

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET



Dragana D. Protić

**Uloga kalijumovih kanala u efektima
rezveratrola i naringenina na izolovanim
venskim krvnim sudovima čoveka i
pacova**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE



Dragana D. Protić

**The role of potassium channels in the
effects of resveratrol and naringenin on
isolated human and rat venous blood
vessels**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Doktorska disertacija urađena je u Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Deo eksperimentalnog rada obavljen je u laboratoriji Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije.

Ova disertacija realizovana je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije TP 31020.

Mentor: dr Ljiljana Gojković Bukarica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Komentor: dr Svetlana Spremović Rađenović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Članovi komisije: dr Nebojša Radunović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

dr Zoran Todorović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

dr Milica Bajčetić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

dr Vitomir Čupić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Fakultet veterinarske medicine

dr Dragica Stojić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Stomatološki fakultet

Datum odbrane:

Daj mi gde da se oslonim, pa ću pomeriti i nebo i zemlju.

Arhimed

Mojim anđelima,

Jovani i Mihailu

Najiskrenije se zahvaljujem:

Mentoru, prof. dr Ljiljani Gojković Bukarici, koja me je uvela u svet nauke, upoznala sa metodologijom naučno-istraživačkog rada na izolovanim organima i omogućila učešće u međunarodnoj i nacionalnoj saradnji. Takođe, kao rukovodilac nacionalnog projekta, omogućila je finansiranje eksperimentalnog rada. Prof. Gojković Bukarica učestvovala je u svim fazama izrade ove teze.

Komentoru, prof. dr Svetlani Spremović Rađenović i akademiku Nebojši Radunoviću na iskrenoj i stručnoj podršci, entuzijazmu, veri i inspirativnim idejama. Oni su uvideli važnost povezivanja bazične nauke sa kliničkom medicinom i omogućili dostupnost humanih kronih sudova.

Prof. Zoranu Todoroviću na svemu što me je naučio, podržao i razumeo kada je to bilo potrebno.

Ostalim članovima komisije na dragocnim savetima, podršci i strpljenju.

Prof. Helmut Heinle-u za dugogodišnju uspešnu saradnju.

Dr Bojani Beleslin-Čokić za izvođenje dela eksperimentalnog rada.

Mileni Zabunović, kao i ostalim laboratorijskim tehničarima, na ljubaznosti i tehničkoj pomoći pri eksperimentalnom radu.

Leposavi Bibić, glavnoj babici porodilišta, kao i ostalim bobicama, na profesionalnosti i izdvojenom vremenu.

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

Roditeljima na безусловnoj podršci, razumevanju i ljubavi.

Suprugu Jovanu i našoj deci, Jovani i Mihailu, koji su delili sa mnom sve nemire koje nosi izrada ove teze.

Mojoj Bobi – što postoji...

Dragana Protić

Uloga kalijumovih kanala u efektima rezveratrola i naringenina na izolovanim venskim krvnim sudovima čoveka i pacova

Sažetak

Polifenoli su složena biljna, polusintetska i sintetska organska jedinjenja. Hrana sadrži smešu različitih polifenola, a posebno voće i povrće, zeleni i crni čaj, crveno vino i dr. Nedavna istraživanja govore u prilog značajne uloge polifenola u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja, karcinoma, osteoporoze, neurodegenerativnih oboljenja i *diabetes mellitus*a. Najveći broj dokaza za to potiče iz *in vitro* i studija na životinjama.

Rezveratrol, polifenol iz crvenog grožđa i crvenog vina, je najviše proučavan polifenol. Za razliku od njega, naringenin, citrusni polifenol, pripada manje proučavanoj grupi polifenola, flavonoidima. Međutim, mehanizam vazodilatatornog i antivazokonstriktornog dejstva ovih polifenola na venskim krvnim sudovima još uvek nije proučen. Postoje dokazi da polifenoli mogu da aktiviraju kalijumove kanale (K-kanale) u glatkim mišićima arterijskih krvnih sudova i da na taj način dovedu do vazodilatacije.

Ciljevi našeg istraživanja bili su: a) da proučimo moguće antivazokonstriktorno i vazodilatatorno dejstvo rezveratrola i naringenina na izolovanoj portnoj veni pacova i humanoj pupčanoj veni, koje su prethodno kontrahovane na različite načine; b) da identifikujemo različite K-kanale vaskularnog glatkog mišića portne vene pacova i humane pupčane vene; c) da ispitamo da li K-kanali imaju značajnu ulogu u antivazokonstriktornom i vazodilatatornom dejstvu rezveratrola i naringenina; d) da proučimo postojanje dodatnog mehanizma dejstva rezveratrola i naringenina, koji je nezavisan od K-kanala, na izolovanim venskim krvnim sudovima.

