murad i Loius Ignarro za otkrića u vezi „NO kao signalnog molekula u kardiovaskularnom sistemu“. Ferid Murad je 1977. pokazao da je upravo NO biološki aktivni molekul koji oslobađaju nitroglicerina i njemu srodni vazodilatatori (The Nobel Prize organization, 1998).

SINTEZA NO

U ćelijama sisara, sinteza NO odvija se dejstvom enzima NOS (E.C. 1.14.13.39). Postoje 3 izoforme NOS, koje su označene kao: neuralna NOS (nNOS ili NOS I), inducibilna NOS (iNOS ili NOS II) i endotelna NOS (eNOS ili NOS III). Sve izoforme koriste L-arginin kao endogeni supstrat za sintezu NO (Billiar i sar., 2019a). Izoforme NOS se sintetišu kao monomeri, ali je za katalizovanje reakcije stvaranja NO neophodno formiranje homodimera, kao i prisustvo različitih kofaktora. Monomerni oblik enzima ne može da veže supstrat i tetrahidrobiopterin (BH_4) kao kofaktor, pa umesto NO stvara superoksidni anjon (O_2^-) (Förstermann i Sessa, 2012; Zhao i sar., 2015). Ova pojava se naziva NOS razdvajanje (engl. *uncoupling*) i predstavlja osnovno obeležje većine kardiovaskularnih bolesti (Daiber i sar., 2018). Zbog toga je dimerizacija enzima mnogo važnija za sintezu NO, nego samo prisustvo enzimskih proteina u ćeliji.

Za katalitičku aktivnost svih izoformi NOS neophodno je da se enzim veže za kalmodulin. Do vezivanja kalmodulina za nNOS i eNOS dolazi nakon povećanja intracelularne koncentracije Ca^{2+} , dok se za iNOS kalmodulin vezuje visokim afinitetom čak i u odsustvu Ca^{2+} , zbog razlike u aminokiselinskoj strukturi vezujućeg mesta (Förstermann i Sessa, 2012).

Distribucija NOS

Endotelna NOS je konstitutivno eksprimirana primarno u endotelnim ćelijama i predstavlja glavni izoenzim NOS odgovoran za regulaciju vaskularne funkcije. Osim u endotelu, detektovana je i u kardiomiocitima, trombocitima, određenim neuronima mozga i sincicio-trofoblastima humane placentе (Förstermann i Sessa, 2012). Njena aktivnost, samim tim i sinteza NO, regulisana je različitim fizičkim, hemijskim i humoralnim faktorima, na Ca^{2+} -zavisan ili Ca^{2+} -nezavisan način (Zhao i sar., 2015).

Agonisti poput acetilholina, bradikinina i histamina, preko specifičnih receptora na membrani endotelnih ćelija, indukuju porast nivoa intraćelijskog Ca^{2+} čiji se kompleks sa kalmodulinom vezuje za enzim i aktivira ga. S druge strane, fosforilacija eNOS može, nezavisno od promena nivoa Ca^{2+} , da utiče na njegovu enzimsku aktivnost (Zhao i sar., 2015). Protein eNOS može biti fosforilisan na nekoliko serinskih (Ser), treoninskih (Thr) i tirozinskih (Tyr) ostataka (Fleming i Busse, 2003). Do fosforilacije Ser¹¹⁷⁷ i posledične aktivacije enzima dolazi, na primer, dejstvom pritiska smicanja, estrogena, faktora rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i insulina, uz učešće različitih kinaza. Stimulusi koji povećavaju intraćelijsku koncentraciju Ca^{2+} , kao što je bradikinin, delom povećavaju aktivnost eNOS defosforilacijom Thr⁴⁹⁵, čime se znatno više Ca^{2+} /kalmodulina veže za enzim (Fleming i Busse, 2003; Förstermann i Sessa, 2012).

Neuralna NOS je konstitutivno eksprimirana u centralnom i perifernom nervnom sistemu (mozgu, kičmenoj moždini, simpatičkim ganglijama, nitregeričkim neuronima...), ali je identifikovana i u srčanim, skeletnim i glatkim mišićnim ćelijama, endotelnim ćelijama, ćelijama makule dense bubrega i adventiciji (*tunica externa*) penilnih arterija (Förstermann i Sessa, 2012; Zhao i sar., 2015). Dejstvom nNOS nastaje NO koji ima ulogu u regulaciji procesa učenja i pamćenja, kao i dugotrajnoj regulaciji sinaptičke transmisije (dugotrajna potencijacija i dugotrajna inhibicija), a postoje dokazi da je uključen i u centralnu regulaciju krvnog pritiska (Förstermann i Sessa, 2012; Sakuma i sar., 1992). NO oslobođen iz nitregeričkih neurona može smanjiti tonus glatkih mišića mnogih organa koji su inervisani ovim neuronima, uključujući i krvne sudove (Förstermann i Sessa, 2012). Eksperimentalni podaci ukazuju da nNOS učestvuje u lokalnoj regulaciji vaskularnog tonusa nezavisno od centralnog nervnog sistema, kao i da niski nivoi nNOS u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, mogu, u situacijama disfunkcije eNOS, da održavaju određeni stepen vazodilatacije (Melikian i sar., 2009; Schwarz i sar., 1999). Nivo ekspresije vaskularne nNOS povećava se dejstvom angiotenzina II, faktora rasta poreklom iz trombocita ili statina, dok je smanjena ekspresija nNOS pokazana kod pacijenata sa erektilnom disfunkcijom (Zhao i sar., 2015).

Inducibilna NOS je minimalno prisutna/eksprimirana u ćelijama pod fiziološkim uslovima, a do indukcije ekspresije obično dolazi tokom infekcije, hronične inflamacije ili u tumorima (Zhao i sar., 2015). Ekspresija iNOS u endotelu, izazvana inflamacijom, može doprineti vaskularnoj disfunkciji smanjujući dostupnost kofaktora BH_4 za eNOS (Gunnnett i sar., 2005). Takođe, masivna vazodilatacija i hipotenzija u septičkom šoku uglavnom su posledica prekomerne produkcije NO pod dejstvom iNOS indukovanoj u zidu krvnog suda proinflamatornim citokinima (Förstermann i Sessa, 2012).

Za ispitivanje fiziološke uloge NO u biološkim sistemima koriste se NOS inhibitori, poput analoga L-arginina: N^G -nitro-L-arginin (L-NNA) i N^G -nitro-L-arginin metil estar (L-NAME), koji vrše kompetitivnu inhibiciju enzima (Billiar i sar., 2019; Knowles i Moncada, 1994).

Iako se NO u krvnim sudovima uglavnom stvara iz L-arginina dejstvom eNOS, postoje i drugi izvori vaskularnog NO. S-nitrozilovani proteini, kao što su S-nitrozohemoglobin, S-nitrozoglutation i S-nitrozoalbumin, koji delom nastaju u reakciji NO i reaktivnih tiolnih grupa ovih proteina, mogu služiti kao cirkulišući depo, ali i izvor NO u procesu kontrolisanom nivoom kiseonika u krvi. Takođe, nitrati i nitriti predstavljaju produkte metabolizma NO, ali i njegov rezervoar. Pod određenim uslovima, različiti enzimi (citohrom P450, citohrom P450 reduktaza, aldehid dehidrogenaza 2, hemoglobin, mioglobin...) mogu katalizovati redukciju nitrata ili nitrita i stvaranje NO (Zhao i sar., 2015).

VODONIK-SULFID

Toksična priroda H₂S poznata je već nekoliko vekova, a prvi dokazi da može biti sintetisan u tkivu sisara proistekli su iz rada biohemičara Vinsenta Du Vigneuda¹ koji je još 1942. god. opisao da homogenat jetre sintetiše H₂S iz aminokiselina koje sadrže sumpor. U periodu od šezdesetih do ranih osamdesetih godina 20. veka, nekoliko istraživačkih grupa je detaljnije okarakterisalo enzime koji učestvuju u sintezi H₂S u različitim tkivima sisara, ali, kao ni u radu Du Vigneuda, nije bilo sugestija o potencijalnom biološkom značaju ovog gasa, niti testiranja njegove uloge. Tokom 1989. i 1990. god., u primarno toksikološkim studijama, objavljeni su rezultati o koncentracijama H₂S u moždanom tkivu životinja i ljudi nakon ekspozicije egzogenom H₂S, ali ono što je bilo značajno, i podatak da moždano tkivo i bez izlaganja egzogenom izvoru sadrži određene količine ovog gasa. Tada je prvi put pretpostavljeno da H₂S može imati ulogu u fiziološkim, kao i patofiziološkim procesima u mozgu (Szabo, 2018). Inspirisani ovim nalazima, naučnici Abe i Kimura su u nizu eksperimenata po prvi put dokazali da se H₂S sintetiše u tkivu sisara (u mozgu) i da služi kao biološki signalni molekul (Abe i Kimura, 1996). Rad koji su objavili 1996. god. predstavlja najviše citirani originalni rad na polju biologije H₂S i često se smatra početnom tačkom svih istraživanja koja su usledila o fiziološkom značaju endogenog H₂S (Szabo, 2018).

Vodonik-sulfid je bezbojni, zapaljivi gas. Dok u malim koncentracijama ima karakterističan miris na pokvarena jaja, u velikim koncentracijama izaziva paralizu olfaktornog nerva (Wu i sar., 2016). Slaba je kiselina i u vodenom rastvoru se nalazi u ravnoteži sa hidrogensulfidnim (HS⁻) i sulfidnim (S²⁻) anjonom. Hemijska priroda molekula odgovornih za biološku aktivnost H₂S i dalje nije potpuno jasna: pokazano je da sam H₂S, HS⁻ anjon, polisulfidi, ali i S/N hibridne vrste, utiču na različite signalne puteve izazivajući biološke odgovore (Kanagy i sar. 2017). Smatra se da je primarni mehanizam kojim H₂S utiče na aktivnost signalnih proteina persulfidacija ili sulfhidracija, posttranslaciona modifikacija cisteinskih ostataka (RSH) i stvaranje persulfida (RSSH), analogno S-nitrozilaciji pod dejstvom NO (Filipovic i sar., 2018). U zavisnosti od ciljnog proteina, efekat H₂S se može ispoljiti kroz nekoliko sekundi (npr. persulfidacija K_{ATP} kanala koja dovodi do hiperpolarizacije i relaksacije glatkih mišićnih ćelija), ali i zahtevati nekoliko sati ili dana (npr. persulfidacija proteina Keap-1 koja vodi povećanoj ekspresiji antioksidativnih gena) (Kanagy i sar. 2017).

SINTEZA H₂S

U ćelijama sisara, endogeni H₂S stvara se u enzimski katalizovanim reakcijama, kao i neenzimskim putevima. Enzimska sinteza odvija se u 3 enzimska puta dejstvom 4 enzima: cistationin γ -liaze (CSE, E.C. 4.4.1.1), cistationin β -sintaze (CBS, E.C. 4.2.1.22) i kombinovanim dejstvom 3-merkatopiruvat sulfurtransferaze (3-MST, E.C. 2.8.1.2) i L-cistein:2-oksoglutarat aminotransferaze (CAT, E.C. 4.4.1.13) (Billiar i sar., 2019b). Dodatno, H₂S može nastati redukcijom tiosulfata i sulfita, kao i iz neorganskih polisulfida i proteinskih persulfida. Do sada, tačan doprinos enzimskih i neenzimskih izvora nije određivan u biološkim sistemima. Enzimi CBS i CSE katalizuju brojne reakcije u kojima nastaje H₂S koristeći L-cistein, L-homocistein i L-cistationin kao supstrat (Olas, 2015; Szabo i Papapetropoulos, 2017). Treći enzim, 3-MST, deo je kataboličkog puta L-cisteina, gde se L-cistein dejstvom CAT prevodi u 3-merkatopiruvat koji predstavlja supstrat za 3-MST u sintezi H₂S (Giuffrè i Vicente, 2018). Piridoksal 5'-fosfat (vitamin B6) neophodan je kao kofaktor za dejstvo CBS, CSE i CAT, dok je 3-MST cink-zavisan enzim (Billiar i sar, 2019b).

Enzim CSE je homotetramerni, citosolni enzim. Pod određenim eksperimentalnim uslovima, kompleks Ca²⁺/kalmodulin pokazuje blago stimulatorno dejstvo na aktivnost CSE (Colleta i sar., 2012;

¹ Naučnik Du Vigneud je za svoj rad na oksitocinu nagrađen Nobelovom nagradom 1955. god.

Yang i sar., 2008), ali u drugim taj uticaj nije pokazan (Mikami i sar., 2013). Postojanje specifičnih inhibitora, među kojima su najznačajniji DL-propargilglicin (PAG) i β -cijano-L-alanin (BCA), jako je važno za ispitivanje uloge H_2S , ali i samog CSE. Za razliku od BCA, PAG je ireverzibilni inhibitor koji interferira sa vezivanjem supstrata i ne utiče na kofaktor. Iako mogu da inhibiraju i druge enzime, kada je reč o sintezi H_2S , PAG i BCA dominantno inhibiraju CSE u poređenju sa CBS (BCA može u visokim koncentracijama da inhibira rekombinantni CBS) (Szabo i Papapetropoulos, 2017).

Enzim CBS je, kao i CSE, homotetramer, prevashodno lokalizovan u citosolu, mada je njegovo prisustvo pokazano i u mitohondrijama normalnih i tumorskih ćelija. Kao inhibitor CBS dugo je korišćena aminooksisirćetna kiselina, uprkos ograničenoj selektivnosti. S obzirom da interferira sa vezivanjem kofaktora, utiče, kako na ostale enzime u sintezi H_2S , CSE i CAT, tako i na druge vitamin B6-zavisne enzime (Szabo i Papapetropoulos, 2017).

Enzim 3-MST postoji u ravnoteži monomernog i dimernog oblika, i lokalizovan je u citosolu i u mitohondrijama (Billiar i sar., 2019b; Nagahara, 2013). Ispitivanje uloge 3-MST otežano je činjenicom da do skoro nije bilo specifičnih inhibitora ovog enzima. Nedavno je skriningom velikog broja hemijskih jedinjenja izdvojeno nekoliko koji pokazuju veliku potentnost i selektivnost ka 3-MST u odnosu na druge enzime koji učestvuju u sintezi H_2S , što će značajno pomoći u rasvetljavanju njegove uloge u fiziološkim i patofiziološkim stanjima (Szabo i Papapetropoulos, 2017).

Za razliku od procesa sinteze NO dejstvom NOS, gde se u biološkim eksperimentima D-arginin koristi kao negativna kontrola za L-arginin (Moncada i sar., 1991), nedavno je pokazano da D-cistein može služiti kao supstrat u sintezi H_2S preko 3-MST puta (Shibuya i sar., 2013). Dejstvom enzima oksidaze D-amino kiselina (DAO, E.S. 4.4.1.10), D-cistein se prevodi u 3-merkatopiruvat koji je supstrat za dalju sintezu H_2S . Ipak, doprinos ovog puta ukupnoj sintezi H_2S pokazan je samo u mozgu (naročito cerebelumu) i bubrezima (u kojima je sinteza H_2S iz D-cisteina u odnosu na L-cistein veća 80 puta), a njegov biološki značaj samo u stanjima ishemijskog oštećenja bubrega (Shibuya i sar., 2013).

Distribucija enzima koji sintetišu H_2S

Ispitivanja distribucije enzima koji učestvuju u sintezi H_2S unutar različitih tkiva i organa, pokazala su da je CSE glavni izvor H_2S u perifernim tkivima, kao i da minimalno doprinosi sintezi u centralnom nervnom sistemu, gde je dominantno prisutan CBS. CSE je detektovan u kardiovaskularnom i respiratornom sistemu, jetri, bubrezima i drugim perifernim organima (Szabo i Papapetropoulos, 2017; Wang i sar., 2017). Enzim CBS se, osim u nervnom sistemu, nalazi i u jetri, bubrezima, pankreasu, a nedavno je dokazan i u krvnim sudovima (Giuffrè i Vicente, 2018; Rose 2018). Ekspresija 3-MST pokazana je u svim tkivima sisara, ali se nivoi mogu značajno razlikovati (Szabo i Papapetropoulos, 2017). Iako su sva tri enzima ekspimirana u vaskularnim ćelijama, regulacija njihove ekspresije je malo poznata. Povećana ekspresija CSE javlja se dejstvom reaktivih kiseoničnih radikala i porastom nivoa Ca^{2+} , dok laminarni pritisak smicanja utiče na povećanje ekspresije 3-MST (Kanagy i sar. 2017).

Na nivou humanog kardiovaskularnog sistema, CSE se smatra glavnim enzimom u sintezi H_2S (Dongo i sar., 2017). Kada su u pitanju humani krvni sudovi, do danas je pokazana ekspresija CSE u veni safeni i umbilikalnoj arteriji (Gomez i sar., 2016; Peng i sar., 2017), CSE i 3-MST u mikrocirkulaciji kože (Kutz i sar., 2015), a CSE, 3-MST i CAT u unutrašnjoj torakalnoj arteriji (Webb i sar., 2008; Yuan i sar., 2019).

Većina vaskularnih studija ispitivala je i ispituje ulogu CSE, pre svega zbog dostupnosti boljih farmakoloških inhibitora. Osim toga, upotreba CBS nokaut miševa je ograničena usled njihove velike smrtnosti već u prvim nedeljama života, dok CSE nokaut miševi razvijaju specifičan kardiovaskularni fenotip, ali, čini se, sa normalnim životnim vekom (Kanagy i sar. 2017).

GASOTRANSMITERI I VASKULARNI TONUS

Protok krvi kroz određeno vaskularno korito zavisi od gradijenta pritiska koji postoji kroz korito, kao i od njegovog otpora protoku krvi. Vaskularni tonus, odnosno kontraktilno stanje vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, predstavlja osnovnu determinantu dijametra krvnog suda, zbog čega je pod stalnom kontrolom fizioloških faktora koji regulišu distribuciju krvi i obezbeđuju adekvatnu perfuziju tkiva shodno metaboličkim potrebama (Akata, 2007). Vaskularni tonus određen je intravaskularnim pritiskom, kao i ravnotežom vazokonstriktornih i vazodilatatornih signala: neurotransmitera, cirkulišućih hormona, medijatora iz endotela, lokalnih medijatora i jona (Tykocki i sar., 2017).

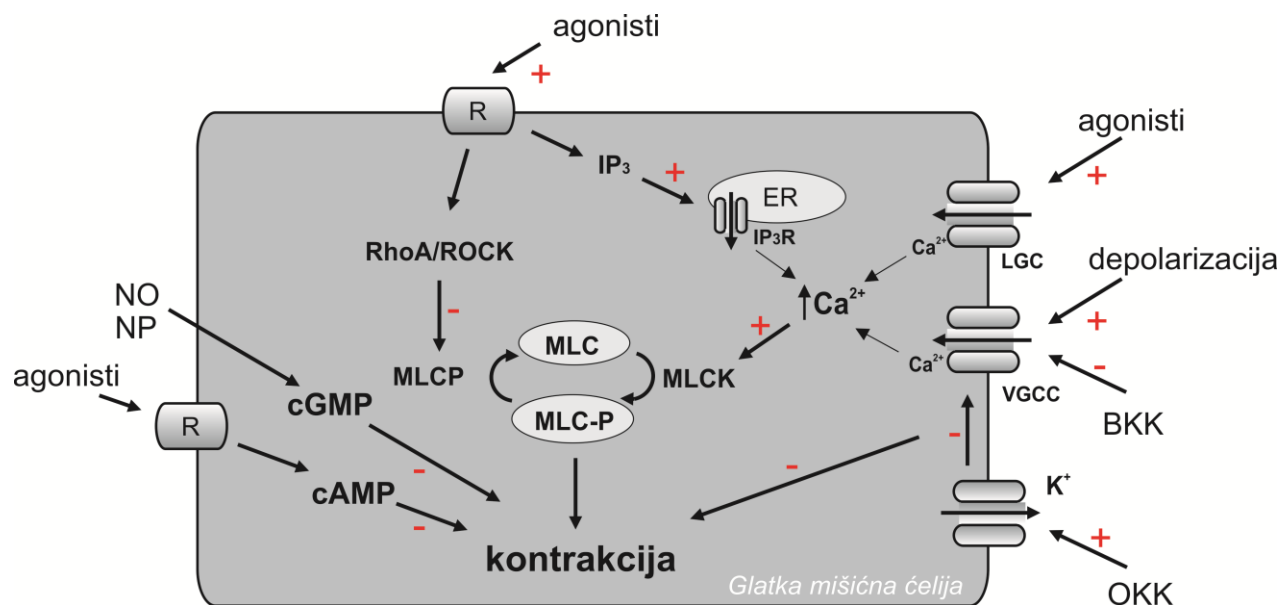
Ključni korak u regulaciji kontrakcije i relaksacije glatkih mišićnih ćelija jeste promena nivoa intraćelijskog Ca^{2+} (Slika 3). Agensi koji uzrokuju kontrakciju dovode, preko jednog ili više mehanizama, do porasta nivoa intraćelijskog Ca^{2+} , i to:

- 1) stimulacijom ulaska ekstraćelijskog Ca^{2+} (depolarizacijom membrane i aktivacijom voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala ili aktivacijom ligand-zavisnih Ca^{2+} kanala); ili
- 2) oslobađanjem Ca^{2+} iz intraćelijskih depoa (endoplazmatskog retikuluma) aktivacijom receptora za inozitol-1,4,5-trifosfat (IP_3) (Rang i sar., 2016).

Porast koncentracije Ca^{2+} u ćeliji dovodi do kontrakcije aktivacijom Ca^{2+} /kalmodulin-zavisne kinaze lakih lanaca miozina (MLCK), koja fosforiliše lake lance miozina (MLC) i omogućava interakciju miozinskih i aktinskih filamenata. Pored toga, kontraktilni aparat može biti aktiviran i nezavisno od porasta Ca^{2+} u ćeliji, a ovaj fenomen je poznat kao senzitivizacija na Ca^{2+} (Hofman i sar., 2009).

Sa druge strane, relaksacija glatkih mišićnih ćelija posledica je smanjenja intraćelijskog Ca^{2+} , što inaktivira MLCK uz defosforilaciju MLC dejstvom specifične MLC fosfataze (MLCP), i/ili Ca^{2+} desenzitivizacije, tj. smanjene osetljivosti kontraktilnog aparata na Ca^{2+} . Do relaksacije dovode agensi koji:

- 1) inhibiraju ulazak Ca^{2+} kroz voltažno-zavisne Ca^{2+} kanale, direktno ili indirektno (izazivanjem hiperpolarizacije); ili
- 2) dovode do povećanja koncentracije sekundarnih glasnika cAMP-a i cGMP-a koji putem više mehanizama dovode do smanjenja koncentracije intraćelijskog Ca^{2+} i/ili Ca^{2+} desenzitivizacije (Rang i sar., 2016).



Slika 3. Šematski prikaz regulacije kontraktilnosti vaskularne glatke mišićne ćelije. BKK, blokatori Ca^{2+} kanala; cAMP, ciklični adenzin-monofosfat; cGMP, ciklični gvanozin-monofosfat; IP_3 , inozitol-1,4,5-trifosfat; LGC, ligand-zavisni Ca^{2+} kanal; MLC, laki lanci miozina; MLC-P, fosforilisani MLC; MLCK, MLC kinaza; MLCP, MLC fosfataza; NO, azot monoksid; NP, natriuretski peptid; OKK, otvarač K^+ kanala; R, receptor; ROCK, RhoA (engl. *Ras homolog gene family member A*)-zavisna kinaza; ER, endoplazmatski retikulum; VGCC, voltažno-zavisni Ca^{2+} kanal.

NO I VASKULARNI TONUS

NO se smatra jednim od najpotentnijih endogenih vazodilatatora. Nakon sinteze u endotelnim ćelijama krvnih sudova, difunduje u glatke mišićne ćelije gde interaguje sa različitim ciljnim molekulima, a može delovati i u samom endotelu. Jedan od najbolje okarakterisanih i verovatno najznačajnijih signalnih puteva aktiviranih NO-om, kada je u pitanju regulacija vaskularnog tonusa, jeste NO/cGMP signalni put. Stimulacijom enzima gvaniilat ciklaze (GC) u glatkoj mišićnoj ćeliji, NO dovodi do porasta cGMP-a, posledične aktivacije PKG i relaksacije. Osim toga, svoje relaksantno dejstvo NO može ostvariti i nezavisno od stimulacije porasta cGMP-a (Gheibi i sar., 2018; Zhao i sar., 2015).

cGMP-zavisno dejstvo NO

U ćelijama sisara postoje dve podfamilije GC-e, transmembranska i solubilna. Obe poseduju enzimsku aktivnost, odnosno katalizuju konverziju gvanozin-trifosfata (GTP) u intraćelijski sekundarni glasnik cGMP, ali se razlikuju prema mehanizmu aktivacije. Naime, jedino solubilna GC posreduje u ćelijskim efektima NO, dok transmembranska predstavlja receptor za peptide, na primer, natriuretske peptide (Friebe i Koesling, 2009; Koesling i sar., 2017). Pošto je pokazana mogućnost da jedna od izoformi solubilne GC može biti vezana za membranu, pored naziva solubilna (ili citosolna) koristi se i naziv NO-senzitivna GC (E.C. 4.6.1.2) (Beuve i sar., 2019). NO-senzitivna GC predstavlja heterodimer sastavljen iz jedne α subjedinice (α_1 ili α_2) i jedne β subjedinice (β_1), koje daju dve izoforme enzima GC-1 ($\alpha_1\beta_1$) i GC-2 ($\alpha_2\beta_1$), istih biohemijskih karakteristika, ali različite tkivne i ćelijske lokalizacije. Izoforma GC-1 je glavni oblik enzima u većini perifernih tkiva, dok su u mozgu oba izoenzima

podjednako zastupljena. Izoforma GC-2 verovatno ima važnu ulogu u interneuralnim komunikacijama (Friebe i Koesling, 2009; Koesling i sar., 2017). Funkcionalni enzim mora da sadrži obe subjedinice (α i β) i poseduje bazalnu ciklaznu aktivnost koja značajno raste (200-400 puta) nakon vezivanja NO (McDonald i Murad, 1995; Murad, 2006). Enzim sadrži hem kao prostetičnu grupu, koji je povezan sa β_1 subjedinicom preko histidina na poziciji 105 i predstavlja receptor za NO (Beuve i sar., 2019). Vezujući se za redukovano gvožđe u hemu, NO kida veze gvožđa i histidina čime se uklanja inhibicioni uticaj hema na katalitičku aktivnost enzima (Murad, 2006).

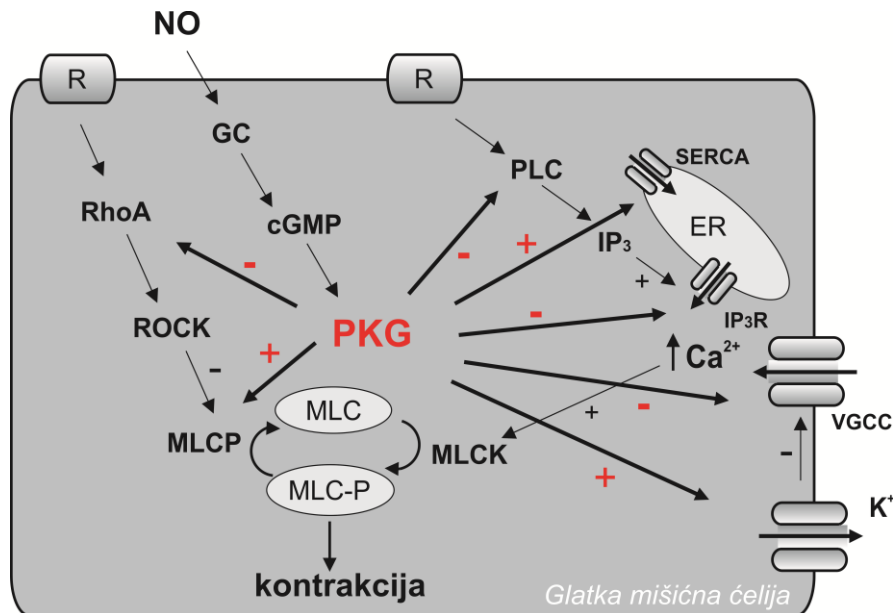
Supstanca 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) može da inhibira NO-senzitivnu GC u brojnim ćelijama i tkivima u organizmu i u širokoj je primeni kao inhibitor GC. Vezujući se na NO-kompetitivan način, ODQ dovodi do ireverzibilne inhibicije NO-stimulisane aktivnosti enzima (verovatno oksidujući gvožđe u hemu), dok bazalna, nestimulisana aktivnost ostaje nepromenjena (Koesling i sar., 2017). U istraživanjima, ODQ je neophodan u razdvajanju cGMP-zavisnih i cGMP-nezavisnih efekata NO.

Među ciljnim molekulima u ćeliji na koje deluje cGMP su PKG, cGMP-zavisni katjonski kanali i fosfodiesteraze (PDE). Tako, na primer, vezujući se za određene izoforme PDE, cGMP može regulisati razgradnju cAMP-a čime se stvara unakrsna veza između signalnih puteva cikličnih nukleotida. Osim toga, pokazano je da je aktivacija cGMP-zavisnih katjonskih kanala od značaja u funkcionisanju čula vida i mirisa. Ipak, primarno ciljno mesto cGMP-a i ključni enzim koji posreduje u vazodilataciji izazvanoj NO-om i egzogenim nitrovazodilatatorima, jeste PKG (E.C. 2.7.11.12). Ovaj enzim pripada familiji serin/treonin kinaza. U ćelijama sisara eksprimirana su dva tipa enzima: PKG1 koji ima dve izoforme (1α i 1β) i PKG2 (Hofman i sar., 2009). U kardiovaskularnom sistemu, efekti cGMP-a su prevashodno posredovani PKG1 izoenzimom koji se u visokim koncentracijama nalazi u svim tipovima glatkih mišićnih ćelija, uključujući vaskularne, i trombocitima, a u niskim koncentracijama detektovan je u vaskularnom endotelu i kardiomiocitima (Dou i sar., 2013; Hofman i sar., 2009). Enzim PKG1 je dimer sastavljen iz dva identična monomera koja poseduju regulatorni i katalitički domen. Monomeri zadržavaju glavne osobine dimera, uključujući vezivanje cGMP-a, ali dimerizacija povećava osetljivost kinaze ka cGMP-u, kao i afinitet ka ciljnim proteinima, što doprinosi većoj efikasnosti prenosa signala. Iako su oba izoenzima, 1α i 1β , uključena u vazorelaksaciju, PKG1 α pokazuje veći afinitet ka cGMP-u (Dou i sar., 2013). Nakon aktivacije, PKG1 vrši fosforilaciju brojnih ciljnih proteina za koje je pokazano da učestvuju u modulaciji koncentracije Ca^{2+} u ćeliji, mada mnoge studije naglašavaju da njihov pojedinačni doprinos može značajno varirati (Francis i sar., 2010). Pretpostavljeni mehanizmi smanjenja intraćelijske koncentracije Ca^{2+} dejstvom PKG1 uključuju (Slika 4):

- 1) Smanjenje IP_3 -izazvanog oslobađanja Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma fosforilacijom i aktivacijom IRAG (engl. *IP₃ receptor associated cGMP kinase substrat*), koji vrši inhibiciju IP_3 receptora (Ammendola i sar., 2001; Komalavilas i Lincoln, 1994);
- 2) Smanjenje stvaranja IP_3 i posledično smanjenje oslobađanja Ca^{2+} , verovatno kao rezultat fosforilacije G-proteinom aktivirane PLC β (Carvajal i sar., 2000; Xia i sar., 2001) ili fosforilacije i aktivacije RGS2 (engl. *regulator of G-protein signaling 2*) proteina koji inhibira Gq-posredovane vazokonstriktorne signale (Hofman i sar., 2009; Sun i sar., 2005);
- 3) Povećano preuzimanje Ca^{2+} u endoplazmatski retikulum povećanjem aktivnosti Ca^{2+} -ATP-aze (SERCA) usled fosforilacijom-izazvane disocijacije njenog inhibicionog regulatornog proteina fosfolambana iz veze sa SERCA-om (Cohen i sar., 1999; Cornwell i sar., 1991);
- 4) Smanjenje ulazak Ca^{2+} u ćeliju:
 - a. smanjenjem aktivnosti voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala L-tipa. Pored toga, pojedine studije sugerišu ulogu TRP (engl. *transient receptor potential*) kanala u vazorelaksaciji izazvanoj NO-om (Chen i sar., 2009; Keef i sar., 2001; Takahashi i sar., 2008, 2012; Tewari i Simard, 1997);

- b. otvaranjem K^+ kanala (prevažodno BK_{Ca} , ali postoje dokazi uloge i ostalih tipova, poput K_{ATP} i K_V kanala) što vodi hiperpolarizaciji plazma membrane i posledičnom smanjenju ulaska Ca^{2+} kroz L-tip Ca^{2+} kanala (Murphy i Brayden, 1995; Robertson i sar., 1993; Tanaka i sar., 2006; Zhao i sar., 1997).

Pretpostavljeni mehanizmi Ca^{2+} desenzitizacije uključeni u dejstvo NO/cGMP/PKG puta obuhvataju interakciju $PKG1\alpha$ sa regulatornom miozin-vezujućom subjedinicom MLCP (Surks i sar., 1999), kao i fosforilaciju i inaktivaciju RhoA (engl. *Ras homolog gene family member A*) (Bolz i sar., 2003; Sauzeau i sar., 2000) (Slika 4).



Slika 4. Mehanizmi protein kinaza G (PKG)-zavisne relaksacije vaskularne glatke mišićne ćelije (modifikovano prema Hofman 2009). cGMP, ciklični gvanozin-monofosfat; GC, gvanilat ciklaza; IP_3 , inozitol-1,4,5-trifosfat; MLC, laki lanci miozina; MLC-P, fosforilisani MLC; MLCK, MLC kinaza; MLCP, MLC fosfataza; NO, azot monoksid; PKG, cGMP-zavisna protein kinaza; PLC, fosfolipaza C; R, receptor; ROCK, RhoA (engl. *Ras homolog gene family member A*)-zavisna kinaza; SERCA, Ca^{2+} -ATP-aza sarko/endoplazmatskog retikuluma; ER, endoplazmatski retikulum; VGCC, voltažno-zavisni Ca^{2+} kanal.

cGMP-nezavisno dejstvo NO

Izvestan broj studija pokazao je da NO može uticati na ćelijske funkcije i nezavisno od aktivacije GC i porasta nivoa cGMP-a u ćeliji (Stamler i sar., 1992). Tako, na primer, pokazano je da NO (egzogeni ili endogeno stvoreni) u fiziološkim uslovima može da formira male količine peroksinitrita ($ONOO^-$) koji S-glutatiolacijom cisteinskih ostataka vrši aktivaciju SERCA (GSS-SERCA), čime dolazi do povećanog preuzimanja Ca^{2+} u sarkoplazmatski retikulum i relaksacije. Ipak, u uslovima oksidativnog stresa i ateroskleroze, ireverzibilna oksidacija ključnih tiolnih grupa onemogućava tiol-posredovanu aktivaciju SERCA dejstvom NO/ $ONOO^-$ (Adachi i sar., 2004).