Kontrakcije portne vene pacova bez endotela izazivali smo pomoću

električne stimulacije (ES), noradrenalina (NA), adenozin 5-trifosfata (ATP), rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona K^+ , kao i pomoću $CaCl_2$. Kada smo krvni sud kontrahovali pomoću $CaCl_2$, koristili smo rastvor koji ne sadrži jone Ca^{2+} (*Ca-free* rastvor) ili rastvor koji sadrži visoku koncentraciju jona K^+ , a ne sadrži jone Ca^{2+} (*K-rich, Ca²⁺-free* rastvor). U cilju ispitivanja da li rezveratrol otvara velike kalcijum-zavisne K-kanale (BK_{Ca} kanale), efekte rezveratrola poredili smo sa efektima NS 1619, selektivnog otvarača BK_{Ca} kanala.

ES-kontrakcije portne vene pacova su osjetljivije na dejstvo rezveratrola i NS 1619 nego NA-kontrakcije. Efekat rezveratrola na ATP-kontrakcije je slab. Blokatori BK_{Ca} kanala, tetraetilamonijum, karibdotoksin i iberiotoksin, delimično su inhibirali efekte rezveratrola na preparatima koji su prethodno kontrahovani pomoću ES. Metodom Wester blott-a pokazali smo da portna vena pacova eksprimira $KCa1.1$ protein. Glibenkamid (inhibitor ATP-senzitivnih K-kanala), kao i 4-aminopiridin i margatoksin (inhibitori voltažno-zavisnih K-kanala) nisu uticali na efekte rezveratrola na ES-kontrakcije portne vene pacova. Ni jedan od antagonista K-kanala nije uticao na rezveratrolom izazvanu inhibiciju NA-kontrakcija portne vene pacova. Rezveratrol je jače inhibirao $CaCl_2$ - nego KCl -kontrakcije portne vene pacova bez endotela.

Naringenin je doveo do koncentracijski-zavisne inhibicije: a) NA-kontrakcija; b) Ca-kontrakcija u *Ca-free* i *K-rich, Ca-free* rastvoru; c) K-kontrakcija portne vene pacova bez endotela. Ca-kontrakcije su bile osjetljivije na dejstvo naringenina od NA- i K-kontrakcija. Glibenklamid i tetraetilamonijum nisu blokirali efekte naringenina na NA-kontrakcijama. 4-aminopiridin i margatoksin blokirali su inhibitorno dejstvo naringenina na NA-kontrakcijama.

Kontrakcije humane pupčane vene bez endotela bile su izazivane pomoću serotonina i rastvora koji sadrži visoku koncentraciju jona K^+ . Rezveratrol i naringenin doveli su do koncentracijski-zavisne vazodilatacije

humane pupčane vene. Glibenklamid, 4-aminopiridin, tetraetilamonium i barijum-hlorid, neselektivni inhibitor ulazno-ispravljačkih K-kanala, dovode do značajnog pomeranja koncentracijski-zavisne krive rezveratrola u desno. 4-Aminopiridin i glibenklamid, primenjen u visokim dozama, antagonizovali su dejstvo naringenina. Rezveratrol i naringenin su doveli do koncentracijski-zavisne relaksacije humane pupčane vene koja je prethodno kontrahovana sa 100 mM K⁺. Metodom Western blot-a smo pokazali da humana pupčana vena eksprimira Kir6.1 protein.

Stoga, rezveratrol i naringenin imaju antivazokonstriktorno dejstvo na izolovanoj portnoj veni pacova bez endotela i vazodilatatorno dejstvo na humanoj pupčanoj veni bez endotela.

Rezveratrol primenjen u manjim koncentracijama od koncentracija naringenina sprečava kontrakcije portne vene pacova. BK_{Ca} kanali, delimično, imaju ulogu u inhibitornom dejstvu rezveratrola na razvoj neurogenih kontrakcija, dok voltažno-zavisni K-kanali glatkog mišića portne vene pacova imaju značajnu ulogu u antivazokonstriktornom dejstvu naringenina.

Rezveratrol je jači vazodilatator humane pupčane vene od naringenina. Glibenklamid-, 4-aminopiridin-, tetraetilamonium- i barijum-hlorid-senzitivni K-kanali su verovatno uključeni u vazodilatatorni mehanizam dejstva rezveratrola na humanoj pupčanoj veni. Sa druge strane, izgleda da 4-aminopiridin-senzitivni K-kanali imaju važnu ulogu u ostvarenju istog dejstva naringenina. Drugi mehanizmi dejstva ne mogu biti isključeni. Ca-kanali mišićne ćelije i/ili promet jona Ca²⁺ kroz ćeliju može biti uključen u efekte rezveratrola i naringenina. Naši rezultati su važni za bolje razumevanje uticaja polifenola na portnu i feto-placentalnu cirkulaciju.