Takođe, NO reakcijom sa cisteinskim reziduama formira S-nitrozilovane proteine čime može da modifikuje njihovu aktivnost. Ova reakcija je specifična, odnosno S-nitrozilaciji ne podležu svi proteini, kao ni svi cisteinski ostaci (Daaka, 2012). Kada je u pitanju regulacija vaskularnog tonusa, dokazano je da NO može S-nitrozilacijom uticati na ekspresiju i funkciju receptora vezanih za G-

proteine, kao što su β_2 adrenergički receptori (Whalen i sar., 2007) i angiotenzinski AT_1 receptori (Leclerc i sar., 2006). Dodatno, NO i nitrovazodilatatori mogu direktnom interakcijom da aktiviraju BK_{Ca} kanale u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, verovatno nitrozilacijom sulfhidrilnih grupa (Bolotina i sar., 1994; Bonaventura i sar., 2007; Mistry i Garland, 1998; Wu i sar., 2002).

Uloga K^+ kanala u vazorelaksaciji izazvanoj NO-om

Kao što je već navedeno, jedan od mehanizama kojim NO dovodi do relaksacije glatkih mišića krvnih sudova jeste aktivacija K^+ kanala. Postoji veliki broj dokaza kako iz elektrofizioloških studija, tako i iz studija na izolovanim krvnim sudovima, da je dejstvo NO i NO donora posredovano aktivacijom BK_{Ca} kanala (pogledati revijski rad Tykocki i sar. 2017). Pokazano je da blokada BK_{Ca} kanala inhibira relaksaciju različitih životinjskih krvnih sudova izazvanu endogenim ili egzogenim NO-om, a prvi dokaz dejstva na BK_{Ca} kanale humanih vaskularnih glatkih mišića dali su Bychkov i sar. (1998). Oni su pokazali da aktivacija BK_{Ca} kanala doprinosi vazorelaksantnom dejstvu organskih nitrata i NO na humanim koronarnim arterijama budući da je relaksacija bila značajno inhibirana specifičnim blokatorima, kao i da, na izolovanim miocitima koronarnih arterija, dovode do otvaranja ovih kanala i hiperpolarizacije (Bychkov i sar., 1998).

Modulacija aktivnosti BK_{Ca} kanala NO-om može biti posredovana PKG-om (PKG-zavisna), ili PKG-nezavisna. Kao rezultat aktivacije cGMP/PKG puta, može doći do fosforilacije kanala, modulacije iskri Ca^{2+} (engl. *Ca²⁺ sparks*) (Mandala i sar., 2007) ili promene transporta proteina kanala (stimulacija anterogradnog transporta β_1 subjedinice ka plazma membrani) (Leo i sar., 2014) i njegove posledične aktivacije. Pokazano je da PKG1 α direktno fosforiliše α subjedinicu humanih BK_{Ca} kanala (Alioua i sar., 1998), kao i da su mesta fosforilacije neophodna za aktivaciju kanala Ser⁸⁵⁵ i Ser⁸⁶⁹ (Nara i sar., 2000). Sa druge strane, Bolotina i sar. (1994) su prvi pokazali da NO može nezavisno od cGMP/PKG puta da aktivira BK_{Ca} kanale na izolovanim miocitima aorte zeca, kao i da blokator BK_{Ca} kanala inhibira cGMP-nezavisnu relaksaciju istog tkiva. Direktna modulacija BK_{Ca} kanala verovatno uključuje nitrozilaciju sulfhidrilnih grupa u proteinu kanala, a pokazano je i da je za dejstvo NO neophodno prisustvo β subjedinice (Bolotina i sar., 1994; Wu i sar., 2002). Direktno dejstvo NO pokazano je i na BK_{Ca} kanalima humanih krvnih sudova. Tako, na primer, aktivacija BK_{Ca} kanala na miocitima humane radijalne arterije NO-om dešava se na cGMP/PKG-nezavisan način (Zhang i sar., 2006), dok relaksacija humane umbilikalne arterije izazvana NO-om i NO donorom uključuje i cGMP-zavisnu i cGMP-nezavisnu aktivaciju BK_{Ca} kanala (Lovren i Triggle, 2000). Suprotno prethodno navedenim dokazima, u nekim eksperimentalnim sistemima nije pokazana značajna uloga BK_{Ca} kanala u efektima NO (Tykocki i sar. 2017). Činjenica je da je detektovan veliki broj izoformi BK_{Ca} kanala sa promenljivom osetljivošću na Ca^{2+} , tako da neujednačenost pokazanih efekata NO na BK_{Ca} u različitim tkivima može biti, između ostalog, posledica razlike u tkivnoj distribuciji α i β subjedinica i njihovog različitog povezivanja.

Prve sugestije o modulaciji K_{ATP} kanala dejstvom NO i NO donora, koja se dešava na cGMP-zavisan način, proistekli su iz radova Kubo i sar. (1994) na kulturi miocita aorte pacova i Miyoshi i sar. (1994) na kulturi miocita koronarnih arterija svinje. Kasnije je isto pokazano i na miocitima drugih krvnih sudova, kao i na nivou K_{ATP} kanala drugih, nevaskularnih tkiva. Osim toga, nekoliko studija rađenih na izolovanim krvnim sudovima pokazalo je da je vazodilatacija izazvana NO-om posredovana K_{ATP} kanalima (Armstead, 1996; Hein i sar., 2006). Što se tiče K_V kanala, iako su neke ranije studije sugerisale njihov značaj u endotel-zavisnoj vazodilataciji i dejstvu endotelnih medijatora, kasnije su se pojavile studije koje su izrazile sumnju u ispravnost tih zaključaka (Tykocki i sar., 2017). Ipak, uloga 4-aminopiridin-senzitivnih K_V kanala u vazodilataciji uzrokovanoj NO donorom ili analogom cGMP-a pokazana je na bazilarnim arterijama pacova (Sobey i Faraci, 1999), kao i uloga K_V1 podtipa kanala u NO-posredovanoj koronarnoj vazodilataciji kod pasa (Dick i sar., 2008). Skorije studije ukazuju na

značaj K_{V7} podtipa u NO/cGMP posredovanim efektima. Tako je pokazano da blokator K_{V7} kanala umanjuje relaksantni odgovor aorte pacova (Stott i sar., 2015) i plućnih arterija na NO donor i/ili GC stimulator (Mondejar-Parreno i sar., 2019).

H₂S I VASKULARNI TONUS

Prvi dokaz da H₂S može biti endogeno sintetisan u vaskularnom tkivu proistekao je iz rada Hosoki i sar. (1997) koji je pokazao prisustvo CSE u portnoj veni i aorti pacova, kao i da homogenat ovih preparata može stvoriti H₂S iz L-arginina. Dodatno, egzogena primena donora H₂S uzrokovala je relaksaciju oba krvna suda, ali i pojačala relaksantno dejstvo NO (Hosoki, 1997). Nakon toga, usledilo je intenzivno interesovanje i brojne *in vitro* studije na kulturama ćelija i tkiva, *ex vivo* na izolovanim krvnim sudovima i *in vivo* studije na animalnim modelima i ljudima sa ciljem ispitivanja uloge H₂S u fiziološkim i patofiziološkim procesima i mehanizama koji leže u osnovi njegovog dejstva.

Direktni efekat H₂S na vaskularni tonus, ispitivan u mnogobrojnim studijama na izolovanim, pre svega, životinjskim i malobrojnim humanim krvnim sudovima, pokazao je dominantan vazorelaksantni efekat H₂S, nasuprot malog broja objavljenih rezultata sa njegovim vazokonstriktornim dejstvom (Ali i sar. 2006; Webb i sar., 2008). Ipak, H₂S nema jedinstveni receptor ili put kojim deluje, već je pokazano da može da utiče na brojne ćelijske efektore, kao i da primarni mehanizam dejstva zavisi od tipa ćelije, tkiva ili korišćene eksperimentalne vrste (Szabo i Papapetropoulos, 2017). Pretpostavljeni mehanizmi vazorelaksantnog efekta H₂S uključuju primarno interakciju sa jonskim kanalima (za K⁺ i Ca²⁺), ali i regulaciju aktivnosti enzima, pre svega NO/cGMP puta.

Uloga K⁺ kanala u vazorelaksaciji izazvanoj H₂S-om

Prvi opisani ciljni molekul preko koga H₂S dovodi do vazorelaksacije bio je K_{ATP} kanal. Zhao i sar. (2001) su prvi pokazali da glibenklamid, specifični blokator K_{ATP} kanala, inhibira vazorelaksantni i hipotenzivni efekat H₂S, kao i njime izazvano povećanje protoka kroz K_{ATP} kanale na izolovanim glatkim mišićnim ćelijama aorte pacova. Uloga ovog podtipa K⁺ kanala u efektu H₂S, nakon aorte pacova, potvrđena je i na drugim krvnim sudovima (Al-Magableh i Hart, 2011; Cheng i sar., 2004; Mustafa i sar., 2011; Webb i sar., 2008). Potencijalni mehanizam kojim H₂S deluje na K_{ATP} kanal uključuje modifikaciju cisteinskih ostataka u subjedinicama kanala. Jiang i sar. (2010) su pokazali da H₂S aktivira K_{ATP} kanal interakcijom sa Cys⁶ i Cys²⁶ ekstraćelijskog dela SUR1 subjedinice, dok je u studiji Mustafe i sar. (2011) sulfhidracija Cys⁴³ u K_{ir}6.1 subjedinici vodila smanjenju vezivanja ATP-a, a povećanju vezivanja fosfatidilinozitol (4,5)-bifosfata (PIP2) što je rezultovalo aktivacijom kanala. Pored toga, pokazano je da H₂S može povećati ekspresiju proteina K_{ATP} kanala (Sun i sar., 2015).

Osim K_{ATP} kanala, postoje rezultati koji ukazuju da i drugi podtipovi K⁺ kanala posreduju u vazodilataciji koju izaziva H₂S. Čini se da efekat H₂S na BK_{Ca} kanale pokazuje tkivnu specifičnost. Ispitivanja na različitim ćelijskim kulturama pokazala su, s jedne strane, da H₂S dozno-zavisno povećava aktivnost BK_{Ca} i da je taj efekat verovatno povezan sa redukcijom sulfhidrilnih grupa proteina kanala (Sitdikova i sar., 2009), ali i potpuno suprotno, inhibiciju BK_{Ca} kanala (Telezhkin i sar., 2009). Na nivou krvnih sudova, sugerisano je da BK_{Ca} kanali posreduju u hiperpolarizaciji i vazodilataciji mezenteričnih i cerebralnih arterija izazvanih H₂S-om. Ipak, na nivou cerebralnih arterija ovaj efekat je pre indirektna posledica stimulacije lokalnih intracelularnih Ca²⁺ signala iz endoplazmatskog retikuluma, zvanih iskre Ca²⁺ ("Ca²⁺ sparks"), što vodi aktivaciji BK_{Ca} kanala na ćelijskoj membrani, nego direktne interakcije H₂S sa kanalom (Jackson-Weaver i sar., 2011; Liang i sar., 2012).

Potencijalno mesto dejstva H₂S predstavljaju i SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali. Kombinacija karibdotoksina i apamina, specifičnih blokatora ovih kanala, inhibira vazorelaksaciju mezenteričnih arterija pacova i miševa, kao i hiperpolarizaciju endotelnih ćelija izazvanu H₂S-om (Cheng i sar., 2004; Mustafa i sar., 2011). Pokazano je da H₂S vrši sulfhidraciju IK_{Ca} što doprinosi hiperpolarizaciji (Mustafa i sar., 2011). Zbog sposobnosti H₂S da izazove hiperpolarizaciju endotelnih i glatkih mišićnih ćelija, aktivira IK_{Ca} i SK_{Ca} kanale, kao i njegove veće potentnosti u izazivanju relaksacije arteriola u odnosu na sprovodne arterije, pretpostavljeno je da on može biti endotel-zavisni hiperpolarišući faktor (Mustafa i sar., 2011; Tang i sar., 2013).

Nekoliko istraživačkih grupa je pokazalo značaj aktivacije K_V kanala u vazorelaksaciji izazvanoj H₂S-om: 4-aminopiridin-senzitivnih (Cheang i sar., 2010) i K_V7 podtipa (Hedegaard i sar., 2014, 2016; Martelli i sar., 2013), a sugerisana je i mogućnost da je H₂S jedan od vazorelaksantnih faktora iz perivaskularnog adipoznog tkiva koji deluje delimično preko KCNQ tipa K_V kanala.

Regulacija NO/cGMP puta dejstvom H₂S

Poslednjih godina sve je više dokaza da NO i H₂S ne samo da imaju slične biološke uloge u kardiovaskularnom sistemu, već i da postoji kooperacija ova dva signalna puta. Danas se H₂S sve više posmatra kao pojačivač vaskularnog NO/cGMP puta bez koga eNOS ne bi mogao da funkcioniše u punom kapacitetu (Szabo, 2017). Takođe, kardiovaskularni efekti H₂S često zahtevaju očuvanost NO/cGMP puta, tako da efekti mogu biti delimično (kada je u pitanju vazodilatacija) ili velikim delom (u slučaju angiogeneze) umanjeni u nedostatku NO (Coletta i sar., 2012). Postoji više nivoa NO/cGMP puta na kojima je pokazano da H₂S može ispoljiti svoje delovanje (revijski pregled u Szabo, 2017).

- Na nivou biohemijskih interakcija, H₂S i NO (i njihovi metaboliti) mogu reagovati dajući biološki aktivne S/N hibridne molekule. Ipak, njihova tačna uloga u fiziološkim i patofiziološkim procesima još uvek ostaje da se potvrdi i predstavlja posebnu oblast ispitivanja. Takođe, pokazano je da H₂S može stimulisati oslobađanje NO iz ćelijskih „depoa“, kao što su nitriti, peroksinitriti i nitrozotoli (Szabo, 2017).
- **eNOS.** H₂S može stimulisati eNOS dejstvom na mehanizme koji regulišu aktivnost ovog enzima: povećanjem nivoa intraćelijskog Ca²⁺ (Bauer i sar., 2010), stimulacijom Akt-zavisne fosforilacije eNOS (Coletta i sar., 2012, Dimmeler i sar., 1999) ili direktnom sulfhidracijom cisteinskih ostataka (Cys⁴⁴³) čime se enzim održava u dimernom stanju i stimuliše sinteza NO (Altaany i sar., 2014). U određenim eksperimentalnim sistemima, stimulacija ekspresije informacione RNK za eNOS dešava se dejstvom H₂S, ali u fiziološkim uslovima verovatno H₂S nije neophodan činilac ekspresije ovog enzima (King i sar., 2014; Meng i sar., 2013).
- **GC.** Pokazano je da H₂S može redukcijom gvožđa u hemu NO-zavisne GC da održava enzim u aktivnom obliku koji reaguje sa NO (suprotno dejstvo od ODQ – inhibitora GC). Značaj ovog dejstva je verovatno najveći u stanjima oksidativnog stresa jer u odsustvu oksidativnih stimulusa nije pokazan uticaj H₂S na aktivnost NO-zavisne GC (Coletta i sar., 2012; Szabo, 2017).
- **cGMP.** H₂S može da nagradi 8-SH-cGMP, koji je u odnosu na „obični“ cGMP otporniji na dejstvo cGMP-specifične PDE5 uz istovremeno zadržanu mogućnost aktivacije PKG (Nishida i sar., 2012, 2014).
- **PDE.** Inhibicijom PDE5 (H₂S može da deluje i na druge izoforme, ali ima najpotentnije dejstvo na PDE5), H₂S povećava nivo intraćelijskog cGMP-a i tako pojačava vaskularne efekte NO (Bucci i sar., 2010, Coletta i sar., 2012).
- **PKG.** Polisulfidi koji iz H₂S nastaju u ćeliji, mogu direktno da aktiviraju PKG1α katališući stvaranje intramolekulske disulfidne veze (Szabo, 2017).

Ostali potencijalni mehanizmi vazorelaksantnog delovanja H₂S

Među ostalim putevima uključenim u vazodilataciju izazvanu H₂S-om jeste stimulacija ciklooksigenaze čiji je značaj pokazan u humanoj mikrocirkulaciji i humanoj mezenteričnoj arteriji (Kutz i sar., 2015; Materazzi i sar., 2017). Takođe, uloga inhibicije voltažno-zavisnih Ca²⁺ kanala L-tipa pokazana je u vazorelaksaciji izazvanoj H₂S-om na nivou cerebralnih arterija (Tian i sar., 2012), ali i u dejstvu H₂S na kardiomiocite (Sun i sar., 2008). Ipak, iako H₂S smanjuje funkcionalno slobodne sulfhidrilne grupe u Ca²⁺ kanalu L-tipa, što je indirektan dokaz sulfhidracije kanala, direktnih dokaza da se ovaj proces dešava još uvek nema (Zhang i sar., 2012). Nakon dokaza o regulaciji neuralne i sinaptičke aktivnosti posredstvom TRP kanala, nekoliko studija je pokazalo da H₂S može aktivirati TRPA1 kanale na senzornim neuronima dovodeći do oslobađanja neurotransmitera (engl. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP) i posledične vazodilatacije mezenteričnih arterija (Eberhardt i sar., 2014; White i sar., 2013; Yu i sar., 2018). U jednoj od studija, naglašeno je i kooperativno dejstvo NO i H₂S u aktivaciji ovih kanala (Eberhardt i sar., 2014). Takođe, Naik i sar. (2016) su pokazali da vazodilatacija mezenteričnih arterija izazvana H₂S-om uključuje aktivaciju TRPV4-zavisnog ulaska Ca²⁺ u endotelne ćelije i aktivaciju endotelnih K_{Ca} kanala, kao i da dolazi do pojačane sulfhidracije TRPV4 kanala nakon dejstva H₂S. Otvaranje endotelnih K_{Ca} kanala i endotelna hiperpolarizacija vode endotel-zavisnoj hiperpolarizaciji glatkih mišićnih ćelija i vazorelaksaciji.

Dodatni pretpostavljeni mehanizmi vazorelaksacije uključuju interakciju sa citohrom C oksidazom i metaboličku inhibiciju ćelije, kao i smanjenje intraćelijskog pH (Kiss i sar., 2008; Lee i sar., 2007). Tako, na primer, pokazano je da H₂S dozno-zavisno snižava intraćelijski pH, aktivacijom Cl⁻/HCO₃⁻ transportera, što baram delimično doprinosi vazorelaksaciji (Lee i sar., 2007). U prilog tome govore i rezultati da su vaskularni K_{ATP} kanali pH-senzitivni i da ih acidifikacija aktivira (Kiss i sar., 2008; Wang i sar., 2003). Takođe, sugerisano je da kao rezultat inhibicije citohrom C oksidaze, terminalnog enzima u respiratornom lancu mitohondrija, H₂S dovodi do pada intraćelijske koncentracije ATP-a i, samim tim, aktivacije K_{ATP} kanala (Cooper i Brown, 2008). Međutim, H₂S otvara K_{ATP} i pri povećanoj koncentraciji ATP-a i dovodi do vazorelaksacije nezavisno od pada intraćelijskog nivoa ATP-a (Koenitzer i sar., 2007). Treba naglasiti da fiziološki značaj nekih od mehanizama preko kojih deluje H₂S ostaje i dalje nepoznat, kao i da zastupljenost i uloga pojedinih mehanizama pokazuje velike razlike među eksperimentalnim vrstama.

ULOGA GASOTRASMITERA U KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA

NO I KARDIOVASKULARNE BOLESTI

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti širom sveta, uzrokujući preko 17 miliona smrtnih ishoda godišnje (WHO, 2017). Smanjena bioraspodivnost NO predstavlja zajedničku karakteristiku vaskularnih bolesti i smatra se osnovnim obeležjem endotelne disfunkcije. Definisani su brojni faktori koji potencijalno mogu uticati kako na sintezu, tako i na razgradnju NO i njegovu mogućnost da difunduje do ciljnih molekula. Kao rezultat, dolazi do poremećaja regulacije ključnih ćelijskih procesa i funkcija, kao što su vazodilatacija, agregacija trombocita, apoptoza, proliferacija glatkih mišićnih ćelija, i razvoja kako hipertenzije, tako i ateroskleroze i aterosklerotskih vaskularnih bolesti (Li i sar., 2015; Naseem, 2005).

Dokaz značajne uloge NO u regulaciji krvnog pritiska proistekao je iz brojnih studija koje su povezale disfunkciju NO sistema sa patogenezom hipertenzije. Ispitivanja pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom pokazalo je smanjenu NO-posredovanu vazorelaksaciju arterija u odgovoru na endotel-zavisni vazodilatator, acetilholin, dok je istovremeno odgovor na endotel-nezavisni dilatator, kakav je natrijum-nitroprusid, bio očuvan (Higashi i sar., 1999; Panza i sar., 1993, 1990; Treasure i sar., 1993).

To je ukazalo na smanjenu biološku raspoloživost NO usled smanjene sinteze i/ili povećane razgradnje, uz funkcionalnost cGMP signalnog puta u glatkoj mišićnoj ćeliji. Aktivnost NO puta može biti kompromitovana faktorima kao što su: poremećaj ekspresije/aktivnosti eNOS (Chou i sar., 1998), deficijencija supstrata L-arginina (Lee i sar., 2003; Moss i sar., 2004), ili kofaktora BH₄ (Landmesser i sar., 2003), razdvajanje dimera eNOS na monomere, povećana koncentracija endogenog eNOS inhibitora (asimetrični dimetil arginin, ADMA), ili reakcija NO sa slobodnim kiseoničnim radikalima (Moncada i sar. 1986; Rubanyi i Vanhoutte, 1986). Tako, na primer, razdvajanje eNOS dimera pokazano je kod hipertenzivnih pacijenata sa prisutnom endotelnom disfunkcijom, dijabetes melitusom ili hiperholesterolemijom, kao i kod pacijenata lečenih nitroglicerinom i kod hroničnih pušača (Zhao i sar., 2015).

Poremećaj endotel-zavisne relaksacije pokazan je i kod pacijenata sa aterosklerozom koronarnih arterija. Smanjena bioraspoloživost NO verovatno se razvija rano u procesu aterogeneze, s obzirom da je pokazano da pacijenti sa hiperholesterolemijom, i pre razvoja angiografijom-potvrđene ateroskleroze, imaju smanjen vazorelaksantni odgovor na acetilholin (Förstermann i sar., 1988). Činjenica da je smanjenje endotel-zavisne vazodilatacije pokazano i kod pacijenata sa prehipertenzijom (Weil i sar., 2011), ukazuje na značaj disfunkcije NO sistema u razvoju ovih bolesti.

Dodatni dokazi proističu i iz skorašnje kohortne studije sprovedene na populaciji od preko 380.000 osoba evropskog porekla. U ovoj studiji pokazana je povezanost genetske predispozicije ka pojačanoj aktivnosti NO signalnog puta (povećana ekspresija gena za eNOS i solubilnu GC) sa nižim krvnim pritiskom i smanjenjem rizika od razvoja ishemijske bolesti srca, periferne arterijske bolesti i moždanog udara. Takođe, retke mutacije ovih gena sa gubitkom funkcije bile su povezane sa povećanjem krvnog pritiska i povećanim rizikom od ishemijske bolesti srca (Emdin i sar., 2018).

Otkriće da u hipertenziji i aterosklerozi postoji poremećaj u stvaranju NO u endotelu krvnih sudova i/ili njegovoj bioraspoloživosti, dovelo je do razvoja lekova koji ciljano deluju na sistem NO (Zhao i sar., 2015). U ove lekove spadaju direktni i indirektni donori NO, kao i agensi koji povećavaju njegovu biološku raspoloživost (Mason i Cockcroft, 2006).

Donori NO

Organski nitrati, kao što su nitroglicerini (gliceril trinitrat) i izosorbid dinitrat, i neorganski nitro kompleksi, poput natrijum-nitroprusida, su vazorelaksantni lekovi koji su dugo godina bili u kliničkoj upotrebi pre nego što je otkriven njihov mehanizam dejstva. Zajednička osobina ovih nitrovazodilatatora jeste sposobnost da, pod odgovarajućim metaboličkim ili redoks uslovima, služe kao donori NO (McDonald i Murad, 1995). I danas, nitrovazodilatatori predstavljaju važne lekove u terapiji kardiovaskularnih bolesti. Nitroglicerini se uglavnom koriste u akutnom napadu angine pectoris, dok se lekovi koji sporije oslobađaju NO, kao izosorbid mononitrat, koriste u hroničnoj terapiji stabilne angine. Natrijum-nitroprusid se koristi za kratkotrajno i brzo sniženje krvnog pritiska u hipertenzivnim krizama. Ipak, produžena upotreba nitrovazodilatatora dovodi do tolerancije i razvoja tahifilaksije. Razvoj tolerancije zavisi od vrste nitrata i doznog režima primene (Cebová i sar., 2016).

Nikorandil

Nikorandil je vazodilatatorni lek registrovan za terapiju pacijenata sa stabilnom anginom pectoris koji su neadekvatno kontrolisani ili netolerantni na antiishemijske lekove prve linije (β blokatore ili blokatore Ca²⁺ kanala). Sintetisan je 1975. god. (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd, Japan) i razvijen kao koronarni vazodilatator. Prvi put je registrovan u Japanu 1984. god. (Sigmart®), od 1992. god. dostupan je u Francuskoj (Ikorel®), nakon čega je registrovan u većem broju zemalja Evrope i sveta (EMA, 2015; MHRA, 2010).

VAZORELAKSANTNO DELOVANJE NIKORANDILA

Nikorandil pripada grupi otvarača K^+ kanala, ali je jedinstven po svom dvostrukom mehanizmu dejstva: 1) oslobađa NO, poput nitrata, dovodeći do povećanja nivoa cGMP-a stimulacijom enzima GC i 2) otvara K_{ATP} kanale, čime dovodi do hiperpolarizacije ćelijske membrane i inhibicije ulaska Ca^{2+} u ćeliju (Gayet i sar., 2011; Horinaka, 2011; Perez-Vizcaíno i sar., 1998). Ipak, za razliku od nitrata, na njegov efekat se ne razvija tolerancija, upravo zbog dejstva na K^+ kanale (Gayet i sar., 2011). Poznato je da aktivacija K_{ATP} kanala na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama dovodi do vazodilatacije, kao i da njihova aktivacija u kardiomiocitima štiti miokard tokom ishemije, tako da je modulacija ovih kanala značajna u terapiji bolesti kao što je angina pectoris (Horinaka, 2011; Jackson, 2017; Kane i sar., 2005).

U prethodnim ispitivanjima vazodilatatornog efekta nikorandila, pokazano je da relativna zastupljenost njegova dva mehanizma dejstva, oslobađanja NO i aktivacije K_{ATP} kanala, zavisi od tipa ispitivanog krvnog suda i korišćenog eksperimentalnog protokola (Perez-Vizcaíno i sar., 1998). Sugerisano je da, osim K_{ATP} , i drugi podtipovi K^+ kanala, pre svega K_{Ca} kanali, mogu učestvovati u vazodilatatornom efektu nikorandila (Kajioka i sar., 1990; Zhou i sar., 1995). Osim toga, dualne osobine nikorandila otvaraju mogućnost da aktivacija GC i posledični porast cGMP-a, doprinose aktivaciji K^+ kanala pod dejstvom nikorandila. Kao što je već navedeno, vaskularne glatke mišićne ćelije na svojoj membrani eksprimiraju više različitih tipova K^+ kanala koji značajno doprinose regulaciji kontraktilnosti glatkih mišića i vaskularnog tonusa (Hu i Zhang, 2012; Jackson, 2017). K_V i K_{Ca} kanali su, pored K_{ATP} kanala, među podtipovima K^+ kanala koji učestvuju u regulaciji tonusa vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, kako u fiziološkim uslovima, tako i u određenim bolestima (Jackson, 2017). Dijabetes, gojaznost i hipertenzija mogu uticati na funkciju ovih K^+ kanala, dok je promenjena funkcija K_{Ca} kanala velike provodljivosti pokazana i u stanjima hipoksije, šoka, ishemijskoj bolesti srca, kao i kod starije populacije (Hu i Zhang, 2012; Jackson, 2017). S obzirom da tačan mehanizam dejstva nikorandila na izolovanim krvnim sudovima ljudi još uvek nije poznat, ispitivanje vazodilatatornog efekta nikorandila na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka, kao i mehanizama koji stoje u osnovi ovog dejstva, posebno uloge K^+ kanala, je veoma aktuelno.

H₂S I KARDIOVASKULARNE BOLESTI

Danas je sve veći broj studija koje pokazuju ne samo da H_2S učestvuje u regulaciji tonusa krvnih sudova, već i da njegova smanjena produkcija doprinosi vaskularnoj disfunkciji u različitim kardiovaskularnim bolestima. Smanjenje nivoa H_2S pokazano je, na primer, u plazmi pacijenata sa hipertenzijom (Sun i sar., 2007), dijabetesom (Jain i sar., 2010) i ishemijskom bolešću srca (Jiang i sar., 2005), u odnosu na zdrave osobe. Takođe, među pacijentima sa ishemijskom bolešću srca, niži nivo H_2S u plazmi je zabeležen kod pacijenata sa okluzijom, u odnosu na one samo sa stenozom arterija (Jiang i sar., 2005). Slično je pokazano i kod pacijenata na hemodijalizi među kojima su oni sa uznapredovalom aterosklerozom imali niže nivoe H_2S u odnosu na pacijente sa manje izraženom vaskularnom bolešću (Wang i sar., 2015). S druge strane, kod dece sa vazovagalnom (neurokardiogenom) sinkopom pokazan je značajno viši nivo H_2S u plazmi u odnosu na kontrolnu grupu dece (Zhang i sar., 2012).

U ispitivanjima na životinjama zabeležena je manja koncentracija H_2S u plazmi spontano hipertenzivnih pacova, kao i smanjena ekspresija i aktivnost CSE enzima, dok je egzogena primena H_2S ublažila ove efekte (Yan i sar., 2004). Pokazano je i da CSE nokaut miševi razvijaju hipertenziju i poremećaj endotel-zavisne relaksacije krvnih sudova, kao i da nadoknada H_2S snižava krvni pritisak i kod homozigota (CSE^{-/-}) i kod heterozigota (CSE^{+/-}) (Yang i sar., 2008). Takođe, ishrana bogata

mastima kod CSE nokaut miševa dovela je do ubrzanog formiranja masnih naslaga, povećanja nivoa holesterola i homocisteina u plazmi, pojačanog oksidativnog stresa i ekspresije adhezivnih molekula i proliferacije intime, dok je primena egzogenog H_2S inhibirala ubrzan razvoj ateroskleroze u ovom modelu (Mani i sar., 2013).

Osim toga, polimorfizam gena koji kodiraju enzime uključene u sintezu H_2S povezan je sa različitim patofiziološkim stanjima ljudi. Polimorfizam može potencijalno uticati na enzimsku aktivnost ovih proteina i samim tim, na nivo H_2S u tkivu. Na primer, procenjuje se da postoji oko 150 mutacija CBS lokusa od kojih oko 20 vodi promenjenoj enzimskoj aktivnosti. Posledica toga je najčešće homocisteinurija, ali su određene varijante povezane sa ranom ishemijskom bolešću srca, esencijalnom hipertenzijom i povećanim rizikom od moždanog udara. Takođe, polimorfizam CSE gena opisan je kod pacijenata sa povećanim nivoom homocisteina u plazmi, cistationiurijom, ali se povezuje i sa preeklampsijom i razvojem hronične hipertenzije (Rose i sar., 2017).

Donori H_2S

Fokus aktuelnih ispitivanja je potencijalna terapijska primena donora H_2S u cilju korekcije stanja sa njegovom deficijencijom, kao i mehanizmi njihovih terapijskih efekata (Szabo i Papapetropoulos, 2017). Dokazi o ulozi H_2S u fiziološkim i patofiziološkim stanjima ukazuju da farmakološke intervencije u cilju povećanja nivoa H_2S korišćenjem različitih donora može biti značajna terapijska opcija u prevenciji i terapiji stanja kao što su hipertenzija i ateroskleroza. Ipak, za razvoj efikasnog terapijskog sredstva potrebna su sveobuhvatna istraživanja i upoznavanje kako efekata H_2S , tako i mehanizama koji leže u njihovoj osnovi, što pomaže u identifikaciji tkiva na koje možemo uticati i patoloških stanja koja najbolje reaguju na terapiju H_2S -om. Ispitivanje odnosa i interakcija H_2S sa drugim gasovitim transmitterima, posebno sa NO-om, može poboljšati translaciju rezultata u kliničke okvire. Terapija H_2S donorima u kombinaciji sa NO donorima može pojačati pozitivne ishode i kardiovaskularni odgovor organizma (Polhemus i Lefer, 2014).

Tokom poslednjih decenija, veći broj pristupa je korišćen za terapijsko ispitivanje H_2S , uključujući inhalaciju H_2S kao gasa, primenu takozvanih „brzih“ donora (soli H_2S) ili „sporih donora“ (čiji je prototip GYY4137 (morfolin-4-ium 4 metoksifenil fosfinoditioat)). Skorašnji radovi ukazuju i na donore kod kojih oslobađanje H_2S može biti regulisano, na primer, oksidacijom, promenom pH, esterazama i slično, a jedan od pristupa podrazumeva i da se već postojećim lekovima (na primer, nesteroidnim antiinflamatornim lekovima) dodaju grupe koje doniraju H_2S .

Natrijum-hidrogensulfid

Natrijum-hidrogensulfid ($NaHS$) je neorganska so, koja je, zajedno sa natrijum-sulfidom (Na_2S) i kalcijum-sulfidom (CaS), egzogeni donor H_2S . Ove soli u rastvoru disosuju dovodeći do brzog porasta koncentracije H_2S na pH-zavisan način, pa se nazivaju „brzim“ donorima. Pri fiziološkom pH 7,4 oko 85% sulfida iz soli nalazi se u obliku hidrogensulfidnog anjona (HS^-), a ostalih 15% kao rastvoreni gas, dok je koncentracija sulfidnog anjona (S^{2-}) zanemarljiva (Szabo i Papapetropoulos, 2017).

VAZORELAKSANTNO DELOVANJE NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA

Upotreba neorganskih soli, natrijum-hidrogensulfida i natrijum-sulfida, predstavlja do sada najčešće korišćen način produkcije H_2S u farmakološkim i biološkim eksperimentima (Szabo i Papapetropoulos, 2017). Pretragom PubMed indeksne baze korišćenjem termina „ $NaHS$ “ dobija se preko 1500 publikacija, a korišćenjem „ $NaHS$ ili Na_2S “ preko 2400 publikacija, koje koriste samo ove soli (ili u ređim slučajevima u kombinaciji sa drugim donorima). S tim u vezi, većina podataka o

biološkim i farmakološkim efektima H₂S dobijena je korišćenjem ovih soli, uključujući i prethodno opisano vazorelaksantno delovanje i mehanizme koji leže u njegovoj osnovi.