Ključne reči: polifenoli, rezveratrol, naringenin, portna vena pacova, humana

umbilikalna vena, K-kanali, Western blot.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK:

The role of potassium channels in the effects of resveratrol and naringenin on isolated human and rat venous blood vessels

ABSTRACT

Polyphenols are complex plant-derived, semisynthetic or synthetic organic compounds. Foods contain complex mixtures of polyphenols, especially fruit and vegetables, green tea, black tea, red wine, etc. Recent studies strongly supports a role for polyphenols in the prevention of cardiovascular diseases, cancers, osteoporosis, neurodegenerative diseases, *diabetes mellitus etc.* Much of the evidence on the prevention of diseases by polyphenols is derived from *in vitro* or animal experiments.

Resveratrol, polyphenol from grapes and red wine, is the most studied polyphenol, while naringenin, citrus polyphenol, belongs to the most studied group of polyphenols, flavonoids. However, the mechanisms of vasodilator and antivasoconstrictor effects of these polyphenols on venous blood vessels are not established. There are suggestions that polyphenols could activate potassium channels (K-channels) in the vascular smooth muscle cells and to induce relaxation of blood vessels.

The aims of our research were: a) to analyze potential antivasoconstrictor and vasodilator effects of resveratrol and naringenin in the isolated rat portal vein and human umbilical vein, previously contracted in different ways; b) to identify K-channels in the vascular smooth muscle of human umbilical vein and rat portal vein; c) to examine whether K- channels play an important role in the antivasoconstrictor and vasodilator effects of resveratrol and naringenin; d) to analyze additional potassium channel-independent effects of resveratrol and naringenin in the isolated venous blood vessels.

Contractions of rat portal vein without endothelium were produced by

electrical field stimulation of perivascular nerves (EFS), norepinephrine (NE), adenosine 5'-triphosphate (ATP), high K⁺ solution and by CaCl₂ in Ca²⁺-free and high K⁺, Ca²⁺- free solution. In order to test whether resveratrol opens big calcium-sensitive (BK_{Ca}) channels, its effects were compared with those of NS 1619, a selective opener of BK_{Ca} channels.

The EFS-evoked contractions of rat portal vein were more sensitive to resveratrol and to NS 1619 than NE-evoked contractions. The effects of resveratrol on ATP-evoked contractions were weak. Blockers of BK_{Ca} channels, tetraethylammonium, charybdotoxin and iberiotoxin, partly inhibited the effect of resveratrol only in EFS-contracted preparations. Western blotting showed that rat portal vein expressed KCa1.1 protein. Glibenclamide, 4-aminopyridine and margatoxin (inhibitors of ATP-sensitive and voltage-sensitive K-channels, respectively) did not modify the effects of resveratrol on rat portal vein. None of the antagonists of K-channels affected the resveratrol inhibition of NE-evoked contractions and effect of high concentrations of resveratrol on the EFS-evoked contractions of rat portal vein. Resveratrol more potently inhibited CaCl₂- than KCl-contractions of rat portal vein without endothelium.

Naringenin induced concentration-dependent inhibition of: a) NE-contractions; b) Ca²⁺-contractions in Ca²⁺-free solution and in K⁺-rich, Ca²⁺-free solution; and c) K⁺-contractions of rat portal vein without endothelium. Ca²⁺-contractions were more sensitive to effect of naringenin than NE- and K⁺-contractions. Glibenclamide and tetraethylammonium didn't block naringenin-induced inhibition of NE-contractions. 4-aminopyridine and margatoxin blocked naringenin-induced inhibition of NE-contractions.

Contractions of human umbilical vein without endothelium were produced by serotonin and by high K⁺ solution. Both resveratrol and naringenin induced concentration-dependent vasodilatation of human

umbilical vein. Glibenclamide, 4-aminopyridine, tetraethylammonium and barium-chloride, a non-selective blocker of inward rectifier K-channels, induced significant shift to the right of the concentration-response curves of resveratrol. The effects of naringenin were antagonized with 4-aminopyridine and glibenclamide applied in high concentrations. Both, resveratrol and naringenin induced concentration-dependent vasodilatation of human umbilical vein precontracted with 100 mM K⁺. Western blotting showed that human umbilical vein expressed Kir6.1 protein.

We could conclude that resveratrol and naringenin have antivasoconstrictor effects on rat portal vein without endothelium and induce vasodilatation of human umbilical vein without endothelium.

Resveratrol prevented contractions of the rat portal vein in lower concentrations than naringenin. BK_{Ca} channels partly mediate the inhibitory effect of resveratrol on the neurogenic contractions of rat portal vein, while smooth muscle voltage-sensitive K-channels play important role in antivasoconstrictor effects of naringenin.

Resveratrol is more potent vasodilator of human umbilical vein than naringenin. Glibenclamide-, 4-aminopyridine-, tetraethylammonium- and barium-chloride-sensitive K⁺ channels are probably involved in the resveratrol vasodilatory effect, while naringenin seems to affect 4-aminopyridine-sensitive K-channels only. Other mechanisms of action of those polyphenols could not be excluded. The smooth muscle Ca-channels and/or Ca²⁺ mobilizing through cells might be involved in the effects of resveratrol and naringenin on the contractility of rat portal vein and human umbilical vein. Our results are important for better understanding the impact of polyphenols on the portal and feto-placental circulation.

Keywords: polyphenols, resveratrol, naringenin, rat portal vein, human umbilical vein, K-channels, Western blotting

Scientific field: Medicine

Major in: Molecular Medicine

UDK:

Lista skraćenica

4-AP: 4-aminopiridin

AP: akcioni potencijal

ATP: adenzin-trifosfat

BaCl₂: barium-hlorid

BK_{Ca} kanali: kalcijum-zavisni kalijumovi kanali koji brzo sprovode jone

CaCl₂: kalcijum-hlorid

CbTx: karibdotoksin

COX: ciklooksigenaza

DMSO: dimetilsulfoksid

EC₅₀: srednja efektivna koncentracija

ES: električna stimulacija

Glb: glibenklamid

IbTx: iberiotoksin

I_{Kur}: ultra-brza kalijumova struja

IK_{Ca}: kalcijum-zavisni kalijumovi kanali koji srednjom brzinom sprovode

I_{kr}: brza komponenta kasno-ispravljačke kalijumove struje

I_{ks}: kasno-ispravljačke kalijumova struja

I_{to}: prolazna izlazna kalijumova struja

K^+ joni: joni kalijuma

K-kanali: kalijumovi kanali

K_{ATP} kanali: ATP senzitivni K-kanali

K_{Ca} : kalcijum-zavisni kalijumovi kanali

KCl: kalijum-hlorid

K_{ir} kanali: ulazno ispravljački K-kanali

K_V kanali: voltažno-zavisni kalijumovi kanali

$MgTx$: margatoksin

OKK: otvarači kalijumovih kanala

SK_{Ca} : kalcijum-zavisni kalijumovi kanali koji sporo sprovode jone

SUR: sulfonil-urea receptorska subjedinica

TEA: tetraetilamonium hlorid

SADRŽAJ

I	UVOD	1
	POLIFENOLI	1
	1 . Struktura i prirodni izvori polifenola	1
	2 . Prva otkrića o značaju polifenola u ishrani	4
	3 . Uloga polifenola u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja	5
	4 . Rezveratrol-predstavnik stilbena	11
	5 . Naringenin-predstavnik flavanona	21
	KALIJUMOVI KANALI KAO CILJNO MESTO ZA DELOVANJE LEKOVA	25
	1 . Struktura i funkcija K-kanala	25
	2 . Kalijumove jonske struje	32
	3 . Ekspresija K-kanala	33
	4 . Kanalopatije K-kanala	37
	POLIFENOLI KAO MODULATORI K-KANALA U KRVNIM SUDOVI	43
	1 . Polifenoli kao modulatori K_{ATP} kanala u krvnim sudovima	45
	2 . Polifenoli kao otvarači BK_{Ca} kanala u krvnim sudovima	46
	3 . Dejstvo polifenola na K_v kanale krvnih sudova	46
	4 . Klinički značaj polifenola kao modulatora K-kanala	47
	IZOLOVANI KRVNI SUDOVI KAO MODEL ZA FARMAKOLOŠKA ISTRAŽIVANJA: SLIČNOSTI I RAZLIKE IZMEĐU ARTERIJSKIH I VENSKIH KRVNIH SUDOVA	48
	EKSPERIMENTALNI MODEL ZA IZUČAVANJE VASKULARNIH EFEKATA POLIFENOLA: IZOLOVANA PUPČANA VENA ČOVEKA I PORTNA VENA PACOVA	51
	ZNAČAJ POLIFENOLA U TERAPIJI PORTNE HIPERTENZIJE, HIPERTENZIJE U TRUDNOĆI, PREEKLAMPSIJE I EKLAMPSIJE	52
	1 . Portna hipertenzija	52
	2 . Hipertenzija u trudnoći, preeklampsija i eklampsija	53
	II CILJEVI ISTRAŽIVANJA	54
	III MATERIJAL I METODE	55
	ETIČNOST PROCEDURE	55
	PREPARACIJA KRVNIH SUDOVA	56
	1 . Izolovanje v. portae pacova	56
	2 . Uzorkovanje pupčanika	57
	3 . Izolovanje humane v. umbilicalis	58
	ANTIVAZOKONSTRIKTORNO DEJSTVO POLIFENOLA	59