Zbog veoma malog broja eksperimentalnih rezultata dobijenih na ljudima ili na humanim krvnim sudovima, doprinos razumevanju vazorelaksantnog efekata donora H₂S, natrijum-hidrogensulfida, na nivou izolovanih krvnih sudova čoveka, kao i rasvetljavanje mehanizama njegovog dejstva, sa posebnim osvrtom na ulogu različitih K⁺ kanala, može biti veoma značajno.

HUMANI BAJPAS GRAFTOVI KAO MODEL ZA ISPITIVANJE VAZORELAKSANTNOG DELOVANJA DONORA NO I H₂S

U cilju kliničke primene dobijenih rezultata, za istraživanja su odabrani izolovana unutrašnja torakalna arterija i vena safena čoveka koje se koriste kao graftovi u aortokoronarnoj bajpas operaciji, standardnoj revaskularizacionoj tehnici za lečenje koronarne arterijske bolesti. Unutrašnja torakalna arterija je najčešće korišćen arterijski graft zbog svoje superiorne dugoročne prohodnosti (oko 90% 10 godina nakon bajpas operacije) i povećanja dugoročnog preživljavanja pacijenata (Kobayashi, 2009; Lytle i sar., 2004). Uprkos dokazanim prednostima primene arterijskih graftova, vena safena se još uvek upotrebljava kod velikog broja pacijenata (Biancari i Tiozzo, 2010). Prednosti venskog grafta su laka dostupnost i adekvatna dužina, ali pokazuje lošiju dugoročnu prohodnost (50-60% 10 godina nakon bajpas operacije) (Kobayashi, 2009).

Spazam graftova, koji se može javiti tokom i nakon bajpas operacija i izazvati ozbiljne ishemijske probleme, još uvek predstavlja značajan klinički problem (Hou i sar., 2016). Tačan mehanizam razvoja spazma nije u potpunosti poznat. Veruje se da je vazospazam odgovor krvnog suda na brojne stimuluse koji mogu biti fizičke ili farmakološke prirode (tj. cirkulišući vazokonstriktori) (He i sar., 1995). Danas se u cilju prevencije i reverzije spazma bajpas graftova koriste različiti farmakološki vazodilatatori, ali treba naglasiti da, upravo zbog kompleksnih mehanizama koji leže u osnovi spazma, ne postoji agens koji bi bio optimalan u svakoj situaciji. Prevencija i terapija spazma bajpas graftova i dalje predstavljaju izazov, pa se kontinuirano traga za najboljom metodom za prevazilaženje spazma i ispituje antispastički efekat različitih vazodilatatornih supstanci (Bai i sar., 2010; Gao i sar., 2013; Hou i sar., 2016).

U ovoj studiji su korišćeni segmenti arterija i vena pacijenata sa ishemijskom bolešću srca koji imaju prisutne brojne kardiovaskularne faktore rizika. Varijabilan stepen ateroskleroze ili promena endotelne funkcije koje prethode aterosklerozi (Vita i sar., 1990) verovatno su reflektovani u našim rezultatima. Ipak, ovi nalazi dobijeni na krvnim sudovima pacijenata sa manifestnom vaskularnom bolešću, u odnosu na krvne sudove zdravih osoba, mogu imati poseban klinički značaj. Dodatno, s obzirom da endotel bajpas graftova može biti oštećen hirurškom traumom, istezanjem, produženom *ex vivo* prezervacijom ili uslovima čuvanja (Thatte i Khuri, 2001), od značaja je bilo ispitati efekte vazodilatatornih supstanci kako na graftovima sa očuvanim endotelom, tako i bez endotela.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Budući da su preliminarni rezultati pokazali da nikorandil, kao donor NO, i natrijum-hidrogensulfid, kao donor H₂S, deluju vazodilatatorno na izolovanu unutrašnju torakalnu arteriju i venu safenu čoveka, cilj istraživanja bio je da se ispituju mehanizmi njihovog vazodilatatornog delovanja posredstvom aktivacije različitih tipova K⁺ kanala.

Da bi se ostvario glavni cilj, definisano je nekoliko podciljeva:

1. Da se ispita da li ovi donori NO, odnosno H₂S, deluju direktno na glatke mišićne ćelije unutrašnje torakalne arterije i vene safene i/ili indirektno, delujući na endotel ovih krvnih sudova;
2. Da se definišu tipovi K⁺ kanala posredstvom kojih deluju vazodilatatorno donori NO, odnosno H₂S, kao i da se ispita da li ovi gasoviti medijatori deluju vazodilatatorno posredstvom istih tipova K⁺ kanala na izolovanu unutrašnju torakalnu arteriju i venu safenu;
3. Da se ispita da li donori NO i H₂S deluju direktno na K⁺ kanale i/ili indirektno, aktivišući signalni put cGMP-a;
4. Da se na unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni ispita da li postoji interakcija između NO i H₂S.

MATERIJAL I METODE

U okviru ovog istraživanja eksperimenti su vršeni na izolovanim krvnim sudovima ljudi, unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni, koji su uzimani od pacijenata u toku bajpas operacije na Institutu za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“. Neiskorišćeni segmenti unutrašnje torakalne arterije i vene safene su odmah nakon isecanja ostavljani u posudu sa hladnim (4°C) Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom, transportovani u laboratoriju i korišćeni za eksperimente u okviru naredna 24 sata.

Tokom celog istraživanja upotrebljeno je 188 arterijskih i 176 venskih segmenata uzetih od 280 pacijenata. Korišćeni su samo segmenti bez makroskopski vidljivih aterosklerotskih promena. Saglasnost za upotrebu neiskorišćenih segmenata humanih arterijskih i venskih bajpas graftova dobijena je od Etičkog Odbora Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“, Odlukom br. 1990 (26.04.2018. god.).

PRIPREMA TKIVA

U laboratoriji su dobijeni segmenti krvnih sudova, nakon uklanjanja masnog i vezivnog tkiva, pažljivo isecani na prstenove širine oko 3 mm. Od svakog segmenta je bilo moguće dobiti od jednog do četiri prstena. Endotel nekih prstenova je mehanički uklanjan nežnim prevlačenjem unutrašnje površine žicom od nerđajućeg čelika. Prstenovi krvnih sudova su zatim postavljeni u kupatilo za izolovane organe zapremine 10 ml, ispunjeno Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom temperature 37°C koji je kontinuirano oksigenisan smešom 95% O₂ i 5% CO₂. Postupak postavljanja podrazumevao je provlačenje dva držača trouglastog oblika od nerđajućeg čelika kroz lumen prstenova, nakon čega se prstenovi uranjaju u kupatilo za izolovane organe, donji držač fiksira za stakleni nosač, a gornji veže za transdjuser (Elunit, Srbija). Pomeranjem gornjeg držača mikrometarskim zavrtnjem vršeno je podešavanje rastojanja između dva držača, odnosno opterećenje preparata. Izometrijska tenzija preparata registrovana je preko transdjusera na monitoru kompjutera pomoću Isolab softvera. Pre početka eksperimenata preparati su ekvilibrisani 60-75 min. uz ispiranje svežim Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom svakih 10 min., a zatim postepeno istezani do optimalne tačke zatezanja (2 g) (Schoeffter i sar., 1988; Zhao i Tackett, 1998).

EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Eksperimenti su vršeni na izolovanim krvnim sudovima sa i bez endotela. Nakon perioda ekvibracije, prstenovi krvnih sudova su kontrahovani fenilefrinom (10 μM), agonistom α₁ receptora, a kada je kontrakcija dostigla stabilan plato (oko 10-15 min.), u vodeno kupatilo je dodavan acetilholin (1 μM) u cilju ispitivanja prisustva endotela. Endotel se smatrao očuvanim ukoliko je dodatak acetilholina izazvao brzu relaksaciju ispitivanog krvnog suda, dok je izostanak relaksacije arterijskih i venskih prstenova ukazivao na odsustvo endotela. Preparat je zatim ispiran u narednih sat vremena svežim Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom, a onda ponovo kontrahovan fenilefrinom. Kada je ova fenilefrinska kontrakcija dostigla svoj plato, kumulativno su dodavane rastuće koncentracije nikorandila (0,001-300 μM) ili natrijum-hidrogensulfida (1 μM–3 mM) i konstruisane su koncentracijski-zavisne krive relaksacije. Svaka naredna koncentracija ispitivane supstance (nikorandila, natrijum-hidrogensulfida) dodavana je tek nakon što je relaksacija izazvana prethodnom koncentracijom dostigla svoj plato ili nakon 20 min. ukoliko nije bilo relaksacije.

U posebnim serijama eksperimenata su, nakon konstrukcije prve kumulativne koncentracijski-zavisne krive relaksacije i ispiranja preparata narednih sat vremena, u vodeno kupatilo dodavani različiti blokatori/inhibitori (Tabela 2) ili njihove kombinacije u cilju ispitivanja uloge različitih K⁺ kanala i komponenti cGMP signalnog puta u mehanizmu dejstva nikorandila i natrijum-hidrogensulfida.

Dvadeset minuta nakon dodavanja blokatora/inhibitora, krvni sudovi su ponovo kontrahovani fenilefrinom, a nakon postizanja stabilne kontrakcije, konstruisana je druga koncentracijski-zavisna kriva relaksacije ispitivane supstance (sada u prisustvu specifičnog blokatora/inhibitora ili njihove kombinacije). Kontrolni eksperimenti rađeni su bez dodavanja specifičnih blokatora/inhibitora.

Tabela 2. Blokatori/inhibitori korišćeni u eksperimentima u cilju definisanja uloge različitih K^+ kanala i komponenti cGMP signalnog puta u mehanizmu vazodilatatornog dejstva nikorandila, donora NO, i natrijum-hidrogensulfida, donora H_2S .

Blokator/inhibitor	Dejstvo	Koncentracija
<i>glibenklamid</i>	selektivni blokator K_{ATP} kanala	10 μ M
<i>4-aminopiridin</i>	neselektivni blokator K_V kanala	0,5 mM
<i>margatoksin</i>	selektivni blokator $K_V1.3$ kanala	10 nM
<i>tetraetilamonijum</i>	neselektivni blokator K_{Ca} kanala	1 mM
<i>iberiotoksin</i>	selektivni blokator BK_{Ca} kanala	100 nM
<i>TRAM-34</i>	selektivni blokator IK_{Ca} kanala	10 μ M
<i>apamin</i>	selektivni blokator SK_{Ca} kanala	50 nM
<i>L-NAME</i>	inhibitor endotelne NOS	100 μ M
<i>ODQ</i>	inhibitor solubilne GC	10 μ M
<i>sildenafil</i>	selektivni inhibitor PDE 5	1 nM
<i>KT5823</i>	selektivni inhibitor PKG	1 μ M
<i>hidroksokobalamin</i>	hvatač NO	3 μ M
<i>indometacin</i>	inhibitor ciklooksigenaze	10 μ M

K_{ATP} , ATP-senzitivni K^+ kanali; K_V , voltažno-zavisni K^+ kanali; K_{Ca} , kalcijum-zavisni K^+ kanali; BK_{Ca} , kalcijum-zavisni K^+ kanali velike provodljivosti; IK_{Ca} , kalcijum-zavisni K^+ kanali srednje provodljivosti; SK_{Ca} , kalcijum-zavisni K^+ kanali male provodljivosti; NOS, NO sintaza; GC, gvanilat ciklaza; PDE, fosfodiesteraza; PKG, protein kinaza G.

STATISTIČKA ANALIZA

Relaksacija prouzrokovana bilo kojom koncentracijom nikorandila ili natrijum hidrogensulfida merena je i izražavana u procentima u odnosu na maksimalnu moguću relaksaciju (povratak na baznu liniju, odnosno tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Koncentracija ispitivane supstance koja proizvodi 50% maksimalne relaksacije (EC_{50}) izračunavana je iz krive odnosa koncentracije i relaksacije, koristeći metodu najmanjih kvadrata, i izražavana kao pD_2 ($pD_2 = -\log EC_{50}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD), a vrednost n označava broj eksperimenata. Statističko poređenje kumulativnih koncentracijski-zavisnih krivih relaksacije pod različitim

tretmanom (sa i bez blokatora/inhibitora) vršeno je primenom dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjima i Bonferroni testom za *post hoc* poređenja. Za ispitivanje značajnosti razlika između maksimalnih vrednosti relaksacije i EC₅₀ vrednosti različitih grupa, korišćen je Studentov t-test. Statistički značajnom je smatrana vrednost $p < 0,05$. Za statističke analize korišćen je kompjuterski program SPSS (version 10.0; International Business Machines Corp, Armonk, NY), a za crtanje grafika program Sigma Plot (version 11.0; Systat Software, Inc.).

EKSPERIMENTALNE SUPSTANCE

U eksperimentima su korišćene sledeće supstance: nikorandil, natrijum-hidrogensulfid hidrat, acetilholin-jodid, fenilefrin-hidrohlorid, glibenklamid, 4-aminopiridin, margatoksin, tetraetilamonijum-hlorid, iberiotoksin, TRAM-34 (1-[(2-hlorofenil) difenilmetil]-1H-pirazol), apamin, L-NAME (N ω -nitro-L-arginin metil estar), ODQ (1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kvinoksalin-1-on), sildenafil-citrat, KT5823, indometacin, hidroskobalamin-hidrohlorid (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA).

Nikorandil i natrijum-hidrogensulfid rastvarani su u destilovanoj vodi neposredno pre upotrebe. Glibenklamid, TRAM-34, ODQ, sildenafil i indometacin rastvarani su u dimetil-sulfoksidu, a KT5823 u etil-acetatu. Ostale supstance su rastvarane u destilovanoj vodi. Korišćeni rastvarači nisu imali uticaja na preparate u koncentracijama u kojima su primenjeni (rezultati nisu prikazani). Sve supstance su dodavane direktno u vodeno kupatilo, a njihove koncentracije izražene su kao finalne molarne koncentracije u vodenom kupatilu.

Krebs-Ringerov bikarbonatni rastvor bio je sledećeg sastava: 118,3 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄ i 11,1 mM glukoze (pH = 7,4).

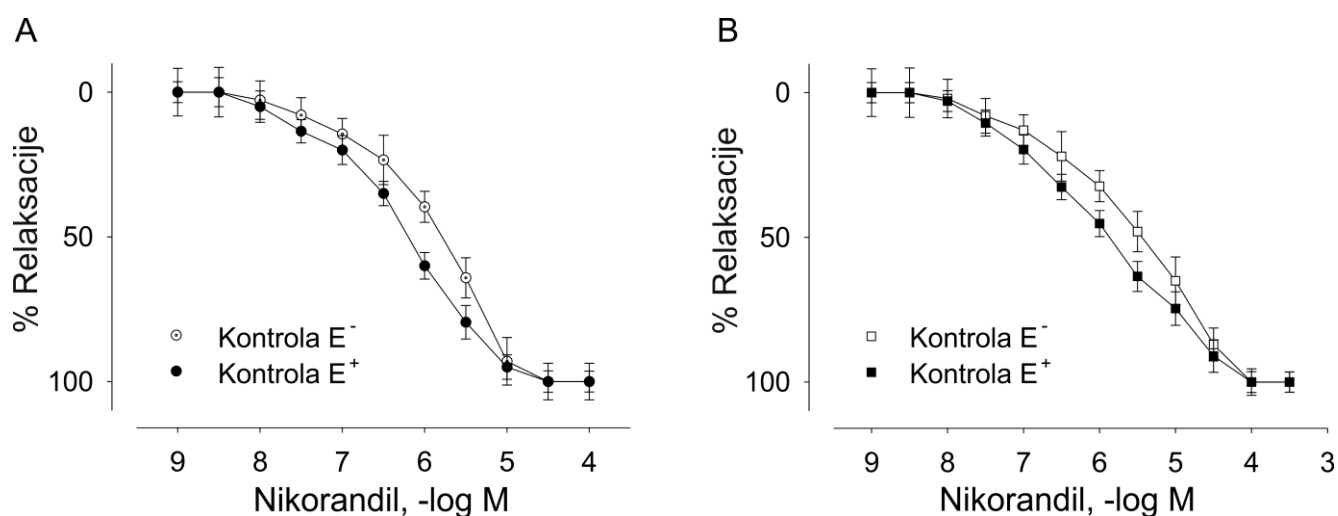
REZULTATI

I VAZODILATATORNI EFEKAT DONORA NO, NIKORANDILA

EFEKAT NIKORANDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI PREKONTRAHOVANOJ FENILEFRINOM

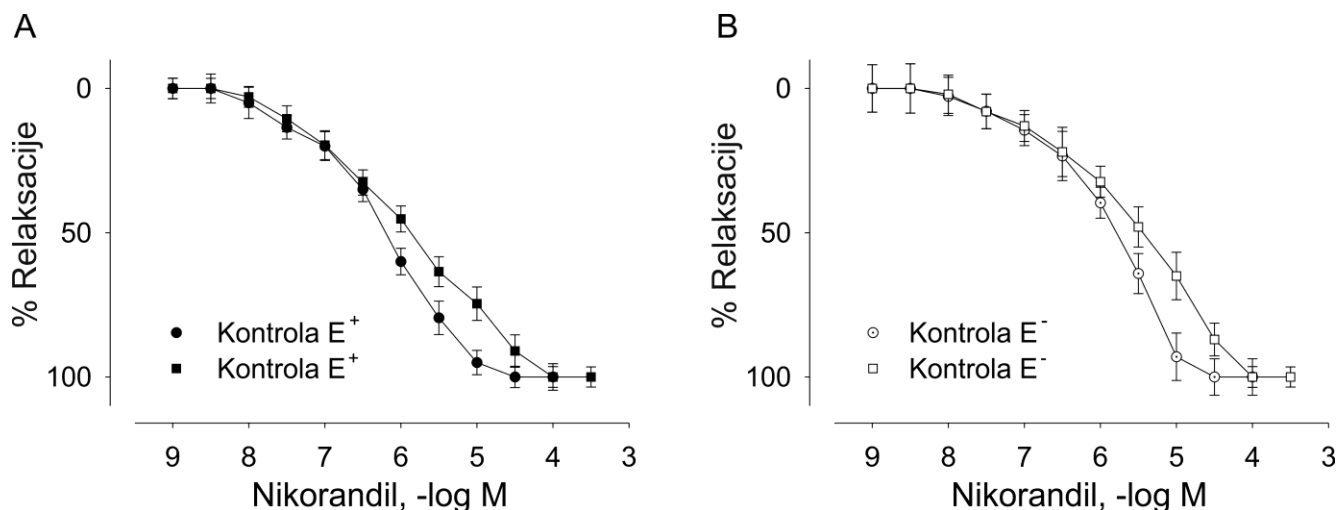
Nikorandil (0,001-300 μM) izaziva koncentracijski-zavisnu relaksaciju prstenova humane vene safene sa i bez endotela. Vrednost pD_2 kontrolne krive sa endotelom iznosi $6,23 \pm 0,10$, a maksimalni efekat $100,5 \pm 3,6\%$ ($n = 10$). Kod kontrolne krive bez endotela izračunata pD_2 vrednost je $5,98 \pm 0,25$, a maksimalni efekat $100,1 \pm 6,1\%$ ($n = 10$; Slika 5A).

Nikorandil (0,001-300 μM) koncentracijski-zavisno relaksira i prstenove unutrašnje torakalne arterije sa endotelom (pD_2 vrednost $5,90 \pm 0,16$; maksimalni efekat $100,5 \pm 4,6\%$; $n = 10$) i bez endotela (pD_2 vrednost $5,68 \pm 0,35$; maksimalni efekat $100,0 \pm 3,5\%$; $n = 10$) (Slika 5B).



Slika 5. Koncentracijski-zavisne krive za nikorandil dobijene na preparatima humane vene safene (A) i unutrašnje torakalne arterije (B) sa (E⁺) i bez endotela (E⁻). Prstenovi su prekontraховани fenilefrinom (10 μM). Endotel je uklanjan mehanički prevlačenjem unutrašnje površine prstenova žicom od nerđajućeg čelika. Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom nikorandila je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SD od n eksperimenata ($n = 10$).

Poređenje pD_2 vrednosti i maksimalnih efekata nikorandila između preparata krvnih sudova sa i bez endotela nije pokazalo statističku značajnost ($p > 0,05$ za oba krvna suda; Slika 6). Osetljivost vene safene (sa i bez endotela) je veća u odnosu na osetljivost unutrašnje torakalne arterije (sa i bez endotela) na nikorandil, ali statistička značajnost nije postignuta ($p > 0,05$ za oba poređenja; Slika 6). Nema razlike u maksimalnoj postignutoj relaksaciji na oba krvna (sa i bez endotela) (Slika 6).



Slika 6. Koncentracijski-zavisne krive za nikorandil dobijene na preparatima: (A) humane vene safene (●) i unutrašnje torakalne arterije (■) sa endotelom (E⁺) i (B) humane vene safene (⊙) i unutrašnje torakalne arterije (□) bez endotela (E⁻). Prstenovi su prekontrahovani fenilefrinom (10 μM). Endotel je uklanjan mehanički prevlačenjem unutrašnje površine prstenova žicom od nerđajućeg čelika. Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom nikorandila je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 10).

ISPITIVANJE MEHANIZMA VAZODILATORNOG DEJSTVA NIKORANDILA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI

S obzirom da su prve serije eksperimenata pokazale snažan endotel-nezavisni relaksantni efekat nikorandila na izolovanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji, dalja ispitivanja mehanizma dejstva vršena su na preparatima bez endotela.

U kontrolnim eksperimentima, koji su rađeni bez dodavanja blokatora K⁺ kanala, ODQ ili njihovih kombinacija, relaksacija preparata izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvana nikorandilom bila je slična u prvoj i drugoj kumulativnoj krivoj. Nije bilo statistički značajne razlike između pD₂ vrednosti i maksimalnih efekata prve i druge krive relaksacije na oba krvna suda (Tabela 3).

Tabela 3. Nikorandilom izazvana relaksacija kontrolnih prstenova (bez dodatka blokatora/inhibitora) izolovane humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Humana vena safena			
(1) Kontrola E ⁻	3	5,99±0,15	100,8±4,7
(2) Kontrola E ⁻	3	5,97±0,22	100,2±7,1
Humana unutrašnja torakalna arterija			
(1) Kontrola E ⁻	3	5,67±0,30	100,0±5,2
(2) Kontrola E ⁻	3	5,68±0,34	100,4±3,5

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁻, bez endotela; (1) Kontrola, prva kumulativna kriva relaksacije za nikorandil; (2) Kontrola, druga kumulativna kriva relaksacije za nikorandil.

Uticaj blokatora K^+ kanala na endotel-nezavisnu relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom

U cilju ispitivanja da li su i koji K^+ kanali uključeni u vazorelaksantni efekat nikorandila na izolovanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji, koristili smo sledeće blokatore K^+ kanala: glibenklamid, tetraetilamonijum, iberiotoksin, 4-aminopiridin i margatoksin.

Glibenklamid (10 μ M), 4-aminopiridin (0,5 mM) i margatoksin (10 nM) nisu uticali na bazalnu tenziju preparata, ni na kontrakciju izazvanu fenilefrinom. S druge strane, prisustvo tetraetilamonijuma (1 mM) i iberiotoksina (100 nM) dovelo je do porasta bazalnog nivoa tenzije preparata. Tokom eksperimenata, promena tenzije koja se javljala u prisustvu ovih blokatora je beležena, a 100% relaksacije je računato u odnosu na početni nivo tenzije.

Uticaj blokatora K_{ATP} kanala

Glibenklamid (10 μ M) je delimično blokirao relaksaciju izazvanu nikorandilom i na veni safeni (Slika 7A; Tabela 4) i na unutrašnjoj torakalnoj arteriji (Slika 8A; Tabela 5).

Uticaj blokatora K_{Ca} kanala

Tetraetilamonijum, u koncentraciji 1 mM, nije značajno uticao na relaksaciju izolovane vene safene (Slika 7B; Tabela 4). Suprotno, koncentracijski-zavisna kriva relaksacije za nikorandil na unutrašnjoj torakalnoj arteriji značajno je pomerena u desno u prisustvu 1 mM tetraetilamonijuma uz značajan uticaj i na pD_2 vrednost i na maksimalni efekat (Slika 8B; Tabela 5).

Iberiotoksin (100 nM), kao ni tetraetilamonijum, nije uticao na relaksaciju izolovane vene safene izazvanu nikorandilom (Slika 7B; Tabela 4), ali je doveo do značajnog pomeranja u desno kumulativne koncentracijski-zavisne krive relaksacije za nikorandil na unutrašnjoj torakalnoj arteriji (Slika 8B). I pD_2 vrednost i maksimalna relaksacija unutrašnje torakalne arterije su značajno smanjene u odnosu na kontrolu (Tabela 5).

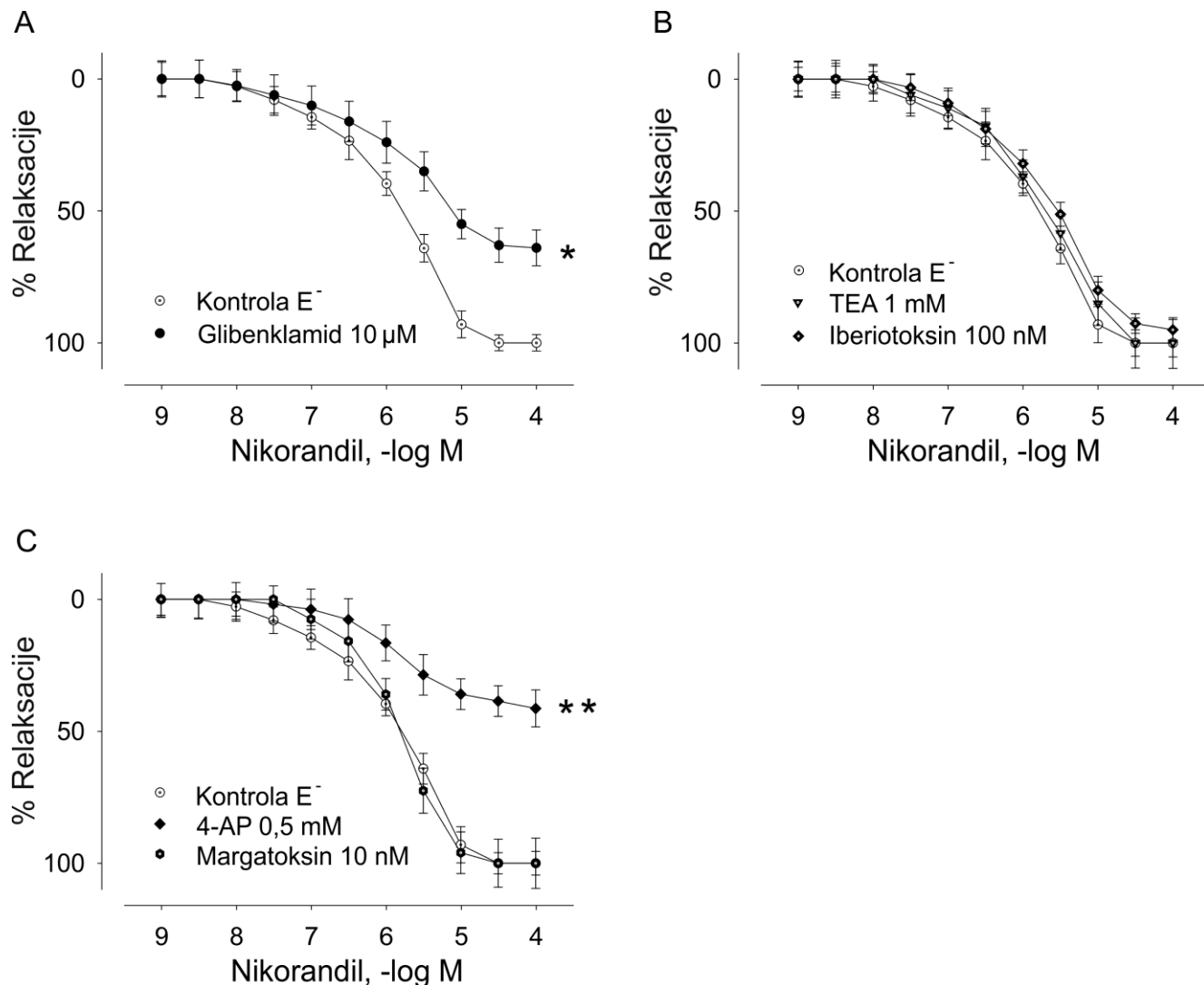
Uticaj blokatora K_V kanala

U prisustvu 0,5 mM 4-aminopiridina, relaksacija humane vene safene je bila delimično smanjena (Slika 7C; Tabela 4). Suprotno, nije bilo značajnog uticaja 4-aminopiridina na relaksaciju unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom (Slika 8C; Tabela 5).

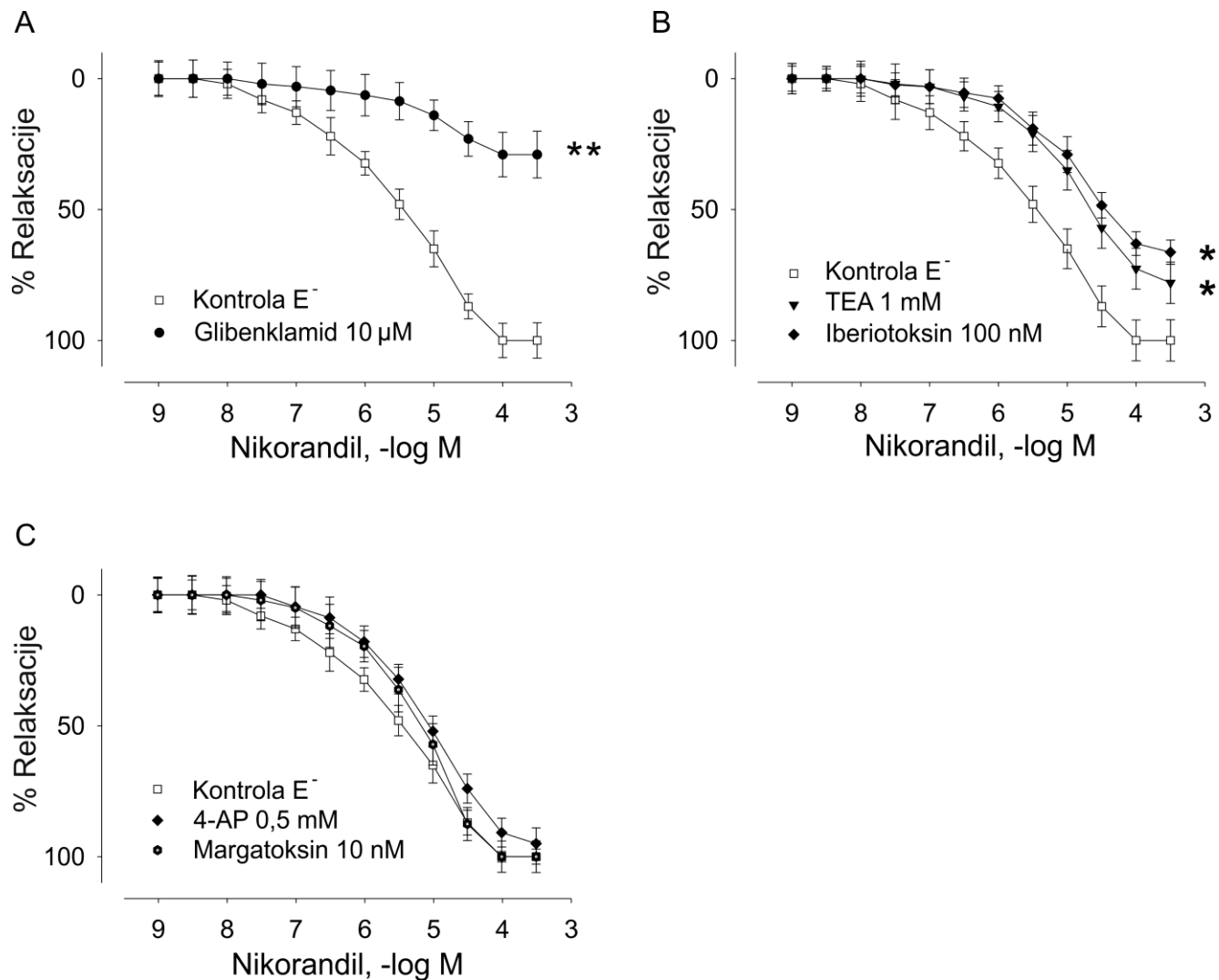
Margatoksin (10 nM) nije značajno modifikovao nikorandilom-izazvanu relaksaciju ni vene safene (Slika 7C; Tabela 4), ni unutrašnje torakalne arterije (Slika 8C; Tabela 5).

Poređenje kumulativnih krivih relaksacije za nikorandil (dvofaktorska ANOVA) pokazalo je da na veni safeni postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa glibenklamidom ($p < 0,05$) i 4-aminopiridinom ($p < 0,01$), dok nije bilo značajne razlike nakon inkubacije sa tetraetilamonijumom, iberiotoksinom i margatoksinom ($p > 0,05$ za sva poređenja) u odnosu na kontrolu.

Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, dvofaktorska ANOVA je pokazala statistički značajnu razliku nakon inkubacije sa glibenklamidom ($p < 0,01$), tetraetilamonijumom ($p < 0,05$) i iberiotoksinom ($p < 0,05$), kao i da nema značajne razlike nakon inkubacije sa 4-aminopiridinom i margatoksinom ($p > 0,05$ za oba) u odnosu na kontrolu.



Slika 7. Efekat blokatora K⁺ kanala na nikorandilom izazvanu relaksaciju izolovane humane vene safene prekontrahovane fenilefrinom (10 μM). Koncentracijski-zavisne krive za nikorandil u odsustvu i prisustvu glibenklamida (10 μM) (A); tetraetilamonijuma (TEA, 1 mM) i iberiotoksina (100 nM) (B); 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM) i margatoksina (10 nM) (C). Endotel je uklanjan mehanički pomoću žice od nerđajućeg čelika. Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom nikorandila izražena je kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 7-10). * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).



Slika 8. Uticaj blokatora K⁺ kanala na nikorandilom izazvanu relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom (10 μM). Koncentracijski-zavisne krive za nikorandil u odsustvu i prisustvu glibenklamida (10 μM) (A); tetraetilamonijuma (TEA, 1 mM) i iberiotoksina (100 nM) (B); 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM) i margatoksina (10 nM) (C). Endotel je uklanjan mehanički pomoću žice od nerđajućeg čelika. Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom nikorandila je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 7-10). * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).

Tabela 4. Efekti blokatora K⁺ kanala na relaksaciju izolovane humane vene safene prouzrokovanu nikorandilom.