1 . Ispitivanje antivazokonstriktornog dejstva rezveratrola i naringenina i uloge K-kanala u njihovom antivazokonstriktornom dejstvu	59
VAZODILATORNO DEJSTVO POLIFENOLA	62
1 . Ispitivanje vazodilatatornog dejstva rezveratrola i naringenina i uloga K- kanala u njihovom vazodilatatornom dejstvu	62
ISPITIVANJE UTICAJA RASTVARAČA NA TONUS IZOLOVANIH VENSKIH KRVNIH SUDOVA	63
ISPITIVANJE UTICAJA BLOKATORA K-KANALA NA TONUS IZOLOVANIH VENSKIH KRVNIH SUDOVA	64
IDENTIFIKACIJA K-KANALA U IZOLOVANOJ V. PORTAE PACOVA I HUMANOJ V. UMBILIKALIS	65
1 . Western blot analiza	65
SUPSTANCE	66
STATISTIČKA ANALIZA	67
IV REZULTATI	68
ANTIVAZOKONSTRIKTORNO DEJSTVO REZVERATROLA	68
1. Efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane v. portae pacova koje nastaju pod dejstvom ES, NA i ATP	68
2. Efekti različitih blokatora K-kanala na rezveratrolom izazvanu inhibiciju ES- i NA- kontrakcija izolovane v. portae pacova	70
3. Poređenje efekata rezveratrola sa visokoselektivnim otvaračem BK _{Ca} kanala NS1619	74
4. Efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane v. poprtae pacova koje nastaju pod dejstvom CaCl ₂ i KCl	75
ANTIVAZOKONSTRIKTORNO DEJSTVO NARINGENINA	77
1. Efekat naringenina na kontrakcije izolovane v. portae pacova koje nastaju pod dejstvom NA, CaCl ₂ i KCl	77
2. Efekti različitih blokatora K-kanala na naringeninom izazvanu inhibiciju NA-kontrakcija izolovane v. portae pacova	78
VAZODILATORNO DEJSTVO REZVERATROLA	80
1. Vazodilatatorno dejstvo rezveratrola na toničku kontrakciju izolovane humane v. umbilicalis izazvanu pomoću serotonina	80
2. Vazodilatatorno dejstvo rezveratrola na toničku kontrakciju izolovane humane v. umbilicalis izazvanu pomoću 100 mM K ⁺	80
3. Efekat blokatora K-kanala na rezveratrolom-izazvanu vazorelaksaciju izolovane humane v. umbilicalis prekontrahovane serotoninom	81
VAZODILATORNO DEJSTVO NARINGENINA	83

1. Vazodilatatorno dejstvo naringenina na toničku kontrakciju izolovane humane v. umbilicalis izazvanu pomoću serotonina	83
2. Vazodilatatorno dejstvo naringenina na toničku kontrakciju izolovane humane v. umbilicalis izazvane pomoću 100 mM K ⁺	83
3. Efekat blokatora K-kanala na naringeninom-izazvanu vazorelaksaciju izolovane humane v. umbilicalis prekontrahovane serotoninom	84
IDENTIFIKACIJA K-KANALA	85
V DISKUSIJA	86
AKTUELNOST TEME	86
ANTIVAZOKONSTRIKTORNO DEJSTVO REZVERATROLA I NARINGENINA	87
VAZODILATATORNO DEJSTVO REZVERATROLA I NARINGENINA	95
VI ZAKLJUČCI	104
VII LITERATURA	105
VIII DODATAK	133
LISTA PUBLIKOVANIH RADOVA IZ DOKTORATA	133
UPITNIK	134
LISTA ILUSTRACIJA	135
LISTA TABELA	137
IX BIOGRAFIJA AUTORA	138
X PRILOZI	139

I UVOD

POLIFENOLI

1. Struktura i prirodni izvori polifenola

Polifenoli su jedinjenja koja se nalaze u hrani biljnog porekla, prevashodno u voću i povrću. Daju ukus i boju hrani u kojoj se nalaze. Takođe, imaju ulogu u zaštiti biljaka od UV zračenja, patogena i fizioloških oštećenja (Chuang i McIntosh, 2011; Middleton i sar., 2000). Glavna karakteristika hemijske strukture ove grupe jedinjenja jeste prisustvo hidroksilnih grupa na aromatičnim prstenovima. Polifenoli se, na osnovu broja fenolnih prstenova i načina na koji se oni međusobno povezuju, mogu podeliti u dve velike grupe: flavonoidi i neflavonoidni polifenoli.

Flavonoidi su polifenoli u čiju hemijsku strukturu ulazi 15 atoma ugljenika raspoređenih u dva aromatična prstena benzopirina (A i C prsten) i jedan benzenov prsten (B prsten). Aromatični prstenovi su međusobno povezani mostom u čiji sastav ulaze tri ugljenikova atoma (C6-C3-C6). Hidroksilacija na poziciji 3 aromatičnog prstena utiče na razlike između flavanonola i flavanona, iako ove dve podgrupe polifenola imaju sličnu hemijsku strukturu centralnog dela molekula koja se zasniva na 2,3-dihidro-2-fenilhrom-4-jedan delu molekula. Od opisane centralne strukture polaze različiti bočni lanci, čija struktura i pozicija omogućava podelu flavonoida u nekoliko podgrupa. Glavne podgrupe flavonoida su:

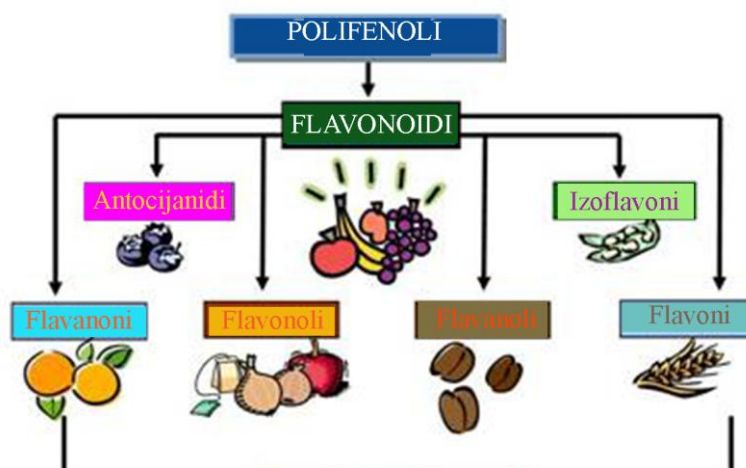
- flavoni (apigenin, luteolin) koji se nalaze u ceralijama;
- flavonoli (kemferol, kvercetin) koji se nalaze u luku, brokulima i praziluku;
- izoflavoni (diadzein, genistein) koji se nalaze u soji i produktima od soje;

- flavanoni/flavanonoli (hesperin, naringenin, astilbin, engeletin) koji se nalaze u citrusnom voću, origanu i vinu;
- flavanoli (katehin, epikatehin, epigalokatehin i epigalokatehin-galat) koji se nalaze u zelenom čaju, crvenom vinu i čokoladi. Flavanoli se nalaze kao monomeri ili kao oligomeri u obliku tanina i proantocianidina. Dvostruka veza između 2. i 3. ugljenikovog atoma i hidroksilacija C3 atoma C prstena omogućava postojanje dva centra asimetrije.
- antocijanidi (pelargonidin, cianidin, andmalvidin), koji se nalaze u crvenom vinu i bobičastom voću. Jedinjenja koja se nalaze u ovoj podgrupi polifenola postoje u biljkama u obliku glikozida koji su rastvorljivi u vodi. Individualne razlike predstavnika ove podgrupe zasnivaju se na hidroksilaciji i postojanju metoksi grupa na tri prstena.

Podela flavonoida prikazana je na slici 1.

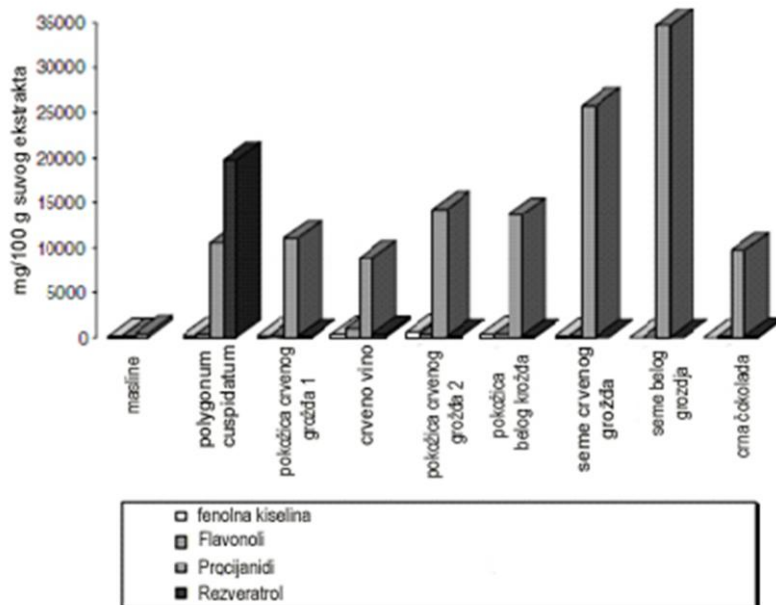
Neflavonoidni polifenoli. Jedinjenja koja pripadaju ovoj grupi polifenola mogu da se svrstaju u dve podgrupe:

- fenolne kiseline, gde spadaju i hidrosibenzoeva kiselina (HBA) i hidrosicinamična kiselina (HCA), a nalaze se u borovnici, kiviju i jabukama. Međutim, najčešći unos fenola je putem konzumiranja kafe koja sadrži visoku koncentraciju hlorogenične kiseline (50-150 mg u 200 ml instant kafe).
- stilbeni koje biljke najčešće sintetišu kao odgovor na infekciju ili oštećenje. Rezveratrol, glavni predstavnik stilbena, može se naći u *cis* i *trans* obliku, kao glikozid (piseid) ili polimer (viniferin, palidol ili ampelopsin A). Glavni izvori rezveratrola su: *Polygenum cuspidatum* (srp. troskot), grožđe, vino i kikiriki. Rezveratrol, kao aglikon, se nalazi u crvenom vinu u koncentraciji 0,3-7 mg/L, a kao glikozid u koncentraciji 15 mg/L (Vauzour, 2012).



Slika 1. Podela flavonoida (izvor slike <http://www.5elementproject.com>).