	N	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁻	7	5,99±0,32	100,2±3,2
Glibenklamid 10 μM	7	5,92±0,24	64,0±7,1*
Kontrola E ⁻	7	5,97±0,13	100,6±8,3
TEA 1 mM	7	5,87±0,25	100,3±10,0
Kontrola E ⁻	7	5,98±0,19	100,2±3,5
Iberiotoksin 100 nM	7	5,82±0,17	95,1±4,1
Kontrola E ⁻	7	5,96±0,28	100,0±5,3
4-Aminopiridin 0,5 mM	7	nr	43,3±7,0**
Kontrola E ⁻	10	6,00±0,88	100,7±8,1
Margatoksin 10 nM	10	6,05±0,66	100,1±10,1

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁻, bez endotela; TEA, tetraetilamonijum; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Tabela 5. Efekti blokatora K⁺ kanala na relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije prouzrokovanu nikorandilom.

	N	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁻	7	5,71±0,19	100,2±7,1
Glibenklamid 10 μM	7	nr	29,3±9,0**
Kontrola E ⁻	7	5,69±0,28	100,0±3,3
TEA 1 mM	7	5,20±0,16*	78,2±8,1*
Kontrola E ⁻	7	5,64±0,20	100,6±4,2
Iberiotoksin 100 nM	7	5,21±0,29*	66,1±5,2*
Kontrola E ⁻	7	5,65±0,10	100,3±3,6
4-Aminopiridin 0,5 mM	7	5,34±0,32	95,5±6,4
Kontrola E ⁻	10	5,68±0,31	100,5±8,3
Margatoksin 10 nM	10	5,53±0,40	100,5±6,2

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁻, bez endotela; TEA, tetraetilamonijum; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Uticaj ODQ na endotel-nezavisnu relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom

U cilju ispitivanja uloge cGMP-a u mehanizmu vazodilatatornog dejstva nikorandila na izolovanoj humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji koristili smo ODQ, inhibitor solubilne GC, u koncentraciji 10 μ M.

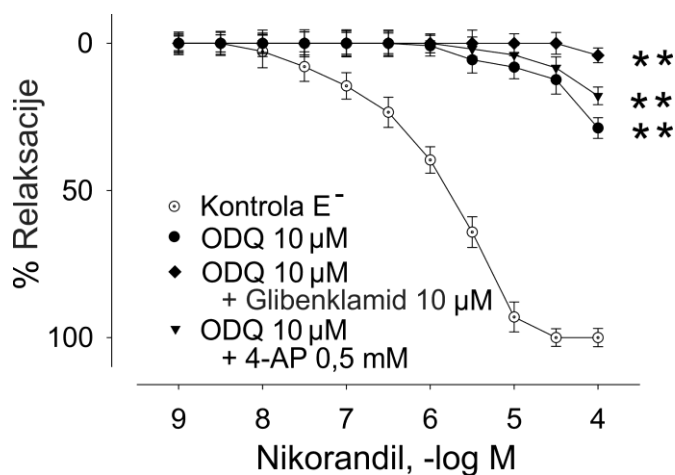
Inkubacija sa ODQ dovela je do značajne inhibicije efekta nikorandila na veni safeni (Slika 9; Tabela 6). Relaksacija unutrašnje torakalne arterije izazvana nikorandilom je delimično inhibirana u prisustvu ODQ (Slika 10; Tabela 7).

Dvofaktorska ANOVA je pokazala postojanje statistički značajne razlike između kumulativnih krivih nakon inkubacije sa ODQ u odnosu na kontrole krive na oba krvna suda ($p < 0,01$ za oba poređenja).

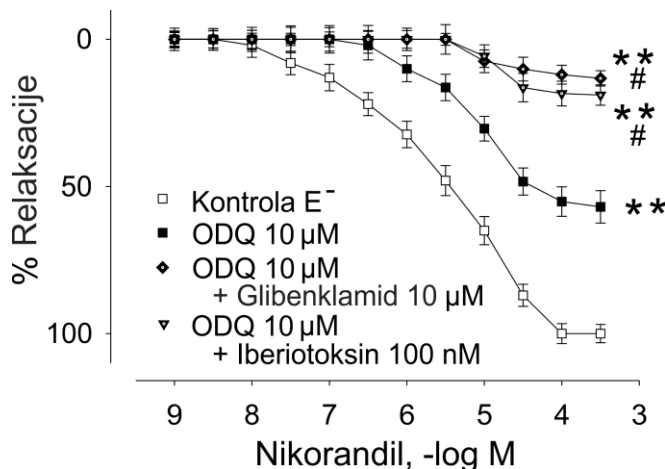
Uticaj kombinacije ODQ i blokatora K^+ kanala na endotel-nezavisnu relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom

Kako bismo ispitali ulogu cGMP-a kao sekundarnog glasnika u aktivaciji K^+ kanala izazvanoj nikorandilom, koristili smo ODQ (10 μ M) u kombinaciji sa blokatorima K^+ kanala za koje je u prethodnim serijama eksperimenata pokazano da značajno inhibiraju relaksaciju izazvanu nikorandilom. Na izolovanoj veni safeni ispitivali smo kombinacije ODQ plus glibenklamid (10 μ M) i ODQ plus 4-aminopiridin (0,5 mM), a na unutrašnjoj torakalnoj arteriji ODQ plus glibenklamid i ODQ plus iberiotoksin (100 nM).

Nikorandilom prouzrokovana relaksacija vene safene (Slika 9; Tabela 6) i unutrašnje torakalne arterije (Slika 10; Tabela 7) bila je statistički značajno više blokirana u prisustvu kombinacije ODQ i glibenklamida, nego u prisustvu samo ODQ.



Slika 9. Uticaj ODQ i ODQ u kombinaciji sa blokatorima K^+ kanala na relaksaciju izolovane humane vene safene prekontrahovane fenilefrinom (10 μ M). Koncentracijski-zavisne krive za nikorandil u odsustvu i prisustvu ODQ (10 μ M); ODQ (10 μ M) plus glibenklamid (10 μ M) i ODQ (10 μ M) plus 4-aminopiridin (4-AP, 0,5 mM). Endotel je uklanjan mehanički žicom od nerđajućeg čelika. Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom nikorandila je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SD od n eksperimenata ($n = 6-7$). ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).



Slika 10. Uticaj ODQ i ODQ u kombinaciji sa blokatorima K⁺ kanala na relaksaciju izolovane unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom (10 µM). Koncentracijski-zavisne krive za nikorandil u odsustvu i prisustvu ODQ (10 µM); ODQ (10 µM) plus glibenklamid (10 µM) i ODQ (10 µM) plus iberiotoksin (100 nM). Endotel je uklanjan mehanički žicom od nerđajućeg čelika. Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom nikorandila je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 7-8). ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu; # p < 0,05 u odnosu na grupu sa ODQ (dvofaktorska ANOVA).

Inkubacija preparata vene safene sa ODQ u kombinaciji sa 4-aminopiridinom nije statistički značajno modifikovala koncentracijski-zavisnu krivu relaksacije za nikorandil u poređenju sa krivom relaksacije nakon inkubacije samo sa ODQ (Slika 9; Tabela 6).

Na preparatima izolovane unutrašnje torakalne arterije, kombinacija ODQ i iberiotoksina dovela je do blokade relaksacije izazvane nikorandilom koja je bila značajno veća u poređenju sa blokadom izazvanom samim ODQ (Slika 10; Tabela 7).

Poređenje kumulativnih krivih relaksacije dvofaktorskom ANOVA-om pokazana je statistički značajna razlika nakon inkubacije unutrašnje torakalne arterije sa kombinacijama ODQ plus glibenklamid (p < 0,05) i ODQ plus iberiotoksin (p < 0,05) u odnosu na inkubaciju sa ODQ.

Tabela 6. Efekat ODQ i ODQ u kombinaciji sa blokatorima K⁺ kanala na relaksaciju izolovane humane vene safene izazvanu nikorandilom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁻	6	5,88±0,19	100,0±2,4
ODQ 10 µM	6	nr	29,2±3,1**
ODQ 10 µM	7	nr	29,5±2,6
ODQ 10 µM + Glibenklamid 10 µM	7	nr	4,0±1,1 ^{##}
ODQ 10 µM	7	nr	28,5±4,8
ODQ 10 µM + 4-Aminopiridin 0,5 mM	7	nr	18,8±2,5

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁻, bez endotela; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); ** p < 0,01 u odnosu na kontrolnu grupu; ^{##} p < 0,01 u odnosu na grupu eksperimenata sa ODQ (t-test).

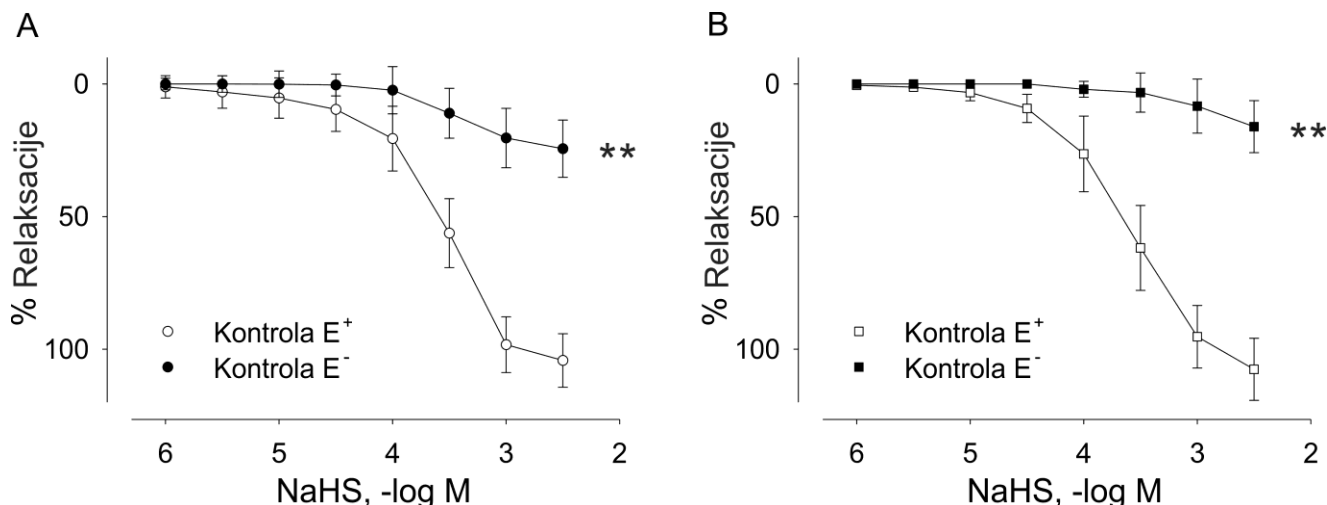
Tabela 7. Efekat ODQ i ODQ u kombinaciji sa blokatorima K⁺ kanala na relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁻	7	5,58±0,18	100,5±3,1
ODQ 10 μM	7	4,13±0,17**	57,2±6,3**
ODQ 10 μM	7	4,14±0,13	55,9±3,5
ODQ 10 μM + Glibenklamid 10 μM	7	nr	13,3±2,4 ^{##}
ODQ 10 μM	8	4,09±0,21	57,5±4,6
ODQ 10 μM + Iberiotoksin 100 nM	8	nr	19,1±3,0 ^{##}

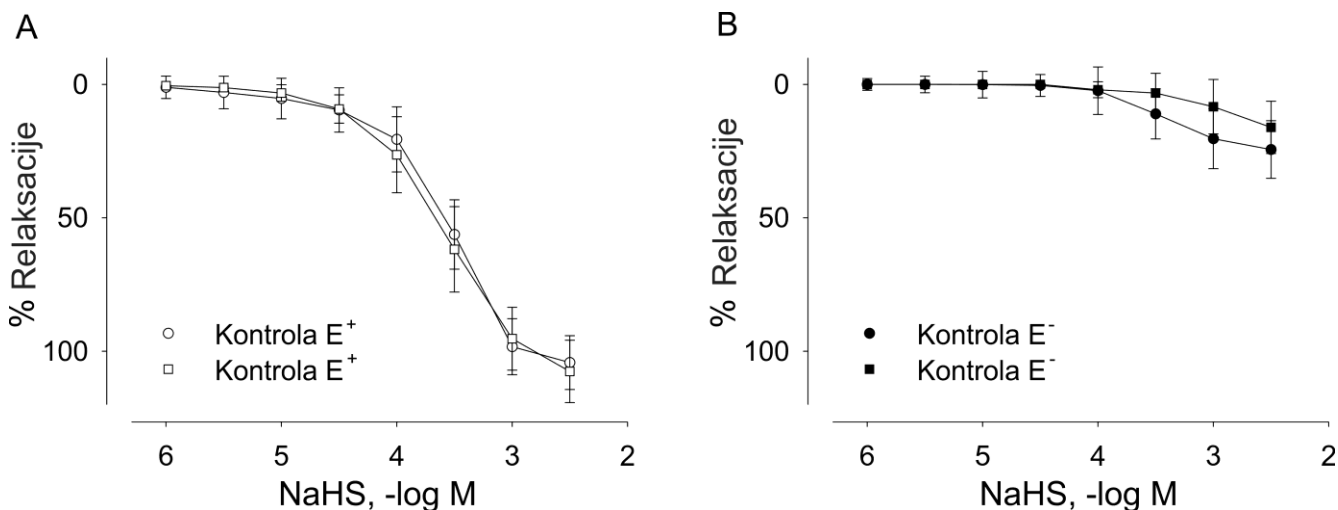
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁻, bez endotela; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu; ^{##} p < 0,01 u odnosu na grupu eksperimenata sa ODQ (t-test).

II VAZODILATATORNI EFEKAT DONORA H₂S, NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA

EFEKAT NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI PREKONTRAHOVANOJ FENILEFRINOM



Slika 11. Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid (NaHS) dobijene na preparatima humane vene safene (A) i unutrašnje torakalne arterije (B) sa (E⁺) i bez endotela (E⁻). Prstenovi su prekontrahevani fenilefrinom (10 μM). Endotel je uklanjao mehanički pomoću žice od nerđajućeg čelika. Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 15). ** p < 0,01 (dvofaktorska ANOVA).



Slika 12. Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid (NaHS) dobijene na preparatima: (A) humane vene safene (○) i unutrašnje torakalne arterije (□) sa endotelom (E⁺) i (B) humane vene safene (●) i unutrašnje torakalne arterije (■) bez endotela (E⁻). Prstenovi su prekontrahevani fenilefrinom (10 μM). Endotel je uklanjao mehanički pomoću žice od nerđajućeg čelika. Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 15).

Natrijum-hidrogensulfid (1 μ M–3 mM) izaziva koncentracijski-zavisnu relaksaciju prstenova izolovane vene safene sa endotelom (pD_2 vrednost $3,59 \pm 0,06$; maksimalna relaksacija $104,2 \pm 10,1\%$; $n = 15$). Relaksantni efekat natrijum-hidrogensulfida je značajno smanjen nakon uklanjanja endotela (maksimalna relaksacija $24,4 \pm 10,8\%$; $n = 15$; $p < 0,01$; Slika 11A).

Natrijum-hidrogensulfid (1 μ M–3 mM) koncentracijski-zavisno relaksira i prstenove izolovane unutrašnje torakane arterije sa endotelom (pD_2 vrednost $3,58 \pm 0,05$; maksimalna relaksacija $107,6 \pm 11,4\%$; $n = 15$), dok je relaksacija prstenova bez endotela značajno umanjena (maksimalna relaksacija $16,1 \pm 9,8\%$; $n = 15$; $p < 0,01$; Slika 11B).

Poređenje pD_2 vrednosti i maksimalne efikasnosti natrijum-hidrogensulfida između izolovane vene safene sa endotelom i unutrašnje torakalne arterije sa endotelom (Slika 12A), kao i među preparatima ova dva krvna suda bez endotela (Slika 12B), nije pokazalo statistički značajne razlike ($p > 0,05$ za sva poređenja).

ISPITIVANJE MEHANIZMA VAZODILATATORNOG DEJSTVA NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA NA IZOLOVANOJ HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKALNOJ ARTERIJI

Budući da je u prvim serijama eksperimenata pokazan značajan endotel-zavisni relaksantni efekat natrijum-hidrogensulfida na izolovanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji, dalja ispitivanja mehanizma dejstva vršena su na preparatima sa endotelom.

U kontrolnim eksperimentima, koji su rađeni bez dodavanja blokatora K^+ kanala, inhibitora NO/cGMP/PKG signalnog puta ili njihovih kombinacija, relaksacija preparata izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvana natrijum-hidrogensulfidom bila je slična u prvoj i drugoj kumulativnoj krivoj. Nije bilo statistički značajne razlike između pD_2 vrednosti i maksimalnih efekata prve i druge krive relaksacije na oba krvna suda (Tabela 8).

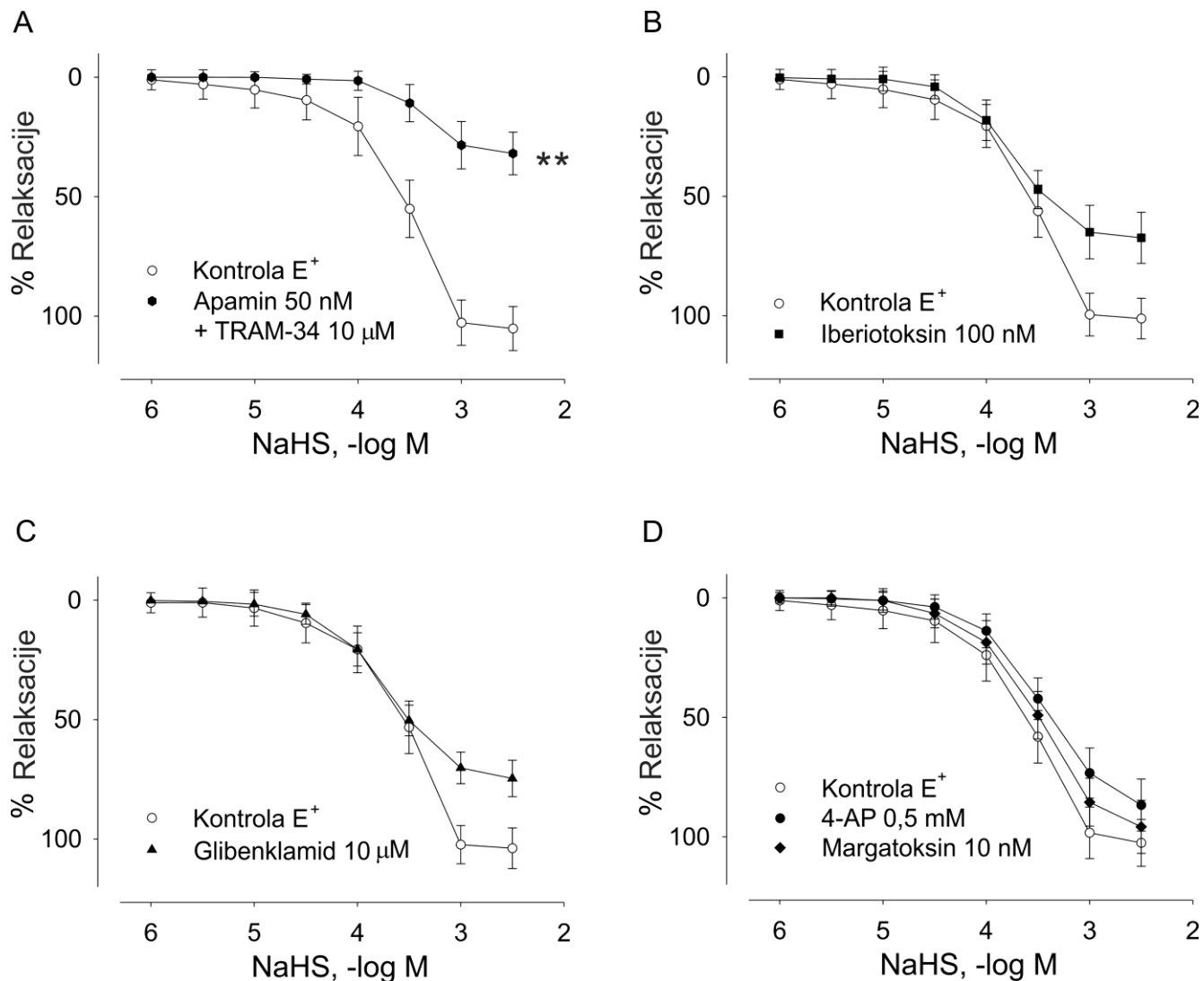
Tabela 8. Natrijum-hidrogensulfidom izazvana relaksacija kontrolnih prstenova (bez dodatka blokatora/inhibitora) izolovane humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom.

	n	pD_2	E_{max} (%)
Humana vena safena			
(1) Kontrola E^+	3	$3,59 \pm 0,06$	$104,2 \pm 10,1$
(2) Kontrola E^+	3	$3,56 \pm 0,09$	$104,6 \pm 11,0$
Humana unutrašnja torakalna arterija			
(1) Kontrola E^+	3	$3,58 \pm 0,05$	$107,6 \pm 11,4$
(2) Kontrola E^+	3	$3,54 \pm 0,09$	$107,0 \pm 10,9$

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. n , broj eksperimenata; $pD_2 = -\log EC_{50}$; E_{max} , maksimalna relaksacija; E^+ , sa endotelom; (1) Kontrola, prva kumulativna kriva relaksacije za natrijum-hidrogensulfid; (2) Kontrola, druga kumulativna kriva relaksacije za natrijum-hidrogensulfid.

Uticaj blokatora K⁺ kanala na endotel-zavisnu relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanu natrijum-hidrogensulfidom

U cilju ispitivanja uloge različitih podtipova K⁺ kanala u mehanizmu vazodilatatornog efekta natrijum-hidrogensulfida, koristili smo sledeće blokatore K⁺ kanala: apamin, TRAM-34, iberiotoksin, glibenklamid, 4-aminopiridin i margatoksin.

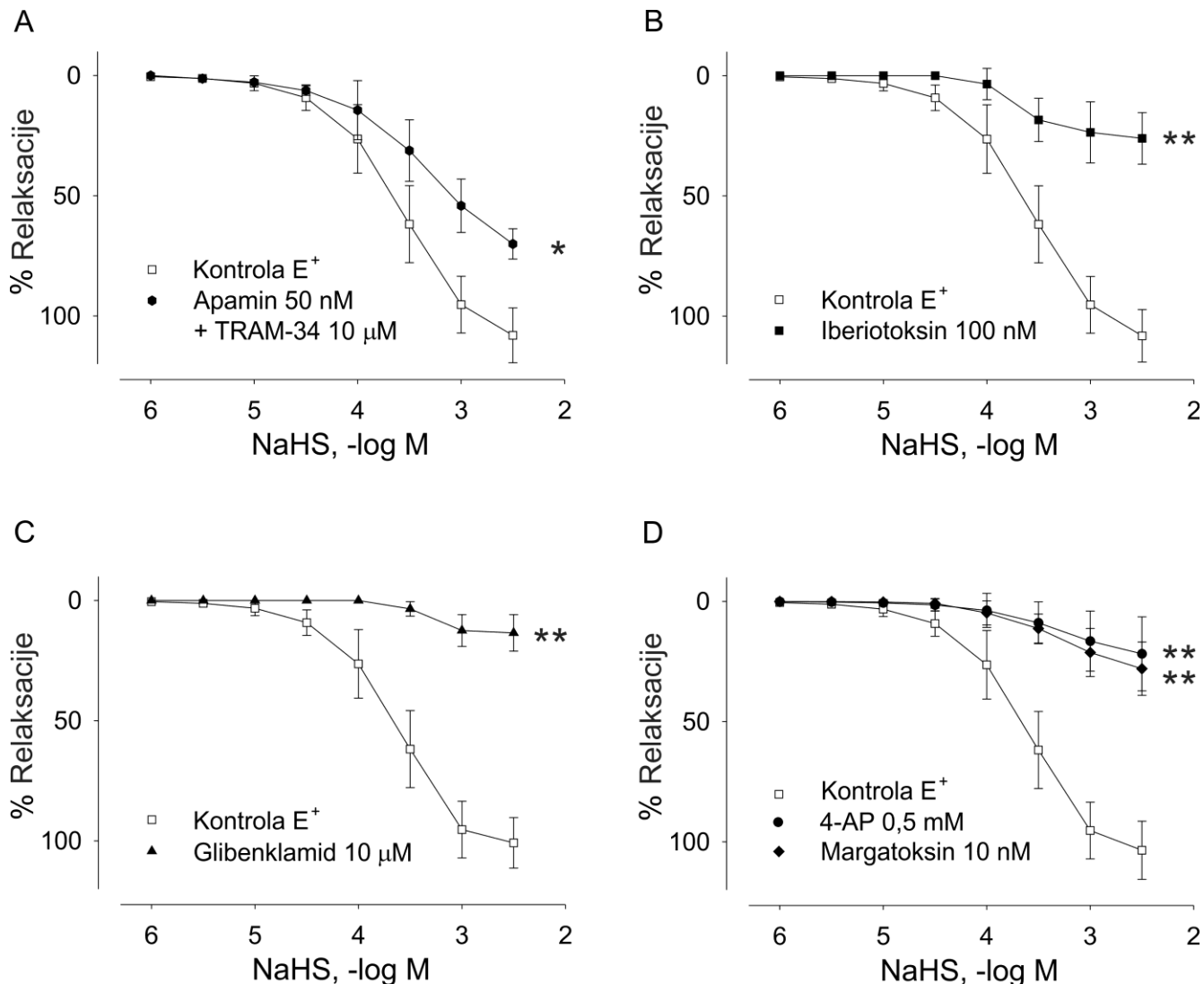


Slika 13. Uticaj blokatora K⁺ kanala na natrijum-hidrogensulfidom (NaHS) izazvanu relaksaciju izolovane humane vene safene prekontrahovane fenilefrinom (10 μM). Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid u odsustvu i prisustvu apamina (50 nM) u kombinaciji sa TRAM-34 (10 μM) (A); iberiotoksina (100 nM) (B); glibenklamida (10 μM) (C); 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM) i margatoksina (10 nM) (D). Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 4-8). ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).

Uticaj blokatora K_{Ca} kanala

U prisustvu kombinacije apamina (50 nM) i TRAM-34 (10 μ M), relaksacija prouzrokovana natrijum-hidrogensulfidom bila je značajno blokirana na humanoj veni safeni (Slika 13; Tabela 9), a samo delimično umanjena na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji (Slika 14; Tabela 10).

Iberiotoksin (100 nM) je na humanoj veni safeni blokirao samo relaksaciju izazvanu najvećim koncentracijama natrijum-hidrogensulfida (Slika 13; Tabela 9). Suprotno, relaksacija unutrašnje torakalne arterije izazvana natrijum-hidrogensulfidom je statistički visoko značajno redukovana u prisustvu iberiotoksina (Slika 14; Tabela 10).



Slika 14. Uticaj blokatora K^+ kanala na natrijum-hidrogensulfidom (NaHS) izazvanu relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom (10 μ M). Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid u odsustvu i prisustvu apamina (50 nM) u kombinaciji sa TRAM-34 (10 μ M) (A); iberiotoksina (100 nM) (B); glibenklamida (10 μ M) (C); 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM) i margatoksina (10 nM) (D). Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SD od n eksperimenata (n = 4-7). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (dvo faktorska ANOVA).

Uticaj blokatora K_{ATP} kanala

Glibenklamid (10 μ M) je blago smanjio maksimalnu relaksaciju izolovane vene safene izazvanu natrijum-hidrogensulfidom, bez značajnog uticaja na pD_2 vrednost (Slika 13; Tabela 9). S druge strane, relaksacija unutrašnje torakalne arterije indukovana natrijum-hidrogensulfidom značajno je inhibirana u prisustvu glibenklamida (Slika 14; Tabela 10).

Uticaj blokatora K_V kanala

U prisustvu 4-aminopiridina (0,5 mM) i margatoksina (10 nM), relaksacija humane vene safene izazvana natrijum-hidrogensulfidom nije bila značajno modifikovana (Slika 13; Tabela 9), dok je relaksacija unutrašnje torakalne arterije bila značajno umanjena u prisustvu oba blokatora (Slika 14; Tabela 10).

Poređenje kumulativnih krivih relaksacije za natrijum-hidrogensulfid dvofaktorskom ANOVA-om pokazalo je da, na veni safeni, postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa kombinacijom apamin/TRAM-34 ($p < 0,01$), kao i da nema značajne razlike nakon tretmana iberiotoksinom, glibenklamidom i 4-aminopiridinom ($p > 0,05$ za sva poređenja) u odnosu na kontrolu.

Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, dvofaktorska ANOVA je pokazala statistički značajnu razliku nakon inkubacije sa svim korišćenim blokatorima: apamin/TRAM-34 kombinacijom ($p < 0,05$), iberiotoksinom, glibenklamidom, 4-aminopiridinom i margatoksinom ($p < 0,01$ za sva poređenja) u odnosu na kontrolu.

Tabela 9. Uticaj blokatora K^+ kanala na relaksaciju izolovane vene safene indukovanu natrijum-hidrogensulfidom.

	n	pD_2	E_{max} (%)
Kontrola E^+	6	3,63±0,10	105,2±9,2
Apamin 50 nM + TRAM-34 10 μ M	6	nr	31,9±8,9**
Kontrola E^+	6	3,55±0,07	101,2±8,5
Iberiotoksin 100 nM	6	3,44±0,15	67,4±9,7*
Kontrola E^+	5	3,59±0,08	103,8±8,5
Glibenklamid 10 μ M	5	3,50±0,13	74,6±7,6*
Kontrola E^+	8	3,62±0,10	102,5±9,8
4-Aminopiridin 0,5 mM	8	3,39±0,15	86,7±10,9
Kontrola E^+	4	3,62±0,10	103,0±10,2
Margatoksin 10 nM	4	3,39±0,15	95,8±11,1

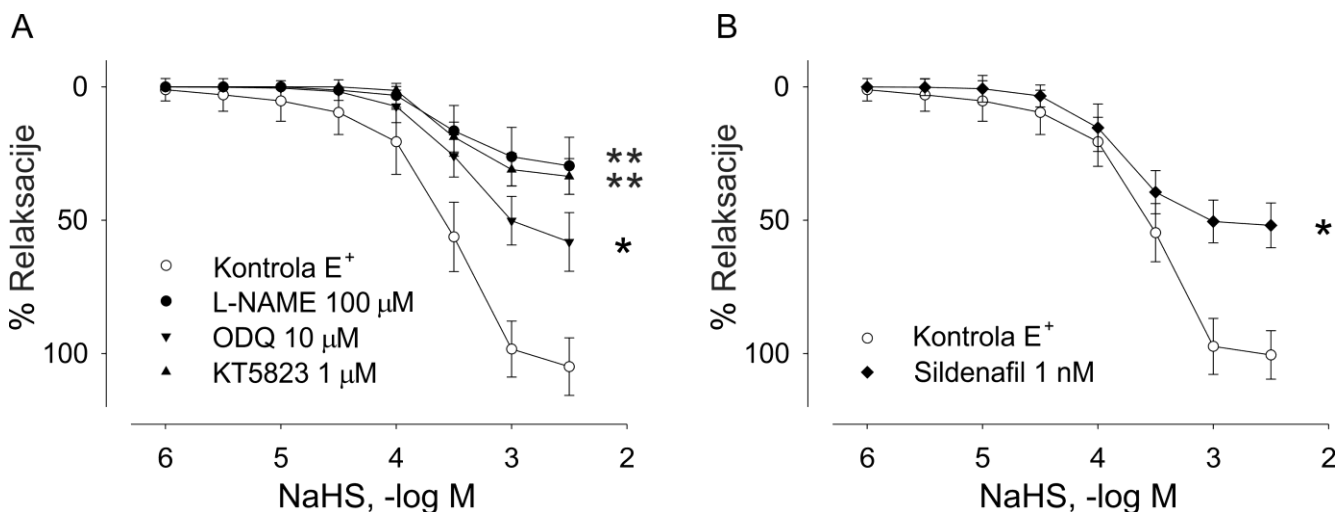
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. n, broj eksperimenata; $pD_2 = -\log EC_{50}$; E_{max} , maksimalna relaksacija; E^+ , preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (t-test).

Tabela 10. Uticaj blokatora K⁺ kanala na relaksaciju izolovane unutrašnje torakalne arterije indukovanu natrijum-hidrogensulfidom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁺	6	3,57±0,12	108,0±11,1
Apamin 50 nM + TRAM-34 10 μM	6	3,00±0,10**	70,0±6,3**
Kontrola E ⁺	4	3,60±0,08	108,2±10,9
Iberiotoksin 100 nM	4	nr	26,1±10,7**
Kontrola E ⁺	6	3,62±0,05	100,8±10,5
Glibenklamid 10 μM	6	nr	13,5±7,6**
Kontrola E ⁺	7	3,54±0,06	103,5±12,1
4-Aminopiridin 0,5 mM	7	nr	21,8±15,4**
Kontrola E ⁺	5	3,54±0,06	104,7±12,0
Margatoksin 10 nM	5	nr	27,9±11,1**

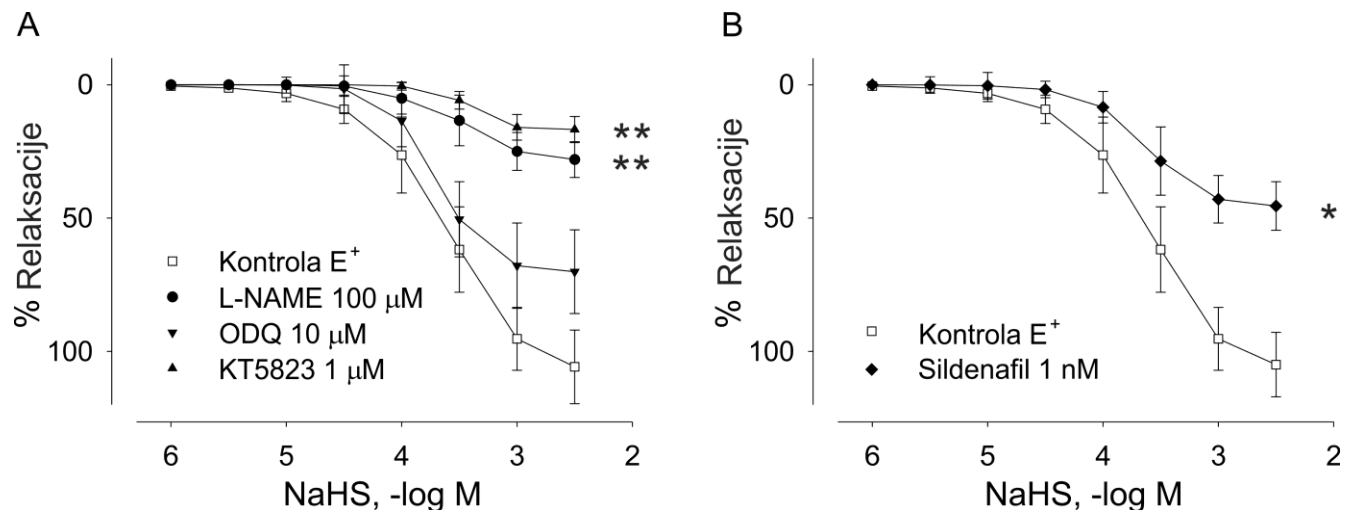
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max} maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Uloga NO/cGMP/PKG signalnog puta u relaksaciji izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanoj natrijum-hidrogensulfidom



Slika 15. Uticaj inhibitora NO/cGMP/PKG signalnog puta na natrijum-hidrogensulfidom (NaHS) izazvanu relaksaciju vene safene prekontrahovane fenilefrinom (10 μM). Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid u odsustvu i prisustvu L-NAME (100 μM), ODQ (10 μM) i KT5823 (1 μM) (A) i sildenafilila (1 nM) (B). Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 5-10). * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).