Dnevni unos polifenola putem ishrane je vrlo varijabilan. Procenjeno je da je unos glikoziranih flavonoida bio 1 g dnevno tokom 1976. godine u SAD (Kuhnau, 1976). Kohortna studija koja je uključivala ispitanike ženskog pola sa područja SAD pokazala je da je unos flavonoida i flavona bio 21,2 mg/dan, a kvercetin (15,4 mg/dan) je bio najzastupljeniji polifenol u ishrani (Lin, 2007). Procenjeno je da je dnevni unos antocijanida 12,5 mg/dan, a 21% od ukupnog unosa antocijanida čini delphinidin (Wu i sar.,2006). Tačna procena dnevnog unosa polifenola putem ishrane je vrlo neprecizna iz dva razloga: 1) ne postoje podaci o sadržaju polifenola u svim namirnicama i 2) postoji velika varijabilnost u sadržaju polifenola između različitih namirnica. (Manach i sar., 2004) . Sadržaj polifenola u pojedinim izvorima prikazan je na slici 2.



Slika 2. Sadržaj pojedinih polifenola u različitim prirodnim izvorima (Slika preuzeta iz rada: Counet i sar., 2006).

2. Prova otkrića o značaju polifenola u ishrani

Veliki broj epidemioloških studija sugeriraju postojanje negativne korelacije između potrošnje hrane koja sadrži visoku koncentraciju polifenola (voće, povrće, kakao sadržan u čokoladi, itd.) ili pića (vino, posebno crveno vino, sok od grožđa, čaj, itd.) i učestalosti kardiovaskularnih bolesti.

Popularan izraz „Francuski paradoks“, koji je prvi opisao St. Leger sa saradnicima, ističe relativno nisku incidencu kardiovaskularnih bolesti među francuskim stanovništvom, nasuprot unosu velike količine zasićenih masnih kiselina koji je glavni faktor za nastanak koronarne bolesti (St. Leger i sar., 1979). Prve studije koje uvode pojam „Francuski paradoks“ temelje se na postojećim podacima koje je posedovala vlada Francuske. Opsežne epidemiološke studije poput MONICA studije, tokom koje su korišćeni identični kriterijumi za određivanje stope koronarne bolesti u različitim populacijama, potvrdila je smanjenje stope koronarnih događaja od severa do juga Europe (Kuulasmaa i sar., 2000; Tunstall-Pedoe i sar., 1999, 2000). Upadljivo, niska

stopa koronarnih događaja koja je zabeležena tokom opisanih istraživanja u Francuskoj i ostalim mediteranskim zemljama bila je povezana s globalnom faktorima rizika (uključujući faktore poput krvnog pritiska, LDL i HDL lipoproteina, holesterola, starosti, pola, pušenja i intolerancije glukoze). Iako su faktori rizika bili slični u populacijama drugih razvijenih zemlja, kod njih je stopa koronarnih događaja bila znatno veća. Razlozi za ovu nepodudarnost otvorili su novo istraživačko polje u farmakologiji, i medicini uopšte.

Jaka negativna korelacija između umerenog konzumiranja alkoholnih pića (čša vina dnevno) i smrtnosti od koronarne bolesti srca ili ishemijskog moždanog udara priznata je pre mnogo godina (Friedman i Kimball, 1986; Kiechl i sar., 1998; Klatsky i sar., 1992; Marmot i sar., 1981; Renaud i sar., 1998; Rimm i sar., 1999; Sacco i sar., 1999). Tako su tokom 1990-ih, Fitzpatrick i saradnici primetili da sok od grožđa, kao i ekstrakti pokožice zrna grožđa dovode do endotel-nezavisne vazorelaksacije. Isti učinak (iako različite jačine) kasnije je opisan i sa vodenim ekstraktima iz raznog povrća i voća. Jedna od prvih studija koja je opisala endotel-zavisnu vazorelaksaciju izazvanu ekstraktima iz različitih vina ukazala je da polifenoli vina povećavaju proizvodnju azot-monoksida (NO) u endotelu (Fitzpatrick i sar., 1993; 1995). Danas, na osnovu velikog broja sprovedenih studija sa sigurnošću možemo reći da polifenoli imaju značajnu ulogu u zaštiti našeg organizma od razvoja maligniteta, kardiovaskularnih i neuroloških oboljenja (Fröjdö i sar, 2008).