Relaksacija izazvana natrijum-hidrogensulfidom bila je značajno antagonizovana u prisustvu L-NAME (100 μ M) i KT5823 (1 μ M), a delimično inhibirana u prisustvu sildenafilu (1 nM) na oba krvna suda (Slike 15 i 16; Tabele 11 i 12). U prisustvu ODQ (10 μ M), relaksacija humane vene safene je bila delimično smanjena (Slika 15A; Tabela 11), dok je uticaj na relaksaciju unutrašnje torakalne arterije bio značajan samo u visokim koncentracijama natrijum-hidrogensulfida (Slika 16A; Tabela 12).



Slika 16. Uticaj inhibitora NO/cGMP/PKG signalnog puta na natrijum-hidrogensulfidom (NaHS) izazvanu relaksaciju unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom (10 μ M). Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid u odsustvu i prisustvu L-NAME (100 μ M), ODQ (10 μ M) i KT5823 (1 μ M) (A) i sildenafilu (1 nM) (B). Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SD od n eksperimenata (n = 5-6). * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).

Tabela 11. Uticaj inhibitora NO/cGMP/PKG signalnog puta na relaksaciju izolovane vene safene indukovanu natrijum-hidrogensulfidom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁺	10	3,59 \pm 0,03	104,9 \pm 10,8
L-NAME 100 μ M	10	nr	29,6 \pm 10,7**
Kontrola E ⁺	7	3,60 \pm 0,05	105,8 \pm 11,2
ODQ 10 μ M	7	3,00 \pm 0,13**	58,1 \pm 11,0**
Kontrola E ⁺	5	3,57 \pm 0,07	103,4 \pm 10,0
KT5823 1 μ M	5	nr	33,6 \pm 6,7**
Kontrola E ⁺	6	3,54 \pm 0,14	100,5 \pm 9,1
Sildenafil 1 nM	6	3,09 \pm 0,32*	51,9 \pm 8,4**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (t-test).

Dvofaktorskom ANOVA-om je pokazana statistički značajna razlika nakon inkubacije oba krvna suda sa L-NAME i KT5823 ($p < 0,01$ za oba blokatora) i sildenafilom ($p < 0,05$), kao i nakon inkubacije vene safene sa ODQ ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne krive.

Tabela 12. Uticaj inhibitora NO/cGMP/PKG signalnog puta na relaksaciju izolovane unutrašnje torakalne arterije indukovanu natrijum-hidrogensulfidom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
Kontrola E ⁺	6	3,59±0,03	105,8±13,8
L-NAME 100 μM	6	nr	28,0±6,7**
Kontrola E ⁺	5	3,58±0,04	101,5±13,1
ODQ 10 μM	5	3,49±0,11	70,9±15,7*
Kontrola E ⁺	6	3,61±0,05	109,1±9,7
KT5823 1 μM	6	nr	16,8±4,9**
Kontrola E ⁺	6	3,60±0,09	104,9±12,1
Sildenafil 1 nM	6	nr	45,5±9,1**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (t-test).

Uloga NO i cGMP-a u aktivaciji K⁺ kanala izazvanoj natrijum-hidrogensulfidom

U cilju ispitivanja potencijalne uloge NO i cGMP-a u aktivaciji K⁺ kanala izazvanoj natrijum-hidrogensulfidom, testirali smo uticaj blokatora K⁺ kanala na relaksaciju vene safene i unutrašnje torakalne arterije u prisustvu: 1) kombinacije L-NAME (100 μM) plus indometacin (10 μM) plus hidrosokobalamin (3 μM), kako bismo inhibirali sintezu i oslobađanje NO i prostaciklina iz endotela, ili 2) ODQ (10 μM) u cilju blokade sinteze cGMP-a kao sekundarnog glasnika.

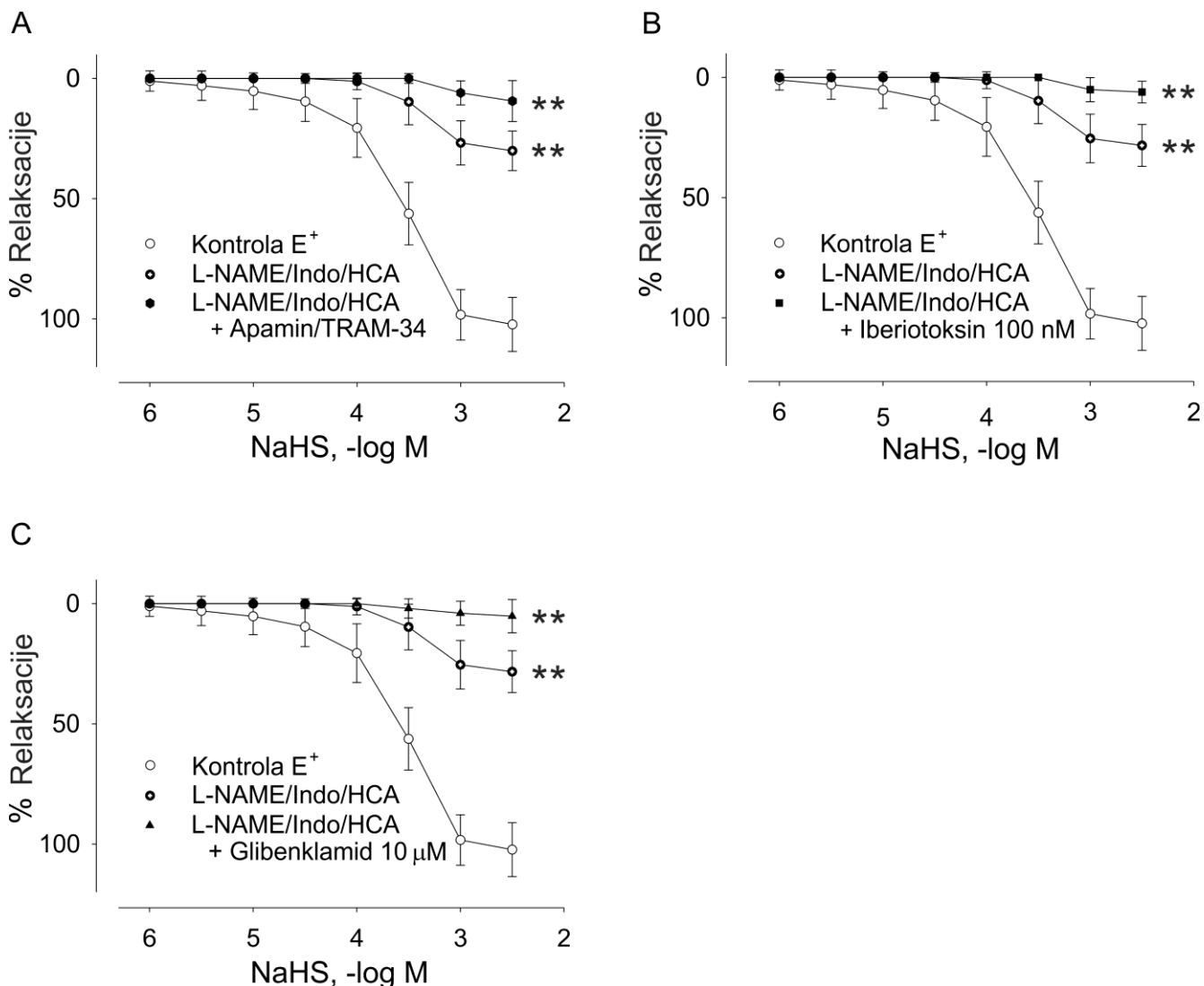
Uticaj blokatora K⁺ kanala u prisustvu kombinacije L-NAME/indometacin/hidrosokobalamin na relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije indukovanu natrijum-hidrogensulfidom

Dodatak kombinacije apamina (50 nM) i TRAM-34 (10 μM), u prisustvu L-NAME/indometacin/hidrosokobalamin kombinacije, doveo je do dodatnog smanjenja relaksacije indukovane natrijum-hidrogensulfidom na oba krvna suda u poređenju sa efektom same kombinacije L-NAME/indometacin/hidrosokobalamin (Slike 17A i 18A; Tabele 13 i 14).

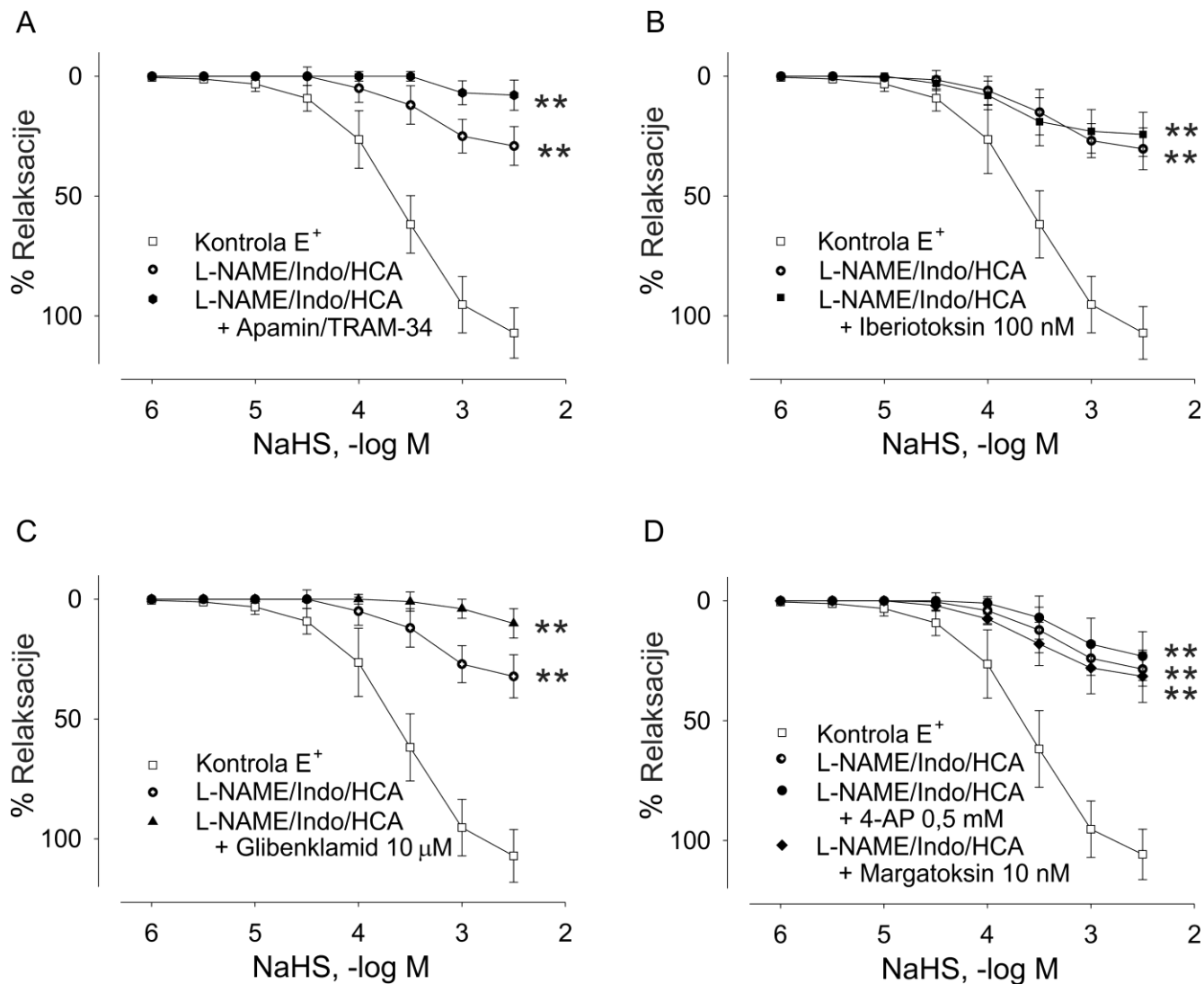
Iberiotoksin (100 nM) u kombinaciji sa L-NAME/indometacinom/hidrosokobalaminom doveo je do dodatne blokade relaksacije izolovane vene safene (Slika 17B; Tabela 13), ali nije značajno modifikovao relaksaciju izolovane unutrašnje torakalne arterije izazvanu natrijum-hidrogensulfidom u odnosu na relaksaciju dobijenu samo u prisustvu L-NAME/indometacina/hidrosokobalamina (Slika 18B; Tabela 14).

Relaksacija vene safene i unutrašnje torakalne arterije prozrokovana natrijum-hidrogensulfidom, bila je statistički značajno više blokirana u prisustvu kombinacije L-NAME/indometacin/hidroksokobalamin i glibenklamida (10 μ M), nego u prisustvu samo L-NAME/indometacina/hidroksokobalamina (Slike 17C i 18C; Tabele 13 i 14).

Inkubacija preparata izolovane unutrašnje torakalne arterije sa L-NAME/indometacinom/hidroksokobalaminom u kombinaciji sa 4-aminopiridinom (0,5 mM) ili margatoksinom (10 nM) nije statistički značajno modifikovala koncentracijski-zavisnu krivu relaksacije za natrijum-hidrogensulfid u poređenju sa krivom relaksacije nakon inkubacije samo sa L-NAME/indometacinom/hidroksokobalaminom (Slika 18D; Tabela 14).



Slika 17. Uloga NO u aktivaciji K⁺ kanala izazvanoj natrijum-hidrogensulfidom (NaHS) na humanoj veni safeni. Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid dobijene na preparatima vene safene koja je inkubirana sa kombinacijom L-NAME (100 μ M) plus indometacin (Indo, 10 μ M) plus hidroksokobalamin (HCA, 3 μ M) u odsustvu i prisustvu apamina (50 nM) u kombinaciji sa TRAM-34 (10 μ M) (A), iberiotoksina (100 nM) (B) i glibenklamida (10 μ M) (C). Prstenovi su prekontrahovani fenilefrinom (10 μ M). Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SD od n eksperimenata (n = 4-7). ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).



Slika 18. Uloga NO u aktivaciji K⁺ kanala izazvanoj natrijum-hidrogensulfidom (NaHS) na humanoju unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid dobijene na preparatima unutrašnje torakalne arterije koja je inkubirana sa kombinacijom L-NAME (100 μM) plus indometacin (Indo, 10 μM) plus hidroksokobalamin (HCA, 3 μM) u odsustvu i prisustvu apamina (50 nM) u kombinaciji sa TRAM-34 (10 μM) (A), iberiotoksina (100 nM) (B), glibenklamida (10 μM) (C), 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM) i margatoksina (10 nM) (D). Prstenovi su prekontrahovani fenilefrinom (10 μM). Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD od n eksperimenata (n = 4-6). ** p < 0,01 u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).

Tabela 13. Efekat blokatora K^+ kanala u prisustvu kombinacije L-NAME/indometacin/hidroksokobalamin na relaksaciju izolovane humane vene safene izazvanu natrijum-hidrogensulfidom.

	n	pD_2	E_{max} (%)
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M	5	nr	30,1 \pm 8,2
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M + Apamin 50 nM/TRAM-34 10 μ M	5	nr	9,4 \pm 8,5**
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M	4	nr	29,3 \pm 9,0
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M + Iberiotoksin 100 nM	4	nr	6,1 \pm 4,5**
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M	7	nr	28,3 \pm 8,7
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M + Glibenklamid 10 μ M	7	nr	5,2 \pm 6,9**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. n, broj eksperimenata; $pD_2 = -\log EC_{50}$; E_{max} , maksimalna relaksacija; Indo, indometacin; HCA, hidroksokobalamin; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); ** $p < 0,01$ u odnosu na grupu eksperimenata sa L-NAME/indometacin/hidroksokobalamin kombinacijom (t-test).

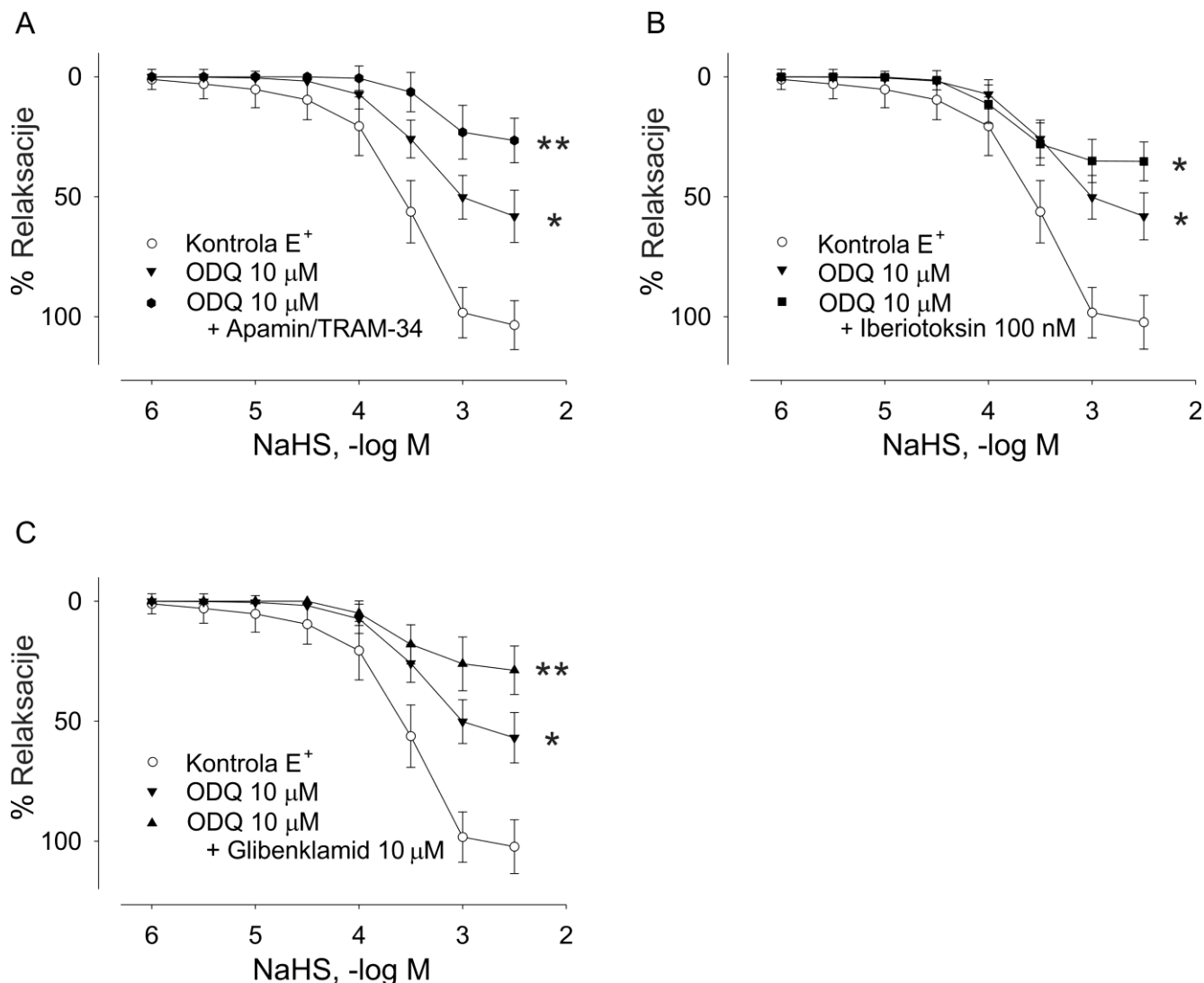
Tabela 14. Efekat blokatora K^+ kanala u prisustvu kombinacije L-NAME/indometacin/hidroksokobalamin na relaksaciju izolovane humane unutrašnje torakalne arterije izazvanu natrijum-hidrogensulfidom.

	n	pD_2	E_{max} (%)
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M	4	nr	29,1 \pm 8,1
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M + Apamin 50 nM/TRAM-34 10 μ M	4	nr	7,9 \pm 6,3**
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M	4	nr	30,3 \pm 8,7
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M + Iberiotoksin 100 nM	4	nr	24,3 \pm 9,2
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M	6	nr	32,2 \pm 9,0
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M + Glibenklamid 10 μ M	6	nr	10,1 \pm 6,1**
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M	5	nr	28,5 \pm 7,1
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M + 4-Aminopiridin 0,5 mM	5	nr	23,1 \pm 10,2
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M	4	nr	27,8 \pm 8,1
L-NAME 100 μ M/Indo 10 μ M/HCA 3 μ M + Margatoksin 10 nM	4	nr	31,5 \pm 10,9

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. n, broj eksperimenata; $pD_2 = -\log EC_{50}$; E_{max} , maksimalna relaksacija; Indo, indometacin; HCA, hidroksokobalamin; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); ** $p < 0,01$ u odnosu na grupu eksperimenata sa L-NAME/indometacin/hidroksokobalamin kombinacijom (t-test).

Uticaj blokatora K^+ kanala u prisustvu ODQ na relaksaciju izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije indukovanu natrijum-hidrogensulfidom

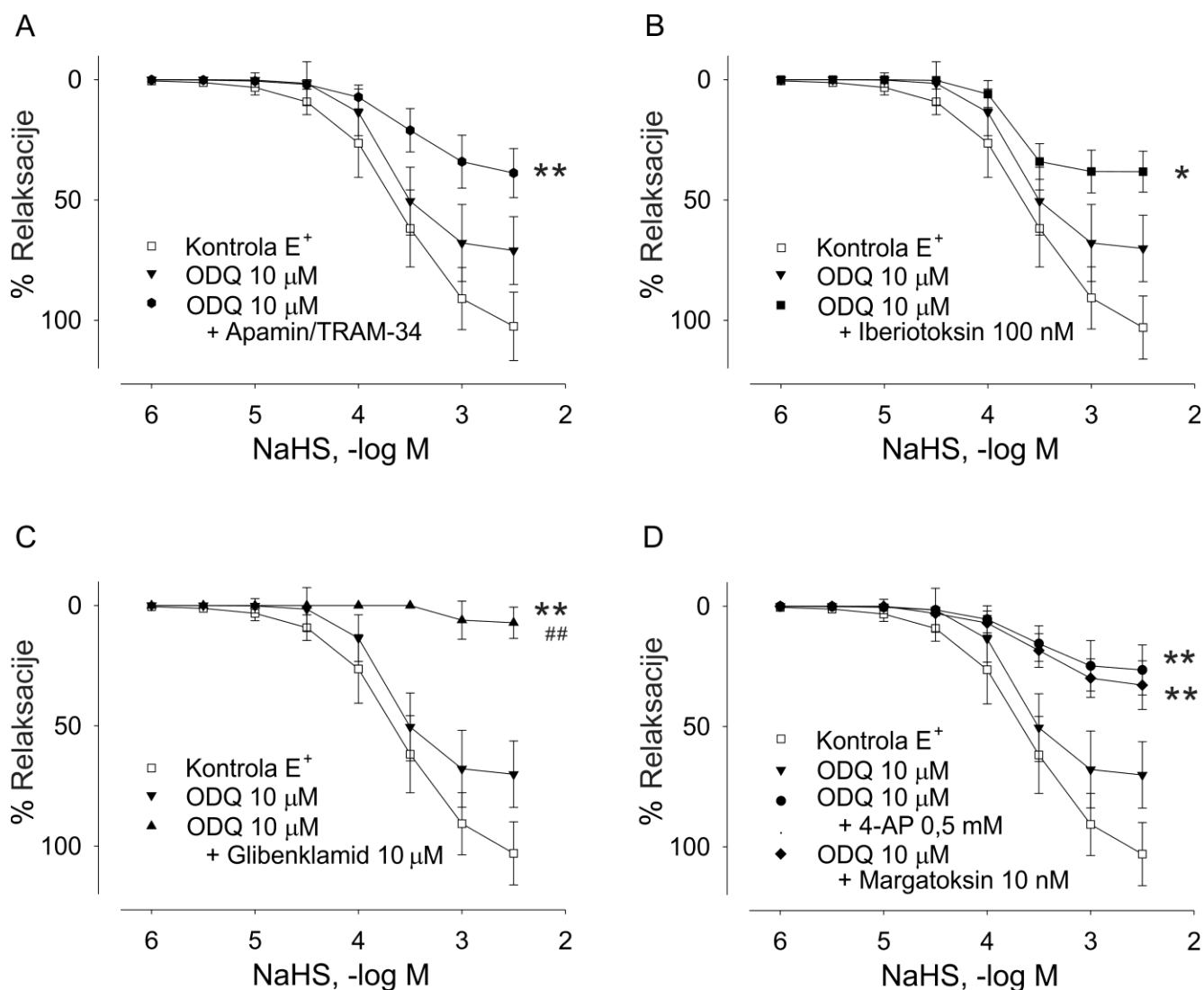
Relaksacija vene safene izazvana natrijum-hidrogensulfidom bila je dodatno redukovana u prisustvu ODQ ($10 \mu\text{M}$) u kombinaciji sa apaminom (50 nM)/TRAM-34 ($10 \mu\text{M}$) (Slika 19A), iberiotoksinom (100 nM) (Slika 19B) ili glibenklamidom ($10 \mu\text{M}$) (Slika 19C), nego u prisustvu samo ODQ (Tabela 15).



Slika 19. Efekat blokatora K^+ kanala u prisustvu ODQ na relaksaciju izolovane vene safene indukovanu natrijum-hidrogensulfidom (NaHS). Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid dobijene na preparatima vene safene inkubirane sa ODQ ($10 \mu\text{M}$) u odsustvu i prisustvu apamina (50 nM) u kombinaciji sa TRAM-34 ($10 \mu\text{M}$) (A), iberiotoksina (100 nM) (B) i glibenklamida ($10 \mu\text{M}$) (C). Prstenovi su prekontrahovani fenilefrinom ($10 \mu\text{M}$). Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SD od n eksperimenata ($n = 4-5$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (dvofaktorska ANOVA).

Na preparatima unutrašnje torakalne arterije, dodatak svih ispitivanih blokatora (apamin (50 nM)/TRAM-34 (10 μ M) kombinacije (Slika 20A), iberiotoksina (100 nM) (Slika 20B), glibenklamida (10 μ M) (Slika 20C), 4-aminopiridina (0,5 mM) i margatoksina (10 nM) (Slika 20D)) u kombinaciji sa ODQ (10 μ M) doveo je do značajnije blokade relaksacije izazvane natrijum-hidrogensulfidom u poređenju sa blokadom izazvanom samim ODQ (Tabela 16).

Poređenje kumulativnih krivih relaksacije dvofaktorskom ANOVA-om pokazalo je postojanje statistički značajne razlike nakon inkubacije unutrašnje torakalne arterije sa kombinacijom ODQ plus glibenklamid ($p < 0,01$) u odnosu na inkubaciju sa ODQ.



Slika 20. Efekat blokatora K^+ kanala u prisustvu ODQ na relaksaciju izolovane unutrašnje torakalne arterije indukovanu natrijum-hidrogensulfidom (NaHS). Koncentracijski-zavisne krive za natrijum-hidrogensulfid dobijene na preparatima unutrašnje torakalne arterije inkubirane sa ODQ (10 μ M) u odsustvu i prisustvu apamina (50 nM) u kombinaciji sa TRAM-34 (10 μ M) (A), iberiotoksina (100 nM) (B), glibenklamida (10 μ M) (C), 4-aminopiridina (4-AP, 0,5 mM) i margatoksina (10 nM) (D). Prstenovi su prekontrahovani fenilefrinom (10 μ M). Relaksacija izazvana svakom pojedinačnom koncentracijom natrijum-hidrogensulfida je izražena kao procenat maksimalne relaksacije, što predstavlja povratak na baznu liniju (tenziju pre kontrakcije fenilefrinom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SD od n eksperimenata ($n = 4-5$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu; ### $p < 0,01$ u odnosu na grupu sa ODQ (dvofaktorska ANOVA).

Tabela 15. Efekat blokatora K⁺ kanala u prisustvu ODQ na relaksaciju izolovane vene safene indukovanu natrijum-hidrogensulfidom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
ODQ 10 μM	5	3,05±0,10	58,1±10,9
ODQ 10 μM + Apamin 50 nM/TRAM-34 10 μM	5	nr	26,5±9,3**
ODQ 10 μM	4	3,03±0,17	58,5±9,8
ODQ 10 μM + Iberiotoksin 100 nM	4	nr	35,3±8,1*
ODQ 10 μM	5	3,09±0,11	56,9±10,5
ODQ 10 μM + Glibenklamid 10 μM	5	nr	28,8±10,1**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); *p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na grupu eksperimenata sa ODQ (t-test).

Tabela 16. Efekat blokatora K⁺ kanala u prisustvu ODQ na relaksaciju izolovane unutrašnje torakalne arterije indukovanu natrijum-hidrogensulfidom.

	n	pD ₂	E _{max} (%)
ODQ 10 μM	4	3,49±0,11	71,0±14,1
ODQ 10 μM + Apamin 50 nM/TRAM-34 10 μM	4	nr	38,8±10,2*
ODQ 10 μM	4	3,50±0,10	71,5±13,1
ODQ 10 μM + Iberiotoksin 100 nM	4	nr	38,2±8,5**
ODQ 10 μM	5	3,51±0,07	70,1±12,8
ODQ 10 μM + Glibenklamid 10 μM	5	nr	7,2±6,5**
ODQ 10 μM	5	3,52±0,06	69,9±13,8
ODQ 10 μM + 4-Aminopiridin 0,5 mM	5	nr	26,5±10,4**
ODQ 10 μM	5	3,52±0,06	70,9±11,7
ODQ 10 μM + Margatoksin 10 nM	5	nr	32,8±10,1**

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD. n, broj eksperimenata; pD₂= -log EC₅₀; E_{max}, maksimalna relaksacija; E⁺, preparat sa endotelom; nr, nije računat (zbog male efikasnosti); * p < 0,05; ** p < 0,01 u odnosu na grupu eksperimenata sa ODQ (t-test).

DISKUSIJA

Rezultati naše studije pokazuju da donori NO, nikorandil, i H₂S, natrijum-hidrogensulfid, poseduju snažan vazorelaksantni efekat na izolovanoj humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji. U ovoj studiji prvi put su pokazane vazodilatatorne osobine natrijum-hidrogensulfida na izolovanoj humanoj veni safeni, dok je jedna od malobrojnih studija koja je ispitala efekat natrijum-hidrogensulfida na unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Takođe, ovo je prva studija koja se bavila mehanizmom vazodilatatornog dejstva nikorandila i natrijum-hidrogensulfida na humanim bajpas graftovima, sa posebnim osvrtom na ulogu različitih tipova K⁺ kanala. Gasoviti signalni molekuli, poput NO i H₂S, regulacijom jonskih kanala, posebno K⁺ kanala, ostvaruju deo svojih uticaja na organizam, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim uslovima (Yu i sar., 2018). Stoga lekovi koji menjaju sintezu/nivo samih gasovityh transmitera ili utiču na njihove signalne puteve predstavljaju atraktivne farmakološke agense.

Takođe, nije moguće posmatrati ove gasovite medijatore kao izolovane entitete sa nezavisnim ulogama, već kao agense koji mogu da potenciraju ili antagonizuju međusobne ćelijske efekte, kako na nivou sinteze, tako i na nivou ciljnih molekula (Cebová i sar., 2016). U našoj studiji je prvi put, koliko nam je poznato iz dostupnih izvora, pokazano postojanje međusobne interakcije NO i H₂S na nivou njihovih efekata na humanu venu safenu i unutrašnju torakalnu arteriju.

VAZODILATATORNI EFEKAT NIKORANDILA, DONORA NO

Procenom efekata nikorandila na arterijskim i venskim graftovima iz prethodnih studija uočava se njihova varijabilnost u zavisnosti od farmakološkog agensa korišćenog za izazivanje kontrakcije. Nikorandil je relaksirao humanu unutrašnju torakalnu arteriju, venu safenu i radijalnu arteriju koje su kontrahovane fenilefrinom, kalijum-hloridom i analogom tromboksana A₂, U46619 (Ding i sar., 2008; Jesuthasan i sar., 2003; Sadaba i sar., 2000; Tanaka i sar., 2004). U našem istraživanju, za kontrahovanje vene safene i unutrašnje torakalne arterije, korišćen je fenilefrin, agonista α_1 -adrenergičkih receptora. Fenilefrin je snažan vazokonstriktor koji može da kontrahuje arterijske i venske graftove čak i u prisustvu endotela (He, 1999). Naši rezultati pokazuju da nikorandil efikasno relaksira fenilefrinom kontrahovane segmenate vene safene i unutrašnje torakalne arterije sa i bez endotela. Nikorandil je izazvao potpunu relaksaciju vene i arterije i njegova potentnost (EC₅₀=0,58 μ M i EC₅₀=1,25 μ M, redom) je slična kao u studiji Dinga i sar. (2008) (EC₅₀=0,48 μ M i EC₅₀=1,95 μ M, redom). Prethodno je pokazano da nikorandil relaksira prstenove vene safene (Jesuthasan i sar., 2003) i torakalne arterije (Tanaka i sar., 2004) kontrahovane tromboksanom A₂, ali da nije postignuta maksimalna relaksacija. Slično, kada je u pitanju vena safena, Jesuthasan i sar. (2003) su pokazali da je nikorandil bio efikasniji ukoliko je kontrakcija izazvana K⁺, u odnosu na U46619. Manja efikasnost relaksacije u uslovima kada je kontrakcija izazvana tromboksanom A₂, barem delimično može biti objašnjena načinom vazokonstrukcije (Tanaka i sar., 2004). Sadaba i sar. (2000) pokazali su da nikorandil relaksira radijalnu arteriju kontrahovanu pomoću 3 različita spazmogena, kao i da efikasno relaksira vazospazam rezistentan na klasične blokatore kalcijumskih kanala.

Naši rezultati takođe pokazuju da se nikorandilom-izazvana relaksacija prstenova vene safene i unutrašnje torakalne arterije bez endotela prekontrahovanih fenilefrinom, ne razlikuje značajno u odnosu na relaksaciju prstenova sa endotelom. To ukazuje da nikorandil poseduje značajan vazorelaksantni efekat na veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji koji je endotel-nezavisan. Osim toga, poređenje osetljivosti vene safene (0,58 μ M i 1,05 μ M) i unutrašnje torakalne arterije (1,25 μ M i 2,09 μ M) sa i bez endotela, pokazuje nešto veću osetljivost vene na dejstvo nikorandila, ali bez statističke značajnosti.

Danas je dobro poznato da nikorandil dovodi do vazorelaksacije dvostrukim mehanizmom dejstva: oslobađanjem NO, slično nitratima, i hiperpolarizacijom preko aktivacije K_{ATP} kanala (Attaran i

sar., 2008; Sadaba i sar., 2000). Pored toga, Zhou i sar. (1995) i Kajioka i sar. (1990) pokazali su da vazorelaksacija indukovana nikorandilom uključuje i aktivaciju K_{Ca} kanala.

U cilju ispitivanja uloge različitih podtipova K^+ kanala u relaksaciji vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvane nikorandilom, koristili smo različite agense koji blokiraju K^+ kanale.

Brojne studije (Davie i sar., 1998; Meisheri i sar., 1991; Ueda i sar., 2005) su ukazale da K_{ATP} kanali posreduju u vazorelaksaciji indukovanoj nikorandilom. Osim toga, pokazano je da je negativni inotropni efekat nikorandila najverovatnije posledica interakcije sa K_{ATP} kanalima (Müller-Ehmsen i sar., 1996). Kako bismo analizirali ulogu ovih kanala u endotel-nezavisnoj relaksaciji vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvane nikorandilom, koristili smo glibenklamid, derivat sulfoniluree, koji u koncentraciji do 10 μ M specifično blokira K_{ATP} kanale (Davie i sar., 1998). U našoj studiji, glibenklamid je delimično inhibirao relaksaciju vene safene izazvanu visokim koncentracijama nikorandila. Prethodno, Cogolludo i sar. (1999) su sugerisali da je, na aorti pacova, doprinos otvaranja K_{ATP} kanala vazorelaksaciji značajniji pri većim koncentracijama nikorandila. Takođe, naši rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim na humanoj umbilikalnoj arteriji (Tiritilli, 2000) i femoralnoj arteriji zeca (Abe i sar., 1994), koji su pokazali da glibenklamid delimično antagonizuje relaksaciju izazvanu nikorandilom. Dodatno, pokazali smo da glibenklamid antagonizuje i relaksaciju unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom. On je inhibirao 71% maksimalne relaksacije ovog krvnog suda, što je u saglasnosti sa rezultatima na mezenteričnim arterijama pacova i svinje (Davie i sar., 1998; Perez-Vizcaino i sar., 1998). Ovi nalazi ukazuju da K_{ATP} kanali jesu uključeni u mehanizam kojim nikorandil dovodi do relaksacije vene safene i unutrašnje torakalne arterije.

Kako bismo ispitali mogućnost da je endotel-nezavisna relaksacija humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije posredovana BK_{Ca} kanalima, testiran je efekat tetraetilamonijuma i iberiotoksina.

Tetraetilmonijum selektivno blokira BK_{Ca} kanale u koncentracijama ispod 1 mM ($K_d = 0,29$ mM) (Wallner i sar., 1999), dok u većim koncentracijama, do 10 mM, može da blokira i druge tipove K^+ kanala. U našoj studiji, tetraetilamonijum (1 mM) korišćen u koncentraciji dovoljnoj da blokira BK_{Ca} kanale, nije uticao na relaksaciju vene safene izazvanu nikorandilom. Suprotno, na arterijskim graftovima, tetraetilamonijum u koncentraciji 1 mM blago je pomerio koncentracijski-zavisnu krivu za nikorandil u desno i povećao EC_{50} vrednost. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Meisheri i sar. (1991) koji su pokazali da je relaksacija izazvana nikorandilom značajno umanjena dodatkom tetraetilamonijuma u koncentracijama ≥ 1 mM.

Kako bismo dalje ispitali mogućnost da su BK_{Ca} kanali uključeni u relaksaciju vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvane nikorandilom, koristili smo iberiotoksin. Iberiotoksin je selektivni blokator BK_{Ca} kanala koji ne blokira SK_{Ca} i IK_{Ca} kanale, niti druge tipove K^+ kanala (Eichhorn i Dobrev, 2007; Ko i sar., 2008). U našoj studiji, iberiotoksin (100 nM) nije poništio relaksaciju humane vene safene izazvanu nikorandilom. Davie i sar. (1998) su takođe pokazali da iberiotoksin nije uticao na nikorandilom-indukovan protok K^+ u izolovanim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. Posledično, izgleda da BK_{Ca} kanali nisu uključeni u relaksaciju vene safene indukovanu nikorandilom. Suprotno, na prstenovima unutrašnje torakalne arterije, iberiotoksin je delimično umanjio nikorandilom-indukovanu relaksaciju, što ukazuje da su BK_{Ca} kanali barem delom uključeni u relaksaciju ovog krvnog suda izazvanu nikorandilom.

Razlike u odgovoru na nikorandil između humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije u situacijama kada se u vodeno kupatilo dodaju različiti blokatori K^+ kanala, kao što su glibenklamid, tetraetilamonijum ili iberiotoksin, ukazuju da je mehanizam vazorelaksantnog efekta nikorandila tkivno-specifičan.

U cilju analize doprinosa K_v kanala relaksaciji vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanoj nikorandilom, koristili smo 4-aminopiridin koji je relativno selektivan za ove kanale u koncentraciji koju smo mi koristili (0,5 mM) (Weckström i sar., 1991). Koncentracija 4-aminopiridina

potrebna za inhibiciju 50% maksimalne aktivnosti K_V kanala u različitim tipovima vaskularnih glatkih mišića, nalazi se u opsegu 0,3-1,1 mM (Gelband i Hume, 1992; Okabe i sar., 1987; Smirnov i Aaronson, 1992). U ovim koncentracijama 4-aminopiridin ne utiče na BK_{Ca} ili K_{ir} kanale (Ko i sar., 2008). Takođe, Kitamura and Kamouchi (1993) su pokazali da 4-aminopiridin u koncentracijama < 1 mM ne utiče na funkciju K_{ATP} kanala. Ove karakteristike su u skladu sa našim eksperimentima u kojima je 4-aminopiridin (0,5 mM) antagonizovao nikorandilom-indukovanu relaksaciju vene safene, ali nije uticao na relaksaciju unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom. Stoga, naši rezultati ukazuju na bitno učešće 4-aminopiridin-senzitivnih K^+ kanala u relaksaciji humane vene safene izazvanoj nikorandilom.

U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama K_V kanali su široko eksprimirani. Na primer, ekspresija $K_V1.5$ kanala pokazana je na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji (Smirnov i sar., 2003), dok su $K_V1.3$ i $K_V1.5$ kanali detektovani u humanoj veni safeni (Bonnet i sar., 2009; Cheong i sar., 2011). Studije pokazuju da $K_V1.3$ kanali učestvuju u proliferaciji humanih vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i da pozitivno utiču na ćelijsku migraciju, što može rezultovati neointimalnom hiperplazijom ili drugim neželjenim posledicama vaskularnog remodelovanja. Fenomen neointimalne hiperplazije je detektovan u različitim situacijama, ali je posebno značajna njegova tendencija da izazove neuspeh bajpas graftova (Cheong i sar., 2011; Jackson, 2010). Kako bismo ispitali da li su $K_V1.3$ kanali uključeni u menahizam vazorelaksantnog dejstva nikorandila na veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji, koristili smo margatoksin. Ovaj peptid je visoko selektivan blokator humanih $K_V1.3$ kanala i nema uticaja na K_{Ca} kanale. Zbog svoje potentnosti i jedinstvene selektivnosti, margatoksin predstavlja posebno korisno sredstvo za ispitivanje uloge $K_V1.3$ kanala (Garcia-Calvo i sar., 1993). U ovoj studiji, margatoksin korišćen u koncentraciji (10 nM) dovoljnoj za blokadu K_V1 kanala, nije uticao na nikorandilom-izazvanu relaksaciju vene safene i unutrašnje torakalne arterije, ukazujući da $K_V1.3$ kanali verovatno nisu deo mehanizma njegovog vazorelaksantnog dejstva na ovim krvnim sudovima.

Kao što je već napomenuto, dvostruki mehanizam dejstva nikorandila uključuje, osim aktivacije K^+ kanala, i povećanje nivoa cGMP-a stimulacijom GC, slično nitratima. Relativni doprinos svakog od ovih mehanizama vazodilatatornog dejstva pokazano je da zavisi od eksperimentalnog protokola i vrste ispitivanih preparata (Perez-Vizcaíno i sar., 1998). U cilju analize uloge cGMP-a u relaksaciji vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanoj nikorandilom, koristili smo ODQ (10 μ M). Prethodno je pokazano da ODQ inhibira NO-stimulisanu aktivnost solubilne GC, a ne utiče na aktivnost ni GC vezane za membranu, ni adenilat ciklaze (Zhao i sar., 2000). S obzirom da se srednja inhibitorna koncentracija (IC_{50} vrednost) za NO-stimulisanu GC nalazi u opsegu 0,2-0,7 μ M, može se očekivati da će ODQ u koncentraciji od 10 μ M postići kompletnu inhibiciju NO-stimulisane aktivnosti ovog enzima (Schrammel i sar., 1996). Naši rezultati pokazuju da je relaksantni efekat nikorandila na veni safeni prekontrahovanoj fenilefrinom značajno inhibiran u prisustvu ODQ (E_{max} smanjen sa $100,0 \pm 2,4\%$ na $29,2 \pm 3,1\%$). Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima Wang i sar. (2012) ukazujući da je aktivacija cGMP puta važan mehanizam kojim nikorandil relaksira venu safenu. Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, ODQ je proizveo delimičnu inhibiciju (E_{max} smanjen sa $100,5 \pm 3,1\%$ na $57,2 \pm 6,3\%$) ukazujući da je cGMP put, makar delimično, uključen u dejstvo nikorandila na ovom krvnom sudu. Razlike u odgovoru humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije na nikorandil mogu biti posledica dobro dokumentovane tkivne-specifičnosti dejstva nikorandila. Istovremeno, poznato je da je vazodilatacija izazvana nitratima dominantna u venskoj cirkulaciji (Mackenzie and Parratt, 1977; Taira, 1989).

S obzirom na pokazanu ulogu različitih podtipova K^+ kanala (K_{ATP} , BK_{Ca} i 4-aminopiridin-senzitivnih kanala) u dejstvu nikorandila na veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji, naš dalji cilj je bio da ispitamo da li ovaj lek otvara kanale direktno ili na cGMP-zavisan način.

K_{ATP} kanali imaju nekoliko fizioloških funkcija i učestvuju u odgovoru na promene metaboličkog stanja u ćeliji, kao i na brojne endogene vazodilatatore koji uglavnom deluju stimulacijom PKA. Funkcionalna modulacija K_{ATP} kanala cGMP-om, prevashodno preko aktivacije

PKG, prvo je pokazana u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Kubo i sar., 1994), a kasnije i u β ćelijama pankreasa (Ropero i sar., 1999), nervnim ćelijama (Chai i Lin, 2008) i kardiomiocitima (Chai i sar., 2011). Za ispitivanje uloge cGMP-a u aktivaciji K_{ATP} kanala na veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji izazvanoj nikorandilom, koristili smo kombinaciju ODQ i glibenklamida. Prethodne studije sa nikorandilom su pokazale da su otvaranje K_{ATP} kanala i stimulacija GC nezavisni putevi koji doprinose relaksaciji izolovanih krvnih sudova (Holzmann i sar., 1992; Meisheri i sar., 1991; Perez-Vizcaíno i sar., 1998). Suprotno, Davie i sar. (1998) su sugerisali moguću uključenost cGMP-a u aktivaciji K_{ATP} kanala dejstvom nikorandila. Naši rezultati pokazuju da nikorandil verovatno ima direktno stimulatorno dejstvo na K_{ATP} kanale glatkih mišićnih ćelija, s obzirom da je glibenklamid dodatno redukovao relaksaciju vene safene i unutrašnje torakalne arterije u prisustvu ODQ. Osim toga, poređenje maksimalnih inhibitornih efekata ($100 - E_{max}$) izazvanih kombinacijom ODQ i glibenklamida na veni (96,0%), sa ukupnim efektima blokatora korišćenim pojedinačno (70,8% i 36,0%, redom), potvrđuje da ova dva puta deluju paralelno. Međutim, kada se isto poređenje uradi na unutrašnjoj torakalnoj arteriji (maksimalna inhibicija relaksacije u prisustvu kombinacije ODQ i glibenklamida je 86,7%, nasuprot 42,8% za ODQ i 70,7% za glibenklamid), rezultat sugerise postojanje određene interakcije. To ukazuje na moguću ulogu cGMP puta u aktivaciji K_{ATP} kanala izazvanoj nikorandilom na unutrašnjoj torakalnoj arteriji.

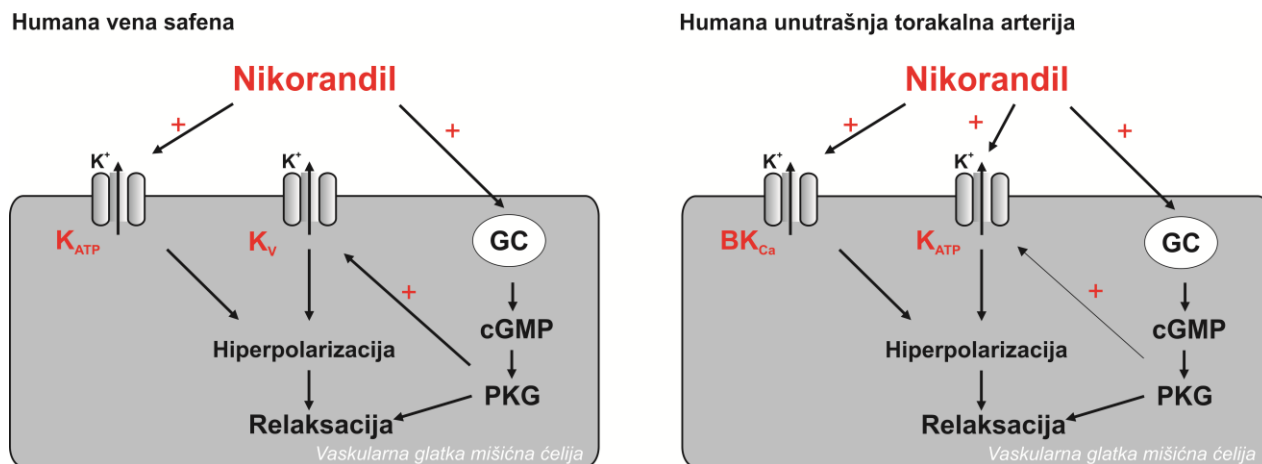
S obzirom da kombinacija ODQ i glibenklamida nije prouzrokovala kompletnu inhibiciju relaksacije unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom, postoji mogućnost postojanja komplementarnog mehanizma dejstva na ovom krvnom sudu. Prethodno izneti rezultati ukazuju da bi to mogla biti aktivacija BK_{Ca} kanala. Kako bismo ispitali mogućnost da nikorandil direktno otvara BK_{Ca} kanale, koristili smo ODQ u kombinaciji sa iberiotoksinom. Kao što je već opisano, BK_{Ca} kanali su, pored primarne aktivacije povećanjem intraćelijskog Ca^{2+} ili depolarizacijom, regulisani dejstvom različitih kinaza, uključujući PKG. Pokazano je da se ovi kanali otvaraju kao posledica aktivacije cGMP/PKG puta dejstvom nitrovazodilatatora ili endogenog NO u različitim krvnim sudovima, kao što su humane koronarne (Bychkov i sar., 1998) i pulmonarne (Zhao i sar., 1997) arterije. Međutim, pokazana je i aktivacija BK_{Ca} kanala nezavisno od cGMP/PKG puta (Bolotina i sar., 1994; Bonaventura i sar., 2007; Wang i sar., 2012), što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Naime, mi smo pokazali da je iberiotoksin dodat u prisustvu ODQ uzrokovao dalje smanjenje relaksacije unutrašnje torakalne arterije (ukupna blokada efekta nikorandila je 80,9%) što je aditivan efekat u poređenju sa efektima pojedinačnih blokatora (iberiotoksina 33,9% plus ODQ 42,8%). Ovi rezultati ukazuju da nikorandil može da otvori BK_{Ca} kanale cGMP-nezavisnim mehanizmom, odnosno da ova dva puta deluju paralelno. U skladu sa ovim rezultatima, na izolovanim glatkim mišićnim ćelijama mezenterične arterije pacova, pokazano je povećanje aktivnosti BK_{Ca} kanala neosetljivo na ODQ (Mistry i Garland, 1998).

K_V kanali predstavljaju glavni podtip K^+ kanala uključen u regulaciju membranskog potencijala mirovanja i koncentracije Ca^{2+} u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Knot i Nelson, 1995; Yuan, 1995). Mogu biti aktivirani posredstvom nekoliko intraćelijskih signalnih puteva (Jackson, 2005). Brojni podaci ukazuju na fiziološku ulogu PKA u aktivaciji K_V kanala, dok su slične studije koje podržavaju ulogu PKG malobrojnije (Cox, 2005). Tako, na primer, Sobey i Faraci (1999) pokazali su da dilataciju bazilarnih arterija izazvanu natrijum-nitroprusidom ili 8-bromo cGMP-om selektivno blokira 4-aminopiridin, ukazujući na ulogu K_V kanala u ovim cGMP-zavisnim efektima. U našem istraživanju, pokazan je značaj 4-aminopiridin-senzitivnih K^+ kanala u relaksaciji humane vene safene izazvane nikorandilom. Kako bismo dalje ispitali mehanizam kojim nikorandil aktivira K_V kanale na veni safeni, ispitali smo efekat nikorandila u prisustvu 4-aminopiridina u kombinaciji sa ODQ. Poređenje efekata ODQ i kombinacije 4-aminopiridina i ODQ, pokazuje da je maksimalni efekat sličan. Osim toga, blokada relaksacije koju daje kombinacija (81,2%) je manja od aditivne blokade uzrokovane pojedinačnim agensima (70,8% ODQ i 56,7% 4-aminopiridin). Ovi rezultati ukazuju na

postojanje interakcije između puteva relaksacije, sugerišući da nikorandil verovatno aktivira K_V kanale cGMP-zavisnim mehanizmom, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim nalazima na humanim umbilikalnim (Cairrão i sar., 2010), pulmonarnim (Zhao i sar., 1997) i bazilarnim arterijama (Sobey i Faraci, 1999).

Analizom proteina K_V kanala prisutnih u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, nađeno je da $K_V1.5$ i $K_V\beta_1$ poseduju mesta za fosforilaciju PKG-om, koja mogu biti odgovorna za aktivaciju K_V kanala ovom kinazom (Cox, 2005). S obzirom da smo pokazali da margatoksin, selektivni blokator $K_V1.3$ kanala ne utiče na relaksaciju vene safene izazvanu nikorandilom, postoji mogućnost da je aktivacija $K_V1.5$ kanala cGMP-zavisnim mehanizmom barem delimično uključena u relaksaciju humane vene safene izazvanu nikorandilom.

U zaključku ovog dela studije možemo reći da smo pokazali da nikorandil izaziva snažnu endotel-nezavisnu relaksaciju humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije kontrahovane fenilefrinom. Izgleda da K_{ATP} kanali i 4-aminopiridin-senzitivni kanali na glatkim mišićnim ćelijama posreduju u relaksaciji vene safene, dok su K_{ATP} i BK_{Ca} kanali verovatno uključeni u relaksaciju unutrašnje torakalne arterije izazvanu nikorandilom. Takođe, pokazali smo da cGMP put ima značajnu ulogu u vazorelaksantnom efektu nikorandila. Nikorandil verovatno direktno otvara K_{ATP} kanale na oba krvna suda i BK_{Ca} kanale na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, mada postoji mogućnost da stimulacija GC doprinosi aktivaciji K_{ATP} na arteriji. Suprotno, aktivacija K_V kanala na veni je najverovatnije posledica aktivacije GC i porasta cGMP-a. Pretpostavljeni mehanizam dejstva nikorandila na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji prikazan je na Slici 21.



Slika 21. Pretpostavljeni mehanizam vazorelaksantnog efekta nikorandila na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji. BK_{Ca} , Ca^{2+} -zavisni K^+ kanali velike provodljivosti; cGMP, ciklični gvanozin-monofosfat; GC, gvanilat ciklaza; K_{ATP} , adenzin-trifosfat (ATP)-senzitivni K^+ kanali; K_V , voltažno-zavisni K^+ kanali; PKG, cGMP-zavisna protein kinaza.

VAZODILATATORNI EFEKAT NATRIJUM-HIDROGENSULFIDA, DONORA H₂S

Nakon što je prva studija koja je istraživala relaksantni efekat H₂S pokazala njegov uticaj na portalnu venu pacova (Hosoki i sar., 1997), kasnija istraživanja su uglavnom bila usmerena na arterije. Takođe, samo je nekoliko studija urađeno na ljudskim krvnim sudovima (Ariyaratnam i sar., 2013; Kutz i sar., 2015; Materazzi i sar., 2017; Webb i sar., 2008). Endotelna zavisnost delovanja natrijum-hidrogensulfida pokazana na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji u našoj studiji u skladu je sa rezultatima dobijenim na mezenteričnim arterijama ljudi i pacova (Jackson-Weaver i sar., 2013; Materazzi i sar., 2017). Naši rezultati takođe pokazuju da nema razlike u osetljivosti vene safene i unutrašnje torakalne arterije na delovanje natrijum-hidrogensulfida i da je na oba krvna suda postignuta potpuna relaksacija fenilefrinske kontrakcije. Sa druge strane, na humanim mezenteričnim arterijama je 71% relaksacije postignuto korišćenjem 10 puta većih koncentracija natrijum-hidrogensulfida (Materazzi i sar., 2017), a na mezenteričnim arterijama pacova 100% relaksacije 30 puta manjim koncentracijama (Jackson-Weaver i sar., 2013). Osim toga, relaksacija humanih pulmonalnih arterija, primenom maksimalne koncentracije (500 µM H₂S), bila je oko 25% manja od efekta slične koncentracije u našoj studiji (Ariyaratnam i sar., 2013). Ovi rezultati ukazuju da efikasnost i potentnost H₂S u različitim studijama varira u zavisnosti od korišćenog krvnog suda, korišćene vrste i od eksperimentalnih uslova. Kao što je prikazano na Slici 11 i kumulativnim krivama odnosa koncentracije i relaksacije, prvi merljivi relaksantni efekat natrijum-hidrogensulfida na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji postiže se u koncentracijama 3-10 µM, a značajna relaksacija nakon primene 30-100 µM. Analizom ljudske plazme pokazano je da se koncentracija H₂S kreće kod zdravih ispitanika u rasponu od 35-80 µM (Chen i sar., 2007; Hyspler i sar., 2002; Jiang i sar., 2005; Li i sar., 2005), dok u septičkom šoku može da poraste do 150 µM (Li i sar., 2005). Stoga, verovatno je da u fiziološkim koncentracijama H₂S može izvršiti merljiv uticaj na vaskularni tonus ovih krvnih sudova.

Kako bi se objasnio vazodilatatorni efekat H₂S, u dosadašnjim studijama su predloženi različiti mehanizmi delovanja. Među njima su otvaranje K⁺ kanala, kao i uticaj na NO/cGMP/PKG signalni put. Podaci iz literature pokazuju suprotstavljene rezultate o interakcijama NO i H₂S. Dok su pojedini autori ukazivali na moguću supresiju vazodilatatornog efekta NO dejstvom H₂S (Ali i sar., 2006; Kubo i sar., 2007), drugi su sugerisali njihov sinergistički efekat (Bucci i sar., 2012; Coletta i sar., 2012; Hosoki i sar., 1997; Wang i sar., 2008). Poslednjih godina se uglavnom H₂S posmatra kao pojačivač vaskularnog NO/cGMP puta na različitim nivoima, o čemu je već bilo reči u uvodu (Szabo, 2017). Nakon sinteze dejstvom eNOS, NO uglavnom difunduje u vaskularne ćelije glatkog mišića i aktivira GC, što rezultuje povećanjem koncentracije cGMP-a. U našem istraživanju, značajna inhibicija relaksacije prstenova vene safene i unutrašnje torakalne arterije u prisustvu L-NAME, odnosno parcijalna inhibicija u prisustvu ODQ, ukazuju da stimulacija sinteze NO, makar delimično, može doprineti efektu natrijum-hidrogensulfida na ovim krvnim sudovima. Slična inhibicija vazorelaksacije u prisustvu L-NAME i ODQ dobijena je na izolovanim humanim mezenteričnim arterijama, u sličnom rasponu koncentracija natrijum-hidrogensulfida (1 µM-1 mM) kao u našem istraživanju (Materazzi i sar., 2017). Takođe, L-NAME je umanjio vazodilataciju kutane mikrocirkulacije izazvanu natrijum-sulfidom kod mladih odraslih osoba (Kutz i sar., 2015). Pored toga, pokazano je da H₂S stimuliše porast koncentracije Ca²⁺ u endotelnim ćelijama humane vene safene, što potencijalno može da aktivira eNOS, i da u kulturi endotelnih ćelija pupčane vene ljudi, H₂S i L-cistein, prekursor H₂S, povećavaju sintezu NO, koja je u prisustvu eNOS i CSE inhibitora bila smanjena (Altaany i sar., 2013; Chen i sar., 2014). Nedavno je pokazano i da na unutrašnjoj torakalnoj arteriji natrijum-hidrogensulfid stimuliše fosforilaciju eNOS na aktivacionom mestu Ser¹¹⁷⁷, kao i da smanjuje nivo PDE5A (Yuan i sar., 2019). Inhibicija aktivnosti PDE5 i posledično smanjenje razgradnje cGMP-a, je još jedan od pretpostavljenih mehanizama koji može doprineti vazorelaksantnom delovanju H₂S. Delimično smanjenje relaksantnog

dejstva natrijum-hidrogensulfida na veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji u prisustvu sildenafilu, selektivnog inhibitora cGMP-specifične PDE5, ukazuje na mogućnost da H₂S na ovim krvnim sudovima deluje kao inhibitor PDE5 dodatno pojačavajući efekte NO/cGMP puta.

Kao što je poznato, povećana koncentracija cGMP-a dovodi do aktivacije PKG i vaskularne relaksacije. U našoj studiji, smanjenje vazorelaksacije izazvane natrijum-hidrogensulfidom u prisustvu KT5823, selektivnog inhibitora PKG, ukazuje da PKG služi kao nishodni efektor vazodilatatornog delovanja H₂S na veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim izveštajima da je relaksacija aorte miša/pacova dejstvom H₂S bila umanjena pomoću DT-2, PKG1 inhibitora (Bucci i sar., 2012; Coletta i sar., 2012). Takođe, vazodilatatorni efekti natrijum-hidrogensulfida i L-cisteina su bili smanjeni kod PKG1 nokaut miševa (Bucci i sar., 2012). Uzimajući sve ovo u obzir, izgleda da aktiviranje celokupnog NO/cGMP/PKG signalnog puta barem delimično posreduje u relaksaciji humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanoj H₂S donorem, natrijum-hidrogensulfidom. Pored toga, značaj NO signalnog puta zabeležen je i u angiogenom (Coletta i sar., 2012) i kardioprotektivnom dejstvu H₂S (King i sar., 2014; Sojitra i sar., 2012).

K_V, K_{ATP} i K_{Ca} kanali predstavljaju osnovne podtipove K⁺ kanala u vaskulaturi. Endotelna zavisnost delovanja natrijum-hidrogensulfida na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji usmerila nas je prvo da ispitamo ulogu endotelnih SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala u njegovom vazorelaksantnom efektu na ovim krvnim sudovima. Aktivacija ova dva tipa K⁺ kanala dovodi do hiperpolarizacije endotelnih ćelija, koja se dalje može preneti na susedne glatke mišićne ćelije, ali i favorizovati ulazak Ca²⁺ u endotelne ćelije što doprinosi aktivaciji Ca²⁺-zavisnih enzima, kao što je eNOS (Félétou, 2016). Stoga, SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali igraju značajnu ulogu u stvaranju endotel-zavisne hiperpolarizacije, ali i u proizvodnji NO i drugih relaksantnih faktora iz endotela. Nedavna ispitivanja pokazala su da u nekim vaskularnim koritima H₂S može biti endotel-zavisni hiperpolarizujući faktor (Cheng i sar., 2004; Mustafa i sar., 2011; Tang i sar., 2013). Iako se smatra da je njegova uloga važnija u arterijama otpora u poređenju sa sprovodnim arterijama (Tang i sar., 2013), izgleda da postoji zavisnost efekta od vrste koja se koristi. Tako, na primer, kombinacija blokatora SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala umanjuje vazorelaksantni efekat H₂S na mezenteričnim arterijama miševa i pacova, ali ne i na mezenteričnim arterijama ljudi (Cheng i sar., 2004; Materazzi i sar., 2017; Mustafa i sar., 2011). U našoj studiji, istovremena primena apamina i TRAM-34, selektivnih blokatora SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala, značajno je inhibirala relaksaciju vene safene izazvanu natrijum-hidrogensulfidom, što sugerise relevantnu ulogu ovih kanala u njegovom delovanju na humani venski graft. Pored toga, pokazali smo da apamin i TRAM-34 uzrokuju dalje smanjenje relaksacije vene safene nakon inhibicije sinteze i oslobađanja NO/prostaciklina ili sinteze cGMP-a (Tabela 17). To ukazuje da natrijum-hidrogensulfid aktivira SK_{Ca} i IK_{Ca} kanale, verovatno rezultirajući kako proizvodnjom vazoaktivnih faktora iz endotela, tako i endotel-zavisnom hiperpolarizacijom. U skladu s našim nalazima je i podatak da je samo TRAM-34 inhibirao hiperpolarizaciju humanih endotelnih ćelija posredovanu H₂S-om, dok su iberiotoksin i glibenklamid, blokatori BK_{Ca} i K_{ATP} kanala, bili bez efekta (Mustafa i sar., 2011). S druge strane, pokazali smo da SK_{Ca} i IK_{Ca} kanali imaju ulogu i u efektu natrijum-hidrogensulfida na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, ali u manjoj meri nego na veni. Dodatna ispitivanja u prisustvu inhibicije sinteze NO/prostaciklina ili cGMP-a pokazuju dalju blokadu relaksantnog efekta natrijum-hidrogensulfida dodatkom apamin/TRAM-34 kombinacije koja se čini aditivnom u odnosu na efekte pojedinačno primenjenih blokatora/kombinacija blokatora (Tabela 18). Ovi rezultati ukazuju da na unutrašnjoj torakalnoj arteriji natrijum-hidrogensulfid otvara endotelne SK_{Ca} i IK_{Ca} kanale, ali da to ne doprinosi (ili doprinosi u maloj meri) aktivaciji NO signalnog puta.

Tabela 17. Uloga NO/cGMP puta u dejstvu natrijum-hidrogensulfida na K⁺ kanale u humanoj veni safeni – poređenje maksimalnih inhibitornih efekata pojedinačnih blokatora i njihovih kombinacija.

Podtip K ⁺ kanala	Blokator/kombinacija blokatora	Inhibitorski efekat pojedinačnih blokatora/kombinacija blokatora na relaksaciju indukovanu NaHS-om (%)	Zbir pojedinačnih efekata (%)	Inhibitorski efekat kombinacije (%)	Napomena
SK _{Ca} /IK _{Ca}	L-NAME/Indo/HCA	74,1	147,4	94,8	interakcija
	Apa/TRAM	73,3			
	ODQ	47,7	121,0	79,3	
	Apa/TRAM	73,3			
BK _{Ca}	L-NAME/Indo/HCA	74,9	108,7	98,1	paralelni/ nezavisni putevi
	Iberiotoksin	33,8			
	ODQ	47,3	81,1	70,5	
	Iberiotoksin	33,8			
K _{ATP}	L-NAME/Indo/HCA	75,9	105,1	99,1	paralelni/ nezavisni putevi
	Glibenklamid	29,2			
	ODQ	48,9	78,1	77,0	
	Glibenklamid	29,2			

Efekat = E_{max} (kontrolna) – E_{max} (blokator/kombinacija blokatora); NaHS, natrijum-hidrogensulfid; Indo, indometacin; HCA, hidroskobalamin.

Za razliku od SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala, koji su primarno lokalizovani u endotelnim ćelijama, BK_{Ca} kanali se uglavnom nalaze na vaskularnim ćelijama glatkih mišića gde je pokazano da su uključeni u vazorelaksaciju indukovanu sa dva gasotransmitera, NO-om i CO-om (Hu i Zhang, 2012). Naši rezultati sa iberiotoksinom, kao selektivnim inhibitorom ovih kanala, ukazuju da BK_{Ca} kanali značajno doprinose relaksantnom efektu natrijum-hidrogensulfida na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, dok na veni safeni dolazi do otvaranja ovih kanala samo primenom visokih koncentracija natrijum-hidrogensulfida. S obzirom da postoji verovatnoća indirektno aktivacije BK_{Ca} kanala usled sekundarne stimulacije NO puta (Archer i sar., 1994), čiji je značaj pokazan u delovanju natrijum-hidrogensulfida na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji, urađeni su dodatni eksperimenti kako bi se ta mogućnost ispitala. Međutim, dalji inhibitorski efekat iberiotoksina na relaksaciju vene safene, pokazan nakon blokade sinteze NO/prostaciklina ili cGMP-a, nije potvrdio ovu mogućnost (Tabela 17). Dobijeni rezultat sugeriše postojanje direktne interakcije H₂S sa BK_{Ca} kanalima na ovom krvnom sudu, koja se verovatno događa modulacijom redoks statusa kritičnih sulfhidrilnih grupa (Sitdikova i sar., 2010), ali je njen značaj pokazan samo u visokim koncentracijama H₂S. Suprotno ovome, na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, dodatak iberiotoksina u prisustvu inhibitora sinteze NO/prostaciklina nije doveo do dalje blokade relaksacije izazvane natrijum-hidrogensulfidom. Osim toga, inhibitorski efekat iberiotoksina u kombinaciji sa ODQ bio je manji u poređenju sa zbirom njihovih pojedinačnih inhibitorskih efekata (Tabela 18), što ukazuje na postojanje interakcije ovih puteva relaksacije. Naši rezultati pokazuju da na unutrašnjoj torakalnoj arteriji natrijum-hidrogensulfid otvara BK_{Ca} kanale indirektno posredstvom NO/cGMP-signalnog puta.

Navedene razlike u mehanizmu relaksantnog delovanja natrijum-hidrogensulfida na humanom arterijskom i venskom graftu ukazuju da delovanje ovog donora H₂S pokazuje značajnu tkivnu specifičnost.

Tabela 18. Uloga NO/cGMP puta u dejstvu natrijum-hidrogensulfida na K⁺ kanale u humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji – poređenje maksimalnih inhibitorynih efekata pojedinačnih blokatora i njihovih kombinacija.

Podtip K ⁺ kanala	Blokator/ kombinacija blokatora	Inhibitoryni efekat pojedinačnih blokatora/ kombinacija blokatora na relaksaciju indukovanu NaHS-om (%)	Zbir pojedinačnih efekata (%)	Efekat kombinacije (%)	Napomena
SK _{Ca} /IK _{Ca}	L-NAME/Indo/HCA	78,5	116,5	99,7	nezavisni putevi
	Apa/TRAM	38,0			
	ODQ	30,5	68,5	62,7	
	Apa/TRAM	38,0			
BK _{Ca}	L-NAME/Indo/HCA	77,3	159,4	83,3	indirektno (NO i cGMP- zavisno) dejstvo
	Iberiotoksin	82,1			
	ODQ	30,0	112,1	63,3	
	Iberiotoksin	82,1			
K _{ATP}	L-NAME/Indo/HCA	75,4	162,7	97,5	direktno plus indirektno (NO i cGMP- zavisno) dejstvo
	Glibenklamid	87,3			
	ODQ	31,4	118,7	94,3	
	Glibenklamid	87,3			
K _V	L-NAME/Indo/HCA	79,1	160,8	84,5	indirektno (NO i cGMP- zavisno) dejstvo
	4-aminopiridin	81,7			
	ODQ	31,6	113,3	75,0	
	4-aminopiridin	81,7			
K _{V1.3}	L-NAME/Indo/HCA	79,8	156,6	76,1	indirektno (NO i cGMP- zavisno) dejstvo
	Margatoksin	76,8			
	ODQ	30,6	107,4	68,5	
	Margatoksin	76,8			

$E_{\text{efekat}} = E_{\text{max}} (\text{kontrolna}) - E_{\text{max}} (\text{blokator/kombinacija blokatora})$; NaHS, natrijum-hidrogensulfid; Indo, indometacin; HCA, hidrosokobalamin.

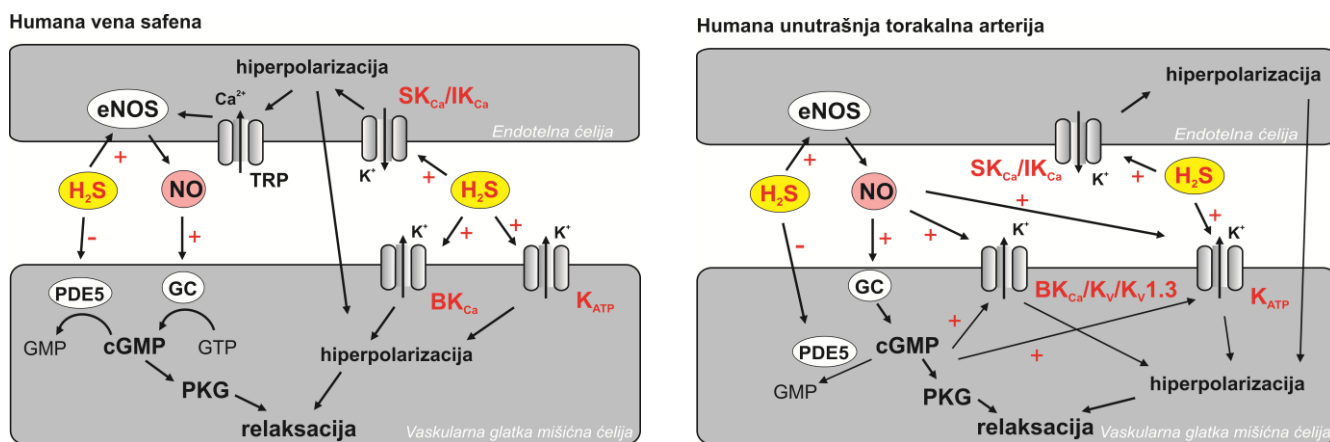
U prethodnim studijama koje su ispitivale H₂S, K_{ATP} kanali su bili najčešće prepoznati kao specifičan cilj njegovog dejstva. Uloga K_{ATP} kanala u vazorelaksaciji prvi put je pokazana na aorti pacova (Zhao i sar., 2001), a nakon toga u drugim krvnim sudovima, kao što su mezenterične arterije pacova (Cheng i sar., 2004), aorta miša (Al-Magableh i Hart, 2011), humana unutrašnja torakalna arterija (Webb i sar., 2008) i humane mezenterične arterije (Materazzi i sar., 2017). Naši rezultati na unutrašnjoj torakalnoj arteriji pokazuju značajnu ulogu K_{ATP} kanala u delovanju natrijum-hidrogensulfida i u skladu su sa prethodno navedenim istraživanjima. Sa druge strane, postoje studije u kojima je glibenklamid, kao selektivni inhibitor K_{ATP} kanala, samo delimično inhibirao ili nije imao uticaja na relaksaciju izazvanu H₂S-om (Kiss i sar., 2008; Martelli i sar., 2013). To je u skladu sa našim rezultatima na veni safeni koji pokazuju da natrijum-hidrogensulfid verovatno aktivira K_{ATP} kanale u izolovanim prstenovima ovog krvnog suda, ali da istovremeno, to doprinosi vazorelaksaciji samo kada se primene visoke koncentracije natrijum-hidrogensulfida. Dobijeni rezultati na humanom arterijskom i venskom graftu još jednom naglašavaju postojanje varijabilne uključenosti K_{ATP} kanala u vazorelaksantnom delovanju H₂S na različitim vaskularnim tkivima.

S obzirom da je u prethodnim istraživanjima pokazano postojanje funkcionalne modulacije K_{ATP} kanala cGMP-signalnim mehanizmom (Kubo i sar., 1994), testirali smo mogućnost indirektno aktivacije K_{ATP} kanala u našim eksperimentalnim uslovima. Međutim, primena glibenklamida, u uslovima inhibicije sinteze NO/prostaciklina ili cGMP-a, je uzrokovala dodatno smanjenje relaksacije humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije, što ukazuje da natrijum-hidrogensulfid verovatno može delovati direktno stimulatивно na K_{ATP} kanale ovih krvnih sudova. Na veni safeni je ovako postignuta ukupna blokada relaksacije bila slična zbiru pojedinačnih inhibitornih efekata glibenklamida i kombinacije L-NAME/indometacin/hidroksokobalamin, odnosno ODQ (Tabela 17). To ukazuje da su ovi putevi nezavisni, odnosno da na veni safeni, natrijum-hidrogensulfid u visokim koncentracijama verovatno direktno otvara K_{ATP} kanale što delom doprinosi njegovom relaksantnom dejstvu. S druge strane, pokazani doprinos K_{ATP} kanala na unutrašnjoj torakalnoj arteriji je značajno veći u odnosu na venu safenu. Pored toga, inhibitorni efekat istovremene primene glibenklamida i kombinacije L-NAME/indometacin/hidroksokobalamin, odnosno ODQ, manji je od zbira njihovih pojedinačnih efekata što ukazuje na međusobnu interakciju puteva (Tabela 18). Ovi rezultati upućuju da je aktivacija K_{ATP} kanala izazvana natrijum-hidrogensulfidom na unutrašnjoj torakalnoj arteriji posledica kako direktne aktivacije kanala, tako i indirektnog dejstva posredstvom NO, moguće delimično cGMP-zavisnim mehanizmom.

Još jedan podtip K^+ kanala, čiji je značaj u posredovanju vazodilatatorne aktivnosti H_2S sugerisan u izvesnom broju studija, jeste K_V (Al-Magableh i Hart, 2011; Cheang i sar., 2010). U našem istraživanju, primena 4-aminopiridina u koncentraciji (0,5 mM) koja može da blokira K_V kanale, ali bez uticaja na BK_{Ca} , K_{ATP} ili Kir kanale (Gelband i Hume, 1992; Okabe i sar., 1987, 1990; Quayle i sar., 1993; Smirnov i Aaronson, 1992), nije značajno uticala na vazorelaksaciju humane vene safene prouzrokovanu natrijum-hidrogensulfidom. Ovaj rezultat isključuje mogućnost da 4-aminopiridin-senzitivni K_V kanali posreduju u vaskularnim efektima H_2S na ovom krvnom sudu, što je u skladu sa rezultatima studija na aorti pacova (Martelli i sar., 2013; Zhao i sar., 2001). Ipak, još jedna potvrda tkivno-specifičnog dejstva H_2S jeste i rezultat dobijen na preparatima unutrašnje torakalne arterije koji pokazuje značajnu ulogu 4-aminopiridin-senzitivnih K_V kanala u relaksaciji ovog krvnog suda. Kako bismo dalje ispitali koji podtip K_V kanala je uključen u efekat natrijum-hidrogensulfida na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, koristili smo margatoksin. Inicijalno izolovan iz otrova škorpije *Centruroides margaritatus*, ovaj toksin predstavlja potentan i selektivan blokator $K_V1.3$ kanala (Garcia-Calvo i sar., 1993). Naši rezultati pokazuju da je margatoksin blokirao relaksaciju unutrašnje torakalne arterije skoro jednako kao 4-aminopiridin, ukazujući da je aktivacija $K_V1.3$ kanala verovatno deo mehanizma dejstva natrijum-hidrogensulfida na ovom krvnom sudu. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja ukazuje na potencijalni značaj $K_V1.3$ kanala u delovanju H_2S na nivou vaskularnog tkiva.

Dalja ispitivanja su rađena u cilju potvrde da li je aktivacija 4-aminopiridin-senzitivnih, odnosno $K_V1.3$ kanala rezultat direktne aktivacije H_2S -om ili indirektna posledica stimulacije NO/cGMP puta. U uslovima inhibirane sinteze i oslobađanja NO/prostaciklina, 4-aminopiridin i margatoksin nisu doveli do dalje blokade relaksantnog delovanja natrijum-hidrogensulfida, ukazujući na izostanak direktnog otvaranja 4-aminopiridin-senzitivnih i $K_V1.3$ kanala H_2S -om. Dalje, inhibitorni efekat 4-aminopiridina ili margatoksina u kombinaciji sa ODQ u oba slučaja pokazuje manju vrednost u odnosu na zbir inhibitornih efekata pojedinačno korišćenih blokatora (Tabela 18), što ukazuje na postojanje interakcije ovih puteva. Stoga, mehanizam vazorelaksantnog efekta natrijum-hidrogensulfida na unutrašnjoj torakalnoj arteriji verovatno uključuje indirektnu aktivaciju 4-aminopiridin-senzitivnih, verovatno podtip $K_V1.3$ kanala putem NO, a delimično i cGMP-zavisnim mehanizmom.

U zaključku drugog dela studije možemo reći da H_2S donor, natrijum-hidrogensulfid, dovodi do koncentracijski-zavisne relaksacije humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije koja je zavisna od endotela. Mehanizam vazorelaksantnog efekta uključuje interakciju sa NO signalnim putem, kao i otvaranje različitih podtipova K^+ kanala. Značaj aktivacije SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala pokazan je na oba krvna suda. Relaksacija unutrašnje torakalne arterije dodatno uključuje i otvaranje K_{ATP} , BK_{Ca} , 4-aminopiridin-senzitivnih K_V (podtip $K_V1.3$) kanala, dok je značaj K_{ATP} i BK_{Ca} kanala na veni safeni pokazan samo u visokim koncentracijama natrijum-hidrogensulfida. Osim toga, pokazali smo da je aktivacija K^+ kanala na veni safeni rezultat direktne interakcije natrijum-hidrogensulfida sa kanalima. S druge strane, na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, otvaranje K_{ATP} kanala uključuje i direktno i indirektno dejstvo, posredstvom NO/cGMP puta, dok je aktivacija BK_{Ca} i 4-aminopiridin-senzitivnih K_V (podtip $K_V1.3$) kanala verovatno u potpunosti posledica stimulacije NO/cGMP signalnog puta. Pretpostavljeni mehanizam dejstva natrijum-hidrogensulfida na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji prikazan je na Slici 22.



Slika 22. Pretpostavljeni mehanizam vazorelaksantnog efekta natrijum-hidrogensulfida na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji. BK_{Ca} , Ca^{2+} -zavisni K^+ kanali velike provodljivosti; cGMP, ciklični gvanozin-monofosfat; eNOS, endotelna azot monoksid sintaza; GC, gvanilat ciklaza; GMP, gvanozin-monofosfat; GTP, gvanozin-trifosfat; H_2S , vodonik-sulfid; IK_{Ca} , Ca^{2+} -zavisni K^+ kanali srednje provodljivosti; K_{ATP} , adozin-trifosfat (ATP)-senzitivni K^+ kanali; K_V , voltažno-zavisni K^+ kanali; NO, azot monoksid; PDE5, fosfodiesteraza 5; PKG, cGMP-zavisna protein kinaza; SK_{Ca} , Ca^{2+} -zavisni K^+ kanali male provodljivosti; TRP, TRP (engl. *transient receptor potential*) kanal.

OSNOVNE RAZLIKE U VAZODILATORNOM DEJSTVU DONORA NO I H₂S NA HUMANOJ VENI SAFENI I UNUTRAŠNJOJ TORAKANOJ ARTERIJI

Svi prethodno izneti rezultati ukazuju da postoje bitne razlike u delovanju donora dva važna gasotransmitera: NO (nikorandila) i H₂S (natrijum-hidrogensulfida), na izolovane humane bajpas grafove, kao i da ovi gasotransmiteri na nivou kardiovaskularnog sistema nisu nezavisni, već da su njihovi efekti međusobno uslovljeni.

Dok je pokazani vazorelaksantni efekat nikorandila endotel-nezavisan, delovanje natrijum-hidrogensulfida zavisi u velikoj meri od prisustva endotelnih ćelija, delom jer mehanizam dejstva ovog donora H₂S na veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji verovatno uključuje stimulaciju sinteze endogenog NO.

I nikorandil i natrijum-hidrogensulfid su efikasno i potpuno relaksirali oba krvna suda prekontrahovana fenilefrinom. Međutim, rezultati ukazuju da su humana vena safena i unutrašnja torakalna arterija značajno osetljivije na delovanje nikorandila u odnosu na natrijum-hidrogensulfid, dok ne postoje značajne razlike u osetljivosti između ova dva krvna suda na pojedinačne agense (osetljivost vene safene na nikorandil je veća u odnosu na unutrašnju torakalnu arteriju, moguće zbog veće osetljivosti venskih krvnih sudova na nitrovazodilatatore, ali bez postignute statističke značajnosti).

Kalijumovi kanali doprinose relaksantnom dejstvu i nikorandila i natrijum-hidrogensulfida, s tim da postoje razlike u podtipovima K⁺ kanala i njihovom relativnom značaju (Tabela 19) i to:

1) između krvnih sudova u dejstvu pojedinačnih donora, što ukazuje na izraženu tkivnu specifičnost dejstva ovih vazodilatatora;

2) između ispitivanih vazodilatatora na istom krvnom sudu, što ukazuje na različite mehanizme njihovog delovanja.

Tabela 19. Efekat različitih blokatora K⁺ kanala na relaksaciju izolovane humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije uzrokovanu nikorandilom i natrijum-hidrogensulfidom i verovatni tip interakcije sa K⁺ kanalima.

Podtip K ⁺ kanala	Blokator/kombinacija blokatora	Nikorandil		Natrijum-hidrogensulfid	
		Humana vena safena	Humana unutrašnja torakalna arterija	Humana vena safena	Humana unutrašnja torakalna arterija
K _{ATP}	glibenklamid	+(D)	++(D/Ind)	-(↓E _{max} ; D)	++(D/Ind)
K _{Ca}	tetraetilamonijum	-	+	/	/
	iberiotoksin	-	+(D)	-(↓E _{max} ; D)	++(Ind)
K _V	4-aminopiridin	++(Ind)	-	-	++(Ind)
K _V 1.3	margatoksin	-	-	-	++(Ind)
SK _{Ca} /IK _{Ca}	apamin/TRAM-34	/	/	++(D)	+(D)

++, značajnost $p < 0,01$; +, značajnost $p < 0,05$; -, značajnost $p > 0,05$; ↓E_{max}, značajan uticaj samo na maksimalnu relaksaciju; /, nije ispitivan; D, direktno otvaranje kanala; Ind, indirektno otvaranje kanala.

Nalazi naše studije mogu ukazati na nove terapijske ciljeve u lečenju spazma arterijskih i venskih bajpas graftova, i potencijalno dati farmakološku osnovu za razvoj novih vazodilatatornih lekova. Vazospazam bajpas graftova je problem koji je odavno prepoznat (Jones i sar., 1989; Sarabu i sar., 1987). Određeni antispastički protokoli su klinički razvijeni tokom prethodnih decenija (Ding i sar., 2008; Formica i sar., 2006; He, 1999; He i sar., 1989, 1994, 2000; He i Yang, 1995, 1996; Sanders i Newman, 2005; Zabeeda i sar., 2001), ali uprkos tome, spazam se i dalje javlja u kliničkim uslovima. U svetlu kompleksnih mehanizama koji leže u osnovi spazma, mehaničke, fizičke i farmakološke prirode, prevencija i reverzija spazma i dalje predstavljaju izazov, a određene istraživačke grupe kontinuirano rade na pronalaženju najbolje metode za njegovo prevazilaženje i ispituju antispastički potencijal različitih vazodilatatornih agenasa.

Ograničenje naše studije svakako predstavljaju *in vitro* uslovi i ispitivanje vazodilatatornog dejstva na graftovima prekontrahovanim samo jednim agensom. Takođe, u rezultatima je verovatno reflektovana činjenica da nisu korišćeni krvni sudovi zdravih osoba, već pacijenata sa ishemijskom bolešću srca sa prisutnim brojnim kardiovaskularnim faktorima rizika, ali u ovom slučaju to bi rezultatima moglo dati i potencijalno veći klinički značaj.

ZAKLJUČCI

U zaključku naše studije i iznetog farmakološkog ispitivanja efekata NO donora, nikorandila, i H₂S donora, natrijum-hidrogensulfida, na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji, a na osnovu dobijenih rezultata, možemo reći da:

1. Nikorandil i natrijum-hidrogensulfid prouzrokuju koncentracijski-zavisnu relaksaciju izolovane humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije prekontrahovane fenilefrinom.
2. Nikorandil izaziva endotel-nezavisnu, a natrijum-hidrogensulfid endotel-zavisnu relaksaciju oba krvna suda.
3. Mehanizam endotel-nezavisne relaksacije izazvane nikorandilom uključuje stimulaciju GC i aktivaciju cGMP puta na oba krvna suda, kao i otvaranje različitih podtipova K⁺ kanala.
4. Na veni safeni, nikorandil verovatno direktno otvara K_{ATP} kanale i indirektno K_V kanale, kao rezultat porasta cGMP-a, što doprinosi njegovom relaksantnom efektu. Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, nikorandil verovatno direktno otvara K_{ATP} i BK_{Ca} kanale, mada postoji mogućnost da stimulacija GC doprinosi aktivaciji K_{ATP} kanala na ovom krvnom sudu.
5. Mehanizam endotel-zavisne relaksacije izazvane natrijum-hidrogensulfidom uključuje, na oba krvna suda, pojačanje NO/cGMP signalnog puta.
6. Na humanoj veni safeni, vazorelaksantnom efektu natrijum-hidrogensulfida doprinosi aktivacija SK_{Ca} i IK_{Ca} kanala i u visokim koncentracijama aktivacija K_{ATP} i BK_{Ca} kanala, verovatno kao posledica direktnog dejstva H₂S. Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, natrijum-hidrogensulfid dodatno direktno aktivira SK_{Ca} i IK_{Ca} kanale i delom K_{ATP} kanale, dok je aktivacija BK_{Ca}, K_V (podtip K_V1.3) i delom K_{ATP} kanala, verovatno rezultat stimulacije NO/cGMP signalnog puta.

LITERATURA

- Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996;16:1066–71.
- Abe S, Nishimura J, Nakamura M, Kanaide H. Effects of nicorandil on cytosolic calcium concentrations and on tension development in the rabbit femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Feb;268(2):762-71.
- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C, Cohen RA. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*. 2004;10(11):1200-7.
- Akata T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *J Anesth*. 2007;21(2):220-31.
- 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. (2019) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. *Br J Pharmacol*. 176 Issue S1: S142-228.
- Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol*. 2006;149:625-34.
- Alioua A, Mahajan A, Nishimaru K, Zarei MM, Stefani E, Toro L. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14560-5.
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32950-6.
- Al-Magableh MR, Hart JL. Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2011;383(4):403-13.
- Altaany Z, Ju Y, Yang G, Wang R. The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Sci Signal*. 2014;7(342):ra87.
- Altaany Z, Yang G, Wang R. Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *J Cell Mol Med* 2013;17:879-88.
- Ammendola A, Geiselhoring A, Hofmann F, Schlossmann J. Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I. *J Biol Chem*. 2001;276:24153–9.
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7583-7.
- Ariyaratnam P, Loubani M, Morice AH. Hydrogen sulphide vasodilates human pulmonary arteries: a possible role in pulmonary hypertension? *Microvasc Res*. 2013;90:135-7.
- Armstead WM. Role of ATP-sensitive K⁺ channels in cGMP-mediated pial artery vasodilation. *Am J Physiol*. 1996;270(2 Pt 2):H423-6.

- Asano M, Nomura Y, Ito K, Uyama Y, Imaizumi Y, Watanabe M. Increased function of voltage-dependent Ca^{++} channels and Ca^{++} -activated K^{+} channels in resting state of femoral arteries from spontaneously hypertensive rats at prehypertensive stage. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:775-83.
- Attaran S, John L, El-Gamel A. Clinical and potential use of pharmacological agents to reduce radial artery spasm in coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg*. 2008;85(4):1483-9.
- Bai XY, Liu XC, Jing WB, Yang Q, Tang XD, He GW. Effect of amlodipine in human internal mammary artery and clinical implications. *Ann Thorac Surg*. 2010;90:1952–7.
- Bauer CC, Boyle JP, Porter KE, Peers C. Modulation of Ca^{2+} signalling in human vascular endothelial cells by hydrogen sulfide. *Atherosclerosis*. 2010;209(2):374-80.
- Bayliss DA, Czirják G, Enyedi P, Goldstein SA, Lesage F, Minor, Jr. DL, Plant LD, Sepúlveda F, Winn BT. Two P domain potassium channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2019; 2019(4). Available from: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F79/2019.4>.
- Beltowski J, Jamroz-Wisniewska A. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules* 2014;19:21183-21199.
- Berwick ZC, Payne GA, Lynch B, Dick GM, Sturek M, Tune JD. Contribution of adenosine A(2A) and A(2B) receptors to ischemic coronary dilation: role of K(V) and K(ATP) channels. *Microcirculation*. 2010;17(8):600-7.
- Beuve A, Brouckaert P, Burnett, Jr. JC, Friebe A, Garthwaite J, Hobbs AJ, Koesling D, Kuhn M, Potter LR, Russwurm M, Schmidt HH, Stasch JP, Waldman SA. Receptor guanylyl cyclase (RGC) family (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2019; 2019(4). Available from: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F1022/2019.4>.
- Biancari F, Tiozzo V. Staples versus sutures for closing leg wounds after vein graft harvesting for coronary artery bypass surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(5):CD008057.
- Billiar TR, Cirino G, Fulton D, Motterlini R, Papapetropoulos A, Szabo C. Nitric oxide synthases (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2019a; 2019(4). Available from: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F253/2019.4>.
- Billiar TR, Cirino G, Fulton D, Motterlini R, Papapetropoulos A, Szabo C. Hydrogen sulphide synthesis (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2019b; 2019(4). Available from: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F279/2019.4>.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994;368:850-3.
- Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Derwand R, de Wit C, Loirand G, Pohl U. Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation*. 2003;107(24):3081-7.
- Bonaventura D, de Lima RG, Vercesi JA, da Silva RS, Bendhack LM. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. *Vascul Pharmacol*. 2007;46:215-22.

- Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, Dromparis P, Roy M, Watson KO, Nagendran J, Haromy A, Dyck JR, Michelakis ED. Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodelling through the inhibition of the akt/gsk3- β /nfat axis. *Circulation*. 2009;120(13):1231-40.
- Brähler S, Kaistha A, Schmidt VJ, Wöfle SE, Busch C, Kaistha BP, Kacik M, Hasenau AL, Grgic I, Si H, Bond CT, Adelman JP, Wulff H, de Wit C, Hoyer J, Köhler R. Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation*. 2009;119(17):2323-32.
- Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Zaid A, Giannogonas P, Cantalupo A, Dhayade S, Karalis KP, Wang R, Feil R, Cirino G. cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS One*. 2012;7(12):e53319.
- Bychkov R, Gollasch M, Steinke T, Ried C, Luft FC, Haller H. Calcium-activated potassium channels and nitrate-induced vasodilation in human coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285(1):293-8.
- Cairrão E, Santos-Silva AJ, Verde I. PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Eur J Pharmacol*. 2010;640:94-101.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*. 2000;184(3):409-20.
- Cebová M, Košútová M, Pecháňová O. Cardiovascular effects of gasotransmitter donors. *Physiol Res*. 2016;65(Suppl. 3):S291-S307.
- Chadha PS, Jepps TA, Carr G, Stott JB, Zhu HL, Cole WC, Greenwood IA. Contribution of Kv7.4/Kv7.5 heteromers to intrinsic and calcitonin gene-related peptide-induced cerebral reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(4):887-93.
- Chadha PS, Zunke F, Zhu HL, Davis AJ, Jepps TA, Olesen SP, Cole WC, Moffatt JD, Greenwood IA. Reduced KCNQ4-encoded voltage-dependent potassium channel activity underlies impaired β -adrenoceptor-mediated relaxation of renal arteries in hypertension. *Hypertension*. 2012;59(4):877-84.
- Chai Y, Lin YF. Dual regulation of the ATP-sensitive potassium channel by activation of cGMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch*. 2008;456:897-915.
- Chai Y, Zhang DM, Lin YF. Activation of cGMP-dependent protein kinase stimulates cardiac ATP-sensitive potassium channels via a ROS/calmodulin/CaMKII signaling cascade. *PLoS ONE*. 2011;6:e18191.
- Cheang WS, Wong WT, Shen B, Lau CW, Tian XY, Tsang SY, Yao X, Chen ZY, Huang Y. 4-aminopyridine-sensitive K⁺ channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery. *Vascul Pharmacol*. 2010;53:94-8.
- Chen J, Crossland RF, Noorani MM, Marrelli SP. Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(1):H417-24.
- Chen L, Ingrid S, Ding YG, Liu Y, Qi JG, Tang CS, DU JB. Imbalance of endogenous homocysteine and hydrogen sulfide metabolic pathway in essential hypertensive children. *Chin Med J (Engl)* 2007;120:389-93.
- Chen PH, Fu YS, Wang YM, Yang KH, Wang DL, Huang B. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production and subsequent S-nitrosylation in endothelial cells. *Scientific World Journal* 2014;2014:480387.

- Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(5):H2316-23.
- 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 $K_v1.3$ channel blockers. *Cardiovasc Res*. 2011;89(2):282-9.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*. 1998;31(2):643-648.
- Clément-Chomienne O, Walsh MP, Cole WC. Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K^+ current in rabbit vascular myocytes. *J Physiol*. 1996;495(Pt 3):689-700.
- Cogolludo AL, Perez-Vizcaino F, Fajardo S, Ibarra M, Tamargo J. Effects of nicorandil as compared to mixtures of sodium nitroprusside and levromakalim in isolated rat aorta. *Br J Pharmacol*. 1999;126(4):1025-33.
- Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of store-operated Ca^{2+} influx. *Circ Res*. 1999;84(2):210-9.
- Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, Asimakopoulou A, Gerö D, Sharina I, Martin E, Szabo C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(23):9161-6.
- Cook NS. Effect of some potassium channel blockers on contractile responses of the rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13(2):299-306.
- Cooper CE, Brown GC. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(5):533-9.
- Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1991;40(6):923-31.
- Cox RH. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys*. 2005;42(2):167-95.
- Daaka Y. S-nitrosylation-regulated GPCR signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(6):743-51.
- Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Münzel T, Li H. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(1). pii:E187.
- Davie CS, Kubo M, Standen NB. Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*. 1998;125(8):1715-25.
- Dick GM, Bratz IN, Borbouse L, Payne GA, Dincer UD, Knudson JD, Rogers PA, Tune JD. Voltage-dependent K^+ channels regulate the duration of reactive hyperemia in the canine coronary circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(5):H2371-81.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999 ;399(6736):601-5.

- Ding R, Feng W, Li H, Wang L, Li D, Cheng Z, Guo J, Hu D. A comparative study on in vitro and in vivo effects of topical vasodilators in human internal mammary, radial artery and great saphenous vein. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34(3):536-41.
- Dong H, Waldron GJ, Cole WC, Triggle CR. Roles of calcium-activated and voltage-gated delayed rectifier potassium channels in endothelium-dependent vasorelaxation of the rabbit middle cerebral artery. *Br J Pharmacol*. 1998;123(5):821-32.
- Dongó E, Beliczai-Marosi G, Dybvig AS, Kiss L. The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric Oxide*. 2018;81:75-87.
- Dou D, Zheng X, Ying L, Ye L, Gao Y. Sulfhydryl-dependent dimerization and cGMP-mediated vasodilatation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;62(1):1-5.
- Doughty JM, Plane F, Langton PD. Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am J Physiol*. 1999;276(3):H1107-12.
- Eberhardt M, Dux M, Namer B, Miljkovic J, Cordasic N, Will C, Kichko TI, de la Roche J, Fischer M, Suárez SA, Bikiel D, Dorsch K, Leffler A, Babes A, Lampert A, Lennerz JK, Jacobi J, Martí MA, Doctorovich F, Högestätt ED, Zygmunt PM, Ivanovic-Burmazovic I, Messlinger K, Reeh P, Filipovic MR. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun*. 2014;5:4381.
- Eichhorn B, Dobrev D. Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007;376:145-55.
- Emdin CA, Khera AV, Klarin D, Natarajan P, Zekavat SM, Nomura A, Haas M, Aragam K, Ardissino D, Wilson JG, Schunkert H, McPherson R, Watkins H, Elosua R, Bown MJ, Samani NJ, Baber U, Erdmann J, Gormley P, Palotie A, Stitzel NO, Gupta N, Danesh J, Saleheen D, Gabriel S, Kathiresan S. Phenotypic Consequences of a Genetic Predisposition to Enhanced Nitric Oxide Signaling. *Circulation*. 2018;137(3):222-32.
- European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Assessment report. Ikorel and associated names. Dancor and associated names. INN of the active substance: nicorandil. 26 March 2015. EMA/238211/2015
- Féletou M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016;67(5):373-87.
- Fernández-Fernández JM, Tomás M, Vázquez E, Orio P, Latorre R, Sentí M, Marrugat J, Valverde MA. Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *J Clin Invest*. 2004;113(7):1032-9.
- Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R. Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem Rev*. 2018;118(3):1253-337.
- Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(1):R1-12.
- Formica F, Ferro O, Brustia M, Corti F, Colagrande L, Bosisio E, Paolini G. Effects of papaverine and glycerylnitrate-verapamil solution as topical and intraluminal vasodilators for internal thoracic artery. *Ann Thorac Surg*. 2006;81:120-4.
- Förstermann U, Mügge A, Alheid U, Haverich A, Frölich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res*. 1988;62(2):185-90.

- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 837a-837d.
- Foster MN, Coetzee WA. K_{ATP} Channels in the Cardiovascular System. *Physiol Rev*. 2016;96(1):177-252.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):525-63.
- Friebe A, Koesling D. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. *Nitric Oxide*. 2009;21(3-4):149-56.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
- Furchgott RF. Nobel Lecture. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2020. Accessed on Fri. 3 Jan 2020. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/furchgott/lecture/>
- Gao G, Liu XC, Jing WB, Yang Q, He GW. Vasorelaxation induced by new third-generation dihydropyridine calcium antagonist azelnidipine in human internal mammary artery. *Ann Thorac Surg*. 2013;96:1316–21.
- Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem*. 1993;268(25):18866-74.
- Gayet JL, Paganelli F, Cohen-Solal A. Update on the medical treatment of stable angina. *Arch Cardiovasc Dis*. 2011;104:536-44.
- Gelband CH, Hume JR. Ionic currents in single smooth muscle cells of the canine renal artery. *Circ Res*. 1992;71(4):745-58.
- Gheibi S, Jeddi S, Kashfi K, Ghasemi A. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochem Pharmacol*. 2018;149:42-59.
- Giuffrè A, Vicente JB. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:6290931.
- Gomez I, Ozen G, Deschildre C, Amgoud Y, Boubaya L, Gorenne I, Benyahia C, Roger T, Lesèche G, Galardon E, Topal G, Jacob MP, Longrois D, Norel X. Reverse regulatory pathway (H₂S / PGE₂ / MMP) in human aortic aneurysm and saphenous vein varicosity. *PLoS One*. 2016;11:e0158421.
- Goto K, Kitazono T. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Diabetes: Mechanistic Insights and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15). pii: E3737.
- Goto K, Ohtsubo T, Kitazono T. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Hypertension: The Role of Endothelial Ion Channels. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1). pii: E315.
- Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2009;157(4):509-26.
- Gunneth CA, Lund DD, McDowell AK, Faraci FM, Heistad DD. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1617-22.

- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):473-508.
- Gutterman DD, Chabowski DS, Kadlec AO, Durand MJ, Freed JK, Ait-Aissa K, Beyer AM. The Human Microcirculation: Regulation of Flow and Beyond. *Circ Res.* 2016;118(1):157-72.
- Hara Y, Kitamura K, Kuriyama H. Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1980;68(1):99-106.
- He GW, Buxton BF, Rosenfeldt FL, Angus JA, Tatoulis J. Pharmacologic dilatation of the internal mammary artery during coronary bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;107:1440-4.
- He GW, Fan KY, Chiu SW, Chow WH. Injection of vasodilators into arterial grafts through cardiac catheter to relieve spasm. *Ann Thorac Surg* 2000;69:625-8.
- He GW, Rosenfeldt FL, Buxton BF, Angus JA. Reactivity of human isolated internal mammary artery to constrictor and dilator agents. Implications for treatment of internal mammary artery spasm. *Circulation* 1989;80:I141-50.
- He GW, Yang CQ, Starr A. Overview of the nature of vasoconstriction in arterial grafts for coronary operations. *Ann Thorac Surg.* 1995;59(3):676-83.
- He GW, Yang CQ. Comparison among arterial grafts and coronary artery. An attempt at functional classification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:707-15.
- He GW, Yang CQ. Use of verapamil and nitroglycerin solution in preparation of radial artery for coronary grafting. *Ann Thorac Surg* 1996;61:610-4.
- He GW. Arterial grafts for coronary artery bypass grafting: biological characteristics, functional classification, and clinical choice. *Ann Thorac Surg.* 1999;67(1):277-84.
- Hedegaard ER, Goulliaev A, Winther AK, Arcanjo DD, Aalling M, Renaltan NS, Wood ME, Whiteman M, Skovgaard N, Simonsen U. Involvement of Potassium Channels and Calcium-Independent Mechanisms in Hydrogen Sulfide-Induced Relaxation of Rat Mesenteric Small Arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;356(1):53-63.
- Hedegaard ER, Nielsen BD, Kun A, Hughes AD, Krøigaard C, Mogensen S, Matchkov VV, Frøbert O, Simonsen U. Kv7 channels are involved in hypoxia-induced vasodilatation of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol.* 2014;171(1):69-82.
- Hein TW, Xu W, Kuo L. Dilation of retinal arterioles in response to lactate: role of nitric oxide, guanylyl cyclase, and ATP-sensitive potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(2):693-9.
- Higashi Y, Oshima T, Ozono R, Matsuura H, Kambe M, Kajiyama G. Effect of L-arginine infusion on systemic and renal hemodynamics in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 1999;12(1 Pt 1):8-15.
- Hodnett BL, Xiang L, Dearman JA, Carter CB, Hester RL. K(ATP)-mediated vasodilation is impaired in obese Zucker rats. *Microcirculation.* 2008;15(6):485-94.
- Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P. cGMP Regulated Protein Kinases (cGK). In: Schmidt H.H.H.W, Hofmann F, Stasch JP (eds). *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Handbook of Experimental Pharmacology* 191. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009, 137-62.

- Holzmann S, Kukovetz WR, Braida C, Pösch G. Pharmacological interaction experiments differentiate between glibenclamide-sensitive K^+ channels and cyclic GMP as components of vasodilation by nicorandil. *Eur J Pharmacol.* 1992;215:1-7.
- Horinaka S. Use of nicorandil in cardiovascular disease and its optimization. *Drugs.* 2011;71:1105-19.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237:527-31.
- Hou HT, Wang J, Wang ZQ, Liu XC, Marinko M, Novakovic A, Yang Q, He GW. Effect of benidipine in human internal mammary artery and clinical implications. *Ann Thorac Surg.* 2016;101(5):1789-95.
- Hu XQ, Zhang L. Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today.* 2012;17(17-18):974-87.
- Hyspler R, Tichá A, Indrová M, Zadák Z, Hysplerová L, Gasparic J, Churáček J. A simple, optimized method for the determination of sulphide in whole blood by GC-MS as a marker of bowel fermentation processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;770:255-9.
- Irat AM, Aslamaci S, Karasu C, Ari N. Alteration of vascular reactivity in diabetic human mammary artery and the effects of thiazolidinediones. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(12):1647-53.
- Jackson WF. $K_v1.3$: a new therapeutic target to control vascular smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(6):1073-4.
- Jackson WF. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Adv Pharmacol.* 2017;78:89–144.
- Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation.* 2005;12(1):113-27.
- Jackson-Weaver O, Osmond JM, Riddle MA, Naik JS, Gonzalez Bosc LV, Walker BR, Kanagy NL. Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels and smooth muscle Ca^{2+} sparks. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304(11):H1446-54.
- Jain SK, Bull R, Rains JL, Bass PF, Levine SN, Reddy S, McVie R, Bocchini JA. Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(11):1333-7.
- Jenkinson DH. Potassium channels--multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol.* 2006;147 (Suppl 1):S63-71.
- Jepps TA. Unravelling the complexities of vascular smooth muscle ion channels: Fine tuning of activity by ancillary subunits. *Pharmacol Ther.* 2017;178:57-66.
- Jesuthasan B, Angus JA, Rosenfeldt FL. In vitro comparison of glyceryl trinitrate-verapamil with other dilators of human saphenous vein. *ANZ J Surg.* 2003;73(5):313-20.
- Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H_2S -induced activation of K_{ATP} channels. *Antioxid Redox Signal.* 2010 May 15;12(10):1167-78.
- Jiang HL, Wu HC, Li ZL, Geng B, Tang CS. Changes of the new gaseous transmitter H_2S in patients with coronary heart disease. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2005;25(8):951-4.
- Jones EL, Lattouf OM, Weintraub WS. Catastrophic consequences of internal mammary artery hypoperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;98:902–7.

- Kajioka S, Oike M, Kitamura K. Nicorandil opens a calcium-dependent potassium channel in smooth muscle cells of the rat portal vein. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;254(3):905-13.
- Kanagy NL, Szabo C, Papapetropoulos A. Vascular biology of hydrogen sulfide. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017;312(5):C537-49.
- Kane GC, Liu XK, Yamada S, Olson TM, Terzic A. Cardiac K_{ATP} channels in health and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38(6):937-43.
- Keef KD, Hume JR, Zhong J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca^{2+} channels ($Ca(V)1.2a,b$) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281(6):C1743-56.
- Kenny LC, Baker PN, Kendall DA, Randall MD, Dunn WR. Differential mechanisms of endothelium-dependent vasodilator responses in human myometrial small arteries in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond).* 2002;103(1):67-73.
- King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, Bradley JM, Islam KN, Calvert JW, Tao YX, Dugas TR, Kelley EE, Elrod JW, Huang PL, Wang R, Lefler DJ. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(8):3182-7.
- Kiss L, Deitch EA, Szabó C. Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. *Life Sci.* 2008;83(17-18):589-94.
- Kitamura K, Kamouchi M. K channel openers activate different K channels in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1993;7:539-46.
- Knot HJ, Nelson MT. Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K^+ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1995;269:H348-55.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994;298 (Pt 2):249-58.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008;44(2):65-81.
- Kobayashi J. Radial artery as a graft for coronary artery bypass grafting. *Circ J.* 2009;73:1178–83.
- Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickinson DA, Patel RP, Darley-Usmar VM, Lancaster JR Jr, Doeller JE, Kraus DW. Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O_2 -dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(4):H1953-60.
- Koesling D, Russwurm M, Mergia E. Regulation and Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase. In: Ignarro LJ, Freeman BA (eds). *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. Third Edition. Academic Press; 2017, 107-16. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128042731000089>
- Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1994;269(12):8701-7.
- Kubo M, Nakaya Y, Matsuoka S, Saito K, Kuroda Y. Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K^+ channels in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74(3):471-6.
- Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Nishikawa H, Kawabata A. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology* 2007;232:138-46.

- Kutz JL, Greaney JL, Santhanam L, Alexander LM. Evidence for a functional vasodilatory role for hydrogen sulphide in the human cutaneous microvasculature. *J Physiol*. 2015;593:2121-9.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1201-9.
- Lange A, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder D. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1997;272(43):27345-52.
- Leclerc PC, Lanctot PM, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *Br J Pharmacol*. 2006;148(3):306-13.
- 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 J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4843-8.
- Lee SW, Cheng Y, Moore PK, Bian JS. Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(4):1142-7.
- Leo MD, Bannister JP, Narayanan D, Nair A, Grubbs JE, Gabrick KS, Boop FA, Jaggar JH. Dynamic regulation of $\beta 1$ subunit trafficking controls vascular contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(6):2361-6.
- Li H, Chai Q, Gutterman DD, Liu Y. Elevated glucose impairs cAMP-mediated dilation by reducing Kv channel activity in rat small coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(3):H1213-9.
- Li J, Zhou Z, Jiang DJ, Li D, Tan B, Liu H, Li YJ. Reduction of NO- and EDHF-mediated vasodilatation in hypertension: role of asymmetric dimethylarginine. *Clin Exp Hypertens*. 2007;29(7):489-501.
- Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* 2005;19:1196-8.
- Li Q, Youn JY, Cai H. Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *J Hypertens*. 2015;33(6):1128-36.
- Liang GH, Xi Q, Leffler CW, Jaggar JH. Hydrogen sulfide activates Ca^{2+} sparks to induce cerebral arteriole dilatation. *J Physiol*. 2012;590(11):2709-20.
- Liu Y, Xie A, Singh AK, Ehsan A, Choudhary G, Dudley S, Sellke FW, Feng J. Inactivation of Endothelial Small/Intermediate Conductance of Calcium-Activated Potassium Channels Contributes to Coronary Arteriolar Dysfunction in Diabetic Patients. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(8):e002062.
- Lovren F, Triggle C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol*. 2000;131(3):521-9.

- Lytle BW, Blackstone EH, Sabik JF, Houghtaling P, Loop FD, Cosgrove DM. The effect of bilateral internal thoracic artery grafting on survival during 20 postoperative years. *Ann Thorac Surg* 2004;78:2005–12.
- Mackenzie JE, Parratt JR. Comparative effects of glyceryl trinitrate on venous and arterial smooth muscle in vitro; relevance to antianginal activity. *Br J Pharmacol*. 1977;60:155-160.
- Mandala M, Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT. Effect of endogenous and exogenous nitric oxide on calcium sparks as targets for vasodilation in rat cerebral artery. *Nitric Oxide*. 2007;16(1):104-9.
- Mani S, Li H, Untereiner A, Wu L, Yang G, Austin RC, Dickhout JG, Lhoták Š, Meng QH, Wang R. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(25):2523-34.
- Martelli A, Testai L, Breschi MC, Lawson K, McKay NG, Miceli F, Tagliatalata M, Calderone V. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacol Res*. 2013;70:27-34.
- Mason RP, Cockcroft JR. Targeting nitric oxide with drug therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8(12 Suppl 4):40-52.
- Materazzi S, Zagli G, Nassini R, Bartolini I, Romagnoli S, Chelazzi C, Benemei S, Coratti A, De Gaudio AR, Patacchini R. Vasodilator activity of hydrogen sulfide (H₂S) in human mesenteric arteries. *Microvasc Res*. 2017;109:38-44.
- McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cGMP signaling. *Adv Pharmacol*. 1995;34:263-75.
- Meisheri KD, Cipkus-Dubray LA, Hosner JM, Khan SA. Nicorandil-induced vasorelaxation: functional evidence for K⁺ channel-dependent and cyclic GMP- dependent components in a single vascular preparation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;17(6):903-12.
- Melikian N, Seddon MD, Casadei B, Chowienczyk PJ, Shah AM. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19(8):256-62.
- Meng J, Ganesan Adaikan P, Srilatha B. Hydrogen sulfide promotes nitric oxide production in corpus cavernosum by enhancing expression of endothelial nitric oxide synthase. *Int J Impot Res*. 2013;25(3):86-90.
- MHRA (The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. Nicorandil 10mg and 20mg Tablets - PL 33155/0001 and PL 33155/0003. 18 November 2010. (<https://products.mhra.gov.uk/?search=PL%2033155%2F0001&page=1>)
- Mikami Y, Shibuya N, Ogasawara Y, Kimura H. Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ -lyase at the steady-state low intracellular Ca(2+) concentrations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431(2):131-5.
- Miller AW, Tulbert C, Puskar M, Busija DW. Enhanced endothelin activity prevents vasodilation to insulin in insulin resistance. *Hypertension*. 2002;40(1):78-82.
- Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK_{Ca}) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1998;124:1131-40.
- Mistry DK, Garland CJ. The influence of phenylephrine outward potassium currents in single smooth muscle cells from the rabbit mesenteric artery. *Gen Pharmacol*. 1999;33(5):389-99.

- Miura H, Wachtel RE, Loberiza FR Jr, Saito T, Miura M, Nicolosi AC, Gutterman DD. Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res.* 2003;92:151-8.
- Miyoshi H, Nakaya Y, Moritoki H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1994;345(1):47-9.
- Moncada S, Palmer RM, Gryglewski RJ. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(23):9164-8.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42.
- Mondéjar-Parreño G, Moral-Sanz J, Barreira B, De la Cruz A, Gonzalez T, Callejo M, Esquivel-Ruiz S, Morales-Cano D, Moreno L, Valenzuela C, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A. Activation of Kv7 channels as a novel mechanism for NO/cGMP-induced pulmonary vasodilation. *Br J Pharmacol.* 2019;176(13):2131-2145.
- Moss MB, Brunini TM, Soares De Moura R, Novaes Malagris LE, Roberts NB, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2004;107(4):391-7.
- Müller-Ehmsen J, Brixius K, Hoischen S, Schwinger RH. Inotropic and coronary vasodilatory actions of the K-adenosine triphosphate channel modulator nicorandil in human tissue. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;279(3):1220-8.
- Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med.* 2006;355(19):2003-11.
- Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol.* 1995;486 (Pt 1):47-58.
- Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R, Amzel LM, Berkowitz DE, Snyder SH. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res.* 2011;109:1259-68.
- Nagahara N. Regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase activity via intrasubunit and intersubunit redox-sensing switches. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(15):1792-802.
- Naik JS, Osmond JM, Walker BR, Kanagy NL. Hydrogen sulfide-induced vasodilation mediated by endothelial TRPV4 channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;311(6):H1437-44.
- Nara M, Dhulipala PD, Ji GJ, Kamasani UR, Wang YX, Matalon S, Kotlikoff MI. Guanylyl cyclase stimulatory coupling to K_{Ca} channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(6):C1938-45.
- Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2):33-65.
- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;268(4 Pt 1):C799-822.
- 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(1):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(1).
- Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, Suematsu M, Kurose H, van der Vliet A, Freeman BA, Shibata T, Uchida K, Kumagai Y, Akaike T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol*. 2012;8(8):714–24.
- Nishida M, Toyama T, Akaike T. Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:10-7.
- Nishijima Y, Cao S, Chabowski DS, Korishettar A, Ge A, Zheng X, Sparapani R, Gutterman DD, Zhang DX. Contribution of K_v1.5 Channel to Hydrogen Peroxide-Induced Human Arteriolar Dilation and Its Modulation by Coronary Artery Disease. *Circ Res*. 2017;120(4):658-69.
- Nishijima Y, Korishettar A, Chabowski DS, Cao S, Zheng X, Gutterman DD, Zhang DX. Shaker-related voltage-gated K⁺ channel expression and vasomotor function in human coronary resistance arteries. *Microcirculation*. 2018;25(1).
- Okabe K, Kajioaka S, Nakao K, Kitamura K, Kuriyama H, Weston AH. Actions of cromakalim on ionic currents recorded from single smooth muscle cells of the rat portal vein. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;252:832-9.
- Okabe K, Kitamura K, Kuriyama H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. *Pflugers Arch*. 1987;409(6):561-8.
- Olas B. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clin Chim Acta*. 2015;439:212-8.
- Olson TM, Terzic A. Human K_{ATP} channelopathies: diseases of metabolic homeostasis. *Pflugers Arch* 2010;460:295–306.
- Ozkor MA, Murrow JR, Rahman AM, Kavtaradze N, Lin J, Manatunga A, Quyyumi AA. Endothelium-derived hyperpolarizing factor determines resting and stimulated forearm vasodilator tone in health and in disease. *Circulation*. 2011;123(20):2244-53.
- Paisley AN, Izzard AS, Gemmell I, Cruickshank K, Trainer PJ, Heagerty AM. Small vessel remodeling and impaired endothelial-dependent dilatation in subcutaneous resistance arteries from patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1111-7.
- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*. 1993;87(5):1468-74.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990;323(1):22-7.
- Peng J, Tang ZH, Ren Z, He B, Zeng Y, Liu LS, Wang Z, Wei DH, Zheng XL, Jiang ZS. TET2 Protects against oxLDL-induced HUVEC dysfunction by upregulating the CSE/H₂S system. *Front Pharmacol*. 2017;8:486.
- Perez-Vizcaíno F, Cogolludo AL, Villamor E, Tamargo J. Role of K⁺ channel opening and stimulation of cyclic GMP in the vasorelaxant effects of nicorandil in isolated piglet pulmonary and mesenteric arteries: relative efficacy and interactions between both pathways. *Br J Pharmacol*. 1998;123:847-54.

- Polhemus DJ, Lefer DJ. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2014;114(4):730-7.
- Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 1993;265:C1363-70.
- Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev.* 1997;77(4):1165-232.
- Quinn KV, Giblin JP, Tinker A. Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channel. *Circ Res.* 2004;94(10):1359-66.
- Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang and Dale's Pharmacology. 8th edition. London: Churchill Livingstone Elsevier; 2016.
- Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 1):C299-303.
- Ropero AB, Fuentes E, Rovira JM, Ripoll C, Soria B, Nadal A. Non-genomic actions of 17β-oestradiol in mouse pancreatic β-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol.* 1999;521:397-407.
- Rose P, Moore PK, Zhu YZ. H₂S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(8):1391-412.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986;250(5 Pt 2):H822-7.
- Sadaba JR, Mathew K, Munsch CM, Beech DJ. Vasorelaxant properties of nicorandil on human radial artery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000;17(3):319–24.
- Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Yanagida M, Tamura M, Kobayashi T, Yasuda H, Gross SS, Levi R. NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circ Res.* 1992;70(3):607-11.
- Sanders LH, Newman MA. Intractable postoperative internal thoracic artery spasm managed with angiographic intraluminal papaverine. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130:938–40.
- Sarabu MR, McClung JA, Fass A, Reed GE. Early postoperative spasm in left internal mammary artery bypass grafts. *Ann Thorac Surg.* 1987;44:199–200.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21722-9.
- Schoeffter P, Dion R, Godfraind T. Modulatory role of the vascular endothelium in the contractility of human isolated internal mammary artery. *Br J Pharmacol.* 1988;95(2):531-43.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 1996;50:1-5.
- Schwarz PM, Kleinert H, Förstermann U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(11):2584-90.

- Shi Y, Wu Z, Cui N, Shi W, Yang Y, Zhang X, Rojas A, Ha BT, Jiang C. PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular K_{ATP} channel activation by beta-adrenergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(3):R1205-14.
- Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Commun*. 2013;4:1366.
- Sitdikova GF, Weiger TM, Hermann A. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflugers Arch*. 2010;459(3):389-97.
- Smirnov SV, Aaronson PI. Ca²⁺-activated and voltage-gated K⁺ currents in smooth muscle cells isolated from human mesenteric arteries. *J Physiol*. 1992;457:431-54.
- Smirnov SV, Tammaro P, Hutchings SR, Smith AL. Role of voltage-gated K⁺ (K_v) channels in vascular function. *Neurophysiology*. 2003;35(3/4):262-75.
- Sobey CG, Faraci FM. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1999;126:1437-43.
- Sojitra B, Bulani Y, Putcha UK, Kanwal A, Gupta P, Kuncha M, Banerjee SK. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide induced cardioprotection in mice. *Mol Cell Biochem*. 2012;360:61–9.
- Sokolova O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure*. 2001;9(3):215-20.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(1):444-8.
- Stott JB, Barrese V, Jepps TA, Leighton EV, Greenwood IA. Contribution of K_v7 channels to natriuretic peptide mediated vasodilation in normal and hypertensive rats. *Hypertension*. 2015;65(3):676-82.
- Sun NL, Xi Y, Yang SN, Ma Z, Tang CS. [Plasma hydrogen sulfide and homocysteine levels in hypertensive patients with different blood pressure levels and complications]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2007;35(12):1145-8.
- Sun X, Kaltenbronn KM, Steinberg TH, Blumer KJ. RGS2 is a mediator of nitric oxide action on blood pressure and vasoconstrictor signaling. *Mol Pharmacol*. 2005;67(3):631-9.
- Sun Y, Huang Y, Zhang R, Chen Q, Chen J, Zong Y, Liu J, Feng S, Liu AD, Holmberg L, Liu D, Tang C, Du J, Jin H. Hydrogen sulfide upregulates K_{ATP} channel expression in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(4):439-55.
- Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T, Zhu YC. Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2008;79(4):632-41.
- Sung DJ, Noh HJ, Kim JG, Park SW, Kim B, Cho H, Bae YM. Serotonin contracts the rat mesenteric artery by inhibiting 4-aminopyridine-sensitive K_v channels via the 5-HT_{2A} receptor and Src tyrosine kinase. *Exp Mol Med*. 2013;45:e67.

- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . *Science*. 1999;286(5444):1583-7.
- Szabo C, Papapetropoulos A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev*. 2017;69(4):497-564.
- Szabo C. A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem Pharmacol*. 2018;149:5-19.
- Szabo C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;312:C3-15.
- Taira N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators. *Am J Cardiol*. 1989;63:18J-24J.
- Takahashi N, Kozai D, Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol*. 2012;3:324.
- Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori MX, Honda A, Inoue R. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *J Physiol*. 2008;586(17):4209-23.
- Tanaka KA, Szlam F, Katori N, Tsuda A, Levy JH. In vitro effects of antihypertensive drugs on thromboxane agonist (U46619)-induced vasoconstriction in human internal mammary artery. *Br J Anaesth*. 2004;93(2):257-62.
- Tanaka Y, Tang G, Takizawa K, Otsuka K, Eghbali M, Song M, Nishimaru K, Shigenobu K, Koike K, Stefani E, Toro L. K_v channels contribute to nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317:341-54.
- Tang G, Yang G, Jiang B, Ju Y, Wu L, Wang R. H₂S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(14):1634-46.
- Telezhkin V, Brazier SP, Cayzac S, Muller CT, Riccardi D, Kemp PJ. Hydrogen sulfide inhibits human BK_{Ca} channels. *Adv Exp Med Biol*. 2009;648:65-72.
- Tewari K, Simard JM. Sodium nitroprusside and cGMP decrease Ca²⁺ channel availability in basilar artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch*. 1997;433(3):304-11.
- Thatte HS, Khuri SF. The coronary artery bypass conduit: Intraoperative endothelial injury and its implication on graft patency. *Ann Thorac Surg*. 2001;72(6):2245-52.
- The Nobel Prize organization. Summary. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Accessed on Thu. 18 Jul 2019. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/press-release/>
- Tian XY, Wong WT, Sayed N, Luo J, Tsang SY, Bian ZX, Lu Y, Cheang WS, Yao X, Chen ZY, Huang Y. NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of l-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel. *Pharmacol Res*. 2012;65(2):239-46.
- Tinker A, Aziz Q, Thomas A. The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2014;171(1):12-23.
- Tiritilli A. Guanylate cyclase and not ATP-dependent K⁺ channels seems temperature-dependent in smooth muscle relaxation of human umbilical arteries. *Eur J Pharmacol*. 2000;406(1):79-84.

- Treasure CB, Klein JL, Vita JA, Manoukian SV, Renwick GH, Selwyn AP, Ganz P, Alexander RW. Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation*. 1993;87(1):86-93.
- Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T, Reimann F, Ashcroft FM. Molecular determinants of K_{ATP} channel inhibition by ATP. *EMBO J*. 1998;17(12):3290-6.
- 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.
- Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Sumino S, Kato A, Sugimoto T. Phasic contractions of canine and human coronary arteries induced by potassium channel blockers. *Jpn Heart J*. 1986;27(5):727-40.
- Ueda K, Goto C, Jitsuiki D, Umemura T, Nishioka K, Kimura M, Noma K, Nakagawa K, Oshima T, Yoshizumi M, Chayama K, Higashi Y. The nicorandil-induced vasodilation in humans is inhibited by miconazole. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;45(4):290-4.
- Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 1990;81(2):491-7.
- Wallner M, Meera P, Toro L. Calcium-activated potassium channels in muscle and brain. In: Kurachi Y, Jan LY, Lazdunski M, eds. *Current topics in membrane, Volume 46: Potassium ion channels, molecular structure, function, and diseases*. San Diego: Academic Press, 1999:117-35.
- Wang MJ, Cai WJ, Zhu YC. Hydrogen sulphide in cardiovascular system: A cascade from interaction between sulphur atoms and signalling molecules. *Life Sci*. 2016;153:188-97.
- Wang W, Feng SJ, Li H, Zhang XD, Wang SX. Correlation of Lower Concentrations of Hydrogen Sulfide with Activation of Protein Kinase $C\beta$ II in Uremic Accelerated Atherosclerosis Patients. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(11):1465-70.
- Wang X, Wu J, Li L, Chen F, Wang R, Jiang C. Hypercapnic acidosis activates K_{ATP} channels in vascular smooth muscles. *Circ Res*. 2003;92(11):1225-32.
- Wang YF, Mainali P, Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yan H, Liu XQ, DU JB. Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:420-3.
- Wang ZQ, Xu JF, Wang JP, Zhao WJ, Zeng M. Involvement of guanylate cyclase and K^+ channels in relaxation evoked by ferulate nitrate in rat aorta artery. *J Pharmacol Sci*. 2012;118:521-30.
- Webb GD, Lim LH, Oh VM, Yeo SB, Cheong YP, Ali MY, El Oakley R, Lee CN, Wong PS, Caleb MG, Salto-Tellez M, Bhatia M, Chan ES, Taylor EA, Moore PK. Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324:876-82.
- Weckström M, Hardie RC, Laughlin SB. Voltage-activated potassium channels in blowfly photoreceptors and their role in light adaptation. *J Physiol*. 1991;440:635-57.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):463-72.
- Weil BR, Stauffer BL, Greiner JJ, DeSouza CA. Prehypertension is associated with impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent vasodilation in sedentary adults. *Am J Hypertens*. 2011;24(9):976-81.

- Whalen EJ, Foster MW, Matsumoto A, Ozawa K, Violin JD, Que LG, Nelson CD, Benhar M, Keys JR, Rockman HA, Koch WJ, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Stamler JS. Regulation of β -Adrenergic Receptor Signaling by S-Nitrosylation of G-Protein-Coupled Receptor Kinase 2. *Cell*. 2007;129:511-22.
- White BJ, Smith PA, Dunn WR. Hydrogen sulphide-mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. *Br J Pharmacol*. 2013;168(4):785-93.
- WHO (World Health Organization). Cardiovascular Diseases. Last modified on 17/05/2017. Accessed on 15/08/2019. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Wiecha J, Schlager B, Voisard R, Hannekum A, Mattfeldt T, Hombach V. Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human smooth muscle cells of coronary atherosclerotic plaques and coronary media segments. *Basic Res Cardiol*. 1997;92:233-9.
- Wu D, Hu Q, Zhu Y. Therapeutic application of hydrogen sulfide donors: the potential and challenges. *Front Med*. 2016;10(1):18-27.
- Wu L, Cao K, Lu Y, Wang R. Different mechanisms underlying the stimulation of K_{Ca} channels by nitric oxide and carbon monoxide. *J Clin Invest*. 2002;110:691-700.
- Xia C, Bao Z, Yue C, Sanborn BM, Liu M. Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 2001;276(23):19770-7.
- Yan H, Du J, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004;313(1):22-7.
- Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008;322(5901):587-90.
- Yang Q, Yu CM, He GW, Underwood MJ. Protection of coronary endothelial function during cardiac surgery: potential of targeting endothelial ion channels in cardioprotection. *Biomed Res Int*. 2014;2014:324364.
- Yu W, Jin H, Tang C, Du J, Zhang Z. Sulfur-containing gaseous signal molecules, ion channels and cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol*. 2018;175(8):1114-25.
- Yuan C, Hou HT, Chen HX, Wang J, Wang ZQ, Chen TN, Novakovic A, Marinko M, Yang Q, Liu ZG, He GW. Hydrogen sulfide-mediated endothelial function and the interaction with eNOS and PDE5A activity in human internal mammary arteries. *J Int Med Res*. 2019;47(8):3778-91.
- Yuan XJ. Voltage-gated K^{+} currents regulate resting membrane potential and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res*. 1995;77:370-8.
- Zabeeda D, Medalion B, Jakobshvilli S, Ezra S, Schachner A, Cohen AJ. Comparison of systemic vasodilators: effects on flow in internal mammary and radial arteries. *Ann Thorac Surg*. 2001;71:138-41.
- Zhang F, Li X, Stella C, Chen L, Liao Y, Tang C, Jin H, Du J. Plasma hydrogen sulfide in differential diagnosis between vasovagal syncope and postural orthostatic tachycardia syndrome in children. *J Pediatr*. 2012;160(2):227-31.
- Zhang R, Sun Y, Tsai H, Tang C, Jin H, Du J. Hydrogen sulfide inhibits L-type calcium currents depending upon the protein sulfhydryl state in rat cardiomyocytes. *PLoS One*. 2012;7(5):e37073.

Zhang Y, Tazzeo T, Chu V, Janssen LJ. Membrane potassium currents in human radial artery and their regulation by nitric oxide donor. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):383-92.

Zhao L, Tackett RL. Oxidized low-density lipoprotein inhibits acetylcholine induced vasorelaxation and increases 5-HT-induced vasoconstriction in isolated human saphenous vein. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284(2):637-43.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J.* 2001;20(21):6008-16.

Zhao Y, Brandish PE, Di Valentin M, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry.* 2000;39:10848-54.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(2):83-94.

Zhao YJ, Wang J, Rubin LJ, Yuan XJ. Inhibition of K_V and K_{Ca} channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am J Physiol.* 1997;272:H904-12.

Zhou Q, Satake N, Shibata S. The inhibitory mechanisms of nicorandil in isolated rat urinary bladder and femoral artery. *Eur J Pharmacol.* 1995;273(1-2):153-9.

SPISAK RADOVA I SAOPŠTENJA PROISTEKLIH IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Naučni radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

1. **Marinko M**, Novakovic A, Nenezic D, Stojanovic I, Milojevic P, Jovic M, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Nicorandil directly and cyclic GMP-dependently opens K⁺ channels in human bypass grafts. *J Pharmacol Sci.* 2015;128(2):59-64.
2. Novakovic A, **Pavlovic M**, Stojanovic I, Milojevic P, Babic M, Ristic S, Ugrešić N, Kanjuh V, Yang Q and He GW. Different K⁺ channels are involved in relaxation of arterial and venous graft induced by nicorandil. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;58(6):602-608.

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34)

1. **Pavlovic M**, Novakovic A, Peric M, Babic M, Kanjuh V, Misovic M, Bukarica Gojkovic Lj. The vasorelaxant effects of nicorandil in isolated human saphenous vein and internal mammary artery. Abstracts der wissenschaftlichen Beiträge zur 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V. March 18-20 2010, Blaubeuren, Germany. *Perfusion* 2010;23(1):p43.
2. Novakovic A, **Pavlovic M**, Peric M, Babic M, Stojanovic I, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Relaxation of Venous Graft Induced by Nicorandil. 10th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 26-29 June 2011, Budapest, Hungary. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2011;109(Suppl1):P148.
3. Novakovic A, **Pavlovic M**, Vranic A, Milojevic P, Babic M, Stojanovic I, Jovic M, Nenezic D, Ugresic N, Yang Q, He GW. Different potassium channels are involved in relaxation of arterial graft induced by nicorandil. *Frontiers in Cardiovascular Biology*, London, UK, 30th March -1st April 2012; *Cardiovascular Research* 2012;93(Suppl. 1) PP151,S31
4. Novakovic A, **Marinko M**, Milojevic P, Babic M, Stojanovic I, Jovic M, Nenezic D, Ugresic N, Yang Q, He GW. Relaxation of arterial graft induced by nicorandil. Poster Presentations From the World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2012: Dubai, United Arab Emirates 18-21 April 2012. *Circulation* 2012;125(19), PP 839, p184.
5. **Marinko M**, Novakovic A, Stojanovic I, Milojevic P, Jovic M, Nenezic D, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He G.-W. Nicorandil induced endothelium-independent relaxation of arterial bypass graft. 11th Conference of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 28-31 August 2013, Geneva, Switzerland. *Clinical Therapeutics* 2013;35(8, Suppl.):e47:PP098

Saopštenja na skupovima nacionalnog značaja sa međunarodnim učešćem (M64)

1. **Pavlović M**, Novaković A, Perić M, Babić M, Ćirković M, Ristić S, Bukarica Gojković Lj. Vazorelaksantni efekat nikorandila na izolovanoj humanojoj unutrašnjoj mamilarnoj arteriji. V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 13-17. oktobar 2010. *Arh farm* 2010;60:656-657.
(II nagrada, Sekcija za Farmakoinformatiku)

2. **Marinko M**, Novaković A, Nenezić D, Stojanović I, Milojević P, Jović M, Ugrešić N, Kanjuh V, Yang Q, He G.W. Mehanizam vazorelaksacije humanih bajpas graftova izazvane nikorandilom. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, 15-19. oktobar 2014. Beograd. Zbornik sažetaka, str. 259-260.
3. **Marinko M**, Novakovic A, Nenezic D, Stojanovic I, Milojevic P, Jovic M, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He G.W. Role of cyclic GMP in K⁺ channel activation by nicorandil in human bypass grafts. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation, October 29-31 2014, Belgrade, Serbia. Abstract book, p 134.

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Marinko (rođena Pavlović) rođena je 13.08.1982. god. u Prokuplju. Završila je osnovnu školu i gimnaziju u Kuršumlji kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu februara 2008. god. sa prosečnom ocenom 9,19. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije. Stručni farmaceutski staž obavila je 2008. god., a stručni ispit položila u januaru 2010. god. Doktorske akademske studije, modul farmakologija, upisala je školske 2008/2009. god. na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Februara 2009. god. zaposlila se na Katedri za farmakologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi, a u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Farmakologija izabrana je marta 2011. god. i reizabrana novembra 2016. god. Učestvuje u pripremi i izvođenju praktične nastave na obaveznim predmetima Katedre za farmakologiju na integrisanim akademskim studijama i u pripremi i izvođenju radionica na akademskoj specijalizaciji.

Koautor je udžbenika „Farmakoterapija za farmaceute“ (glavni urednik Ugrešić N, Beograd: Farmaceutski fakultet, 2016, 2. izmenjeno i dopunjeno izdanje) namenjenog studentima integrisanih akademskih studija.

Od 2011. god., saradnik je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (P175088) pod nazivom „Ispitivanje efekta i mehanizma delovanja različitih vazodilatatornih supstanci na humanim bajpas graftovima“. Bila je član 2 projekta u okviru bilateralne naučne i tehnološke saradnje Republike Srbije i NR Kine, u ciklusima 2013-2015 i 2018-2020, u okviru kojih je boravila u 2 radne posete Internacionalnoj bolnici za kardiovaskularne bolesti TEDA, Tianjin, Kina, tokom juna 2014. god. i juna 2019. god.

Oblast naučno-istraživačkog rada Marije Marinko je kardiovaskularna farmakologija. Autor je i koautor 14 radova (od kojih je 9 radova objavljeno u časopisima međunarodnog značaja) i 21 saopštenja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Марија Ј. Маринко**

Број индекса **23/08**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Вазодилататорно деловање донора азот монооксида и водоник-сулфида на
изоливаној унутрашњој торакалној артерији и вени сафени човека:
улога калијумових канала“**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, **28.05.2020.** год.

Потпис аутора

Марија Маринко

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Марија Ј. Маринко**

Број индекса **23/08**

Студијски програм **Фармакологија**

Наслов рада **Вазодилататорно деловање донора азот монооксида и водоник-сулфида на изолованој унутрашњој торакалној артерији и вени сафени човека: улога калијумових канала**

Ментор **Проф. др Александра Новаковић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, **28.05.2020. год.**

Потпис аутора

Марија Маринко

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Вазодилататорно деловање донора азот монооксида и водоник-сулфида на изолованој унутрашњој торакалној артерији и вени сафени човека: улога калијумових канала“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 28.05.2020. год.

Потпис аутора

Марија Маринко

1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство - некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално - без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство - без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.