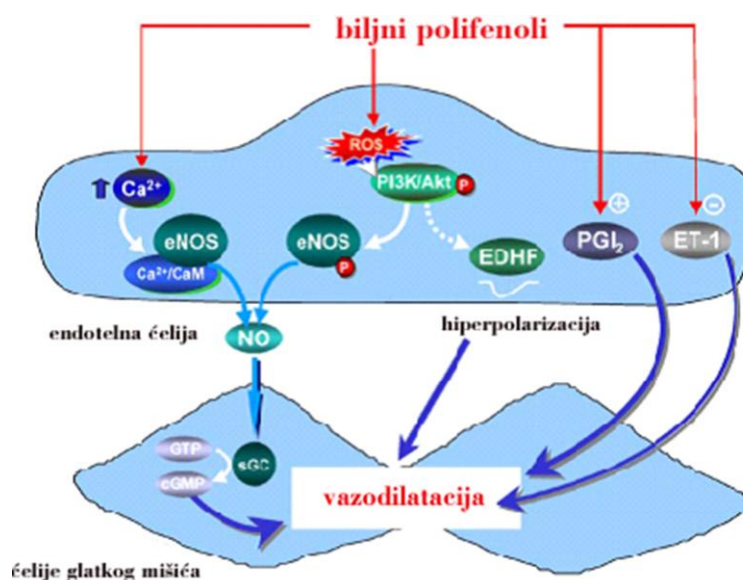
3. Uloga polifenola u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u mnogim ekonomski razvijenim zemljama, kao i u državama u razvoju. Iako su neki od glavnih uzroka za razvoj kardiovaskularnih oboljenja starost, pol i genetska predispozicija, ishrana i stil života su prepoznati kao glavni promenljivi faktori rizika. Na primer, davno su opisani negativni efekti prekomernog unosa zasićenih masnih kiselina i holesterola na razvoj kardiovaskularnih oboljenja.

Oni se ogledaju u promeni u nivoa lipoproteina male gustine (LDL-C holesterola) (Murray i sar., 1996). Zanimljivo je, međutim, da određeni *nelipidni* faktori rizika takođe mogu uticati na razvoj kardiovaskularnih oboljenja uključujući srčane bolesti, jer je nivo holesterola i lipoproteina u granicama normale kod 50% pacijenata koji umru od srčanih oboljenja (Castelli i sar., 1998). Nedavni rezultati su naglasili važnost oksidativnog stresa, vaskularne inflamacije i endotelne disfunkcije u razvoju kardiovaskularnih oboljenja (Zalba i sar., 2007). Napredak u poznavanju patofiziologije i patologije kardiovaskularnih oboljenja dao je nove putove za razvoj farmakologije, farmacije i/ili prehrabene strategije koja će imati za cilj sprečavanje razvoja kardiovaskularnih oboljenja. Zanimljivo je napomenuti da su epidemiološke studije odigrale značajnu ulogu u razvoju takvih proizvoda, a najzapaženiji rezultati ovih studija su niža incidenca ishemijske bolesti srca kod Eskima i niža stopa smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti u Francuskoj (Renaud i sar., 1992.). U oba slučaja, istraživanje se temelji na činjenici da povećan unos polifenola doprinosi ovakvom rezultatu. Naročito se blagotvorno dejstvo na zdravlje pripisuje crvenom vinu i semenkama grožđa koje sadrže visoku koncentraciju polifenola (Pataki i sar., 2002; Keevil i sar., 2000; Freedman i sar. 2001).

Smatra se da polifenoli imaju više različitih mehanizama kojima sprečavaju pojavu kardiovaskularnih oboljenja. U literaturi se navode sledeća njihova dejstva: antioksidativno, antiagregacijsko, povoljan uticaj na nivo HDL-holesterola u plazmi (podizhu nivo HDL-holesterola), inhibicija oksidacije LDL-holesterola, poboljšavanje endotelne funkcije i stabilizacija aterosklerotičnog plaka (Pandey i Rizvi, 2009). Mehanizam vazodilatatornog dejstva polifenola nije potpuno razjašnjen. Poznato je da ovi molekuli mogu izazvati endotel-zavisnu i endotel-nezavisnu relaksaciju krvnog suda. Poznato je da polifenoli moduliraju mnoge intracelularne signalne puteve kao i ekspresiju pojedinih gena. Tako je opisano da biljni polifenoli aktiviraju endotelnu NO sintazu

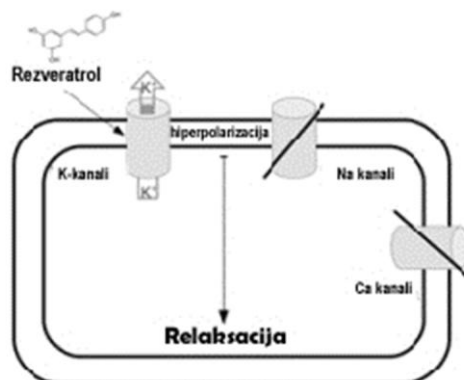
(eNOS), povećavaju stvaranje azot monoksida i tako izazivaju endotel-zavisnu vazodilataciju. Aktivacija eNOS odvija se zbog: 1) povećanja intracelularnog nivoa jona Ca^{2+} i 2) fosforilacije PI3-kinaze. Osim toga, biljni polifenoli uzrokuju oslobađanje endotel-zavisnog hiperpolarišućeg faktora (EDHF). Polifenoli takođe povećavaju oslobađanje prostaciklina iz endotela i inhibiraju sintezu i dejstvo endotelina-1. Svi ovi mehanizmi mogu imati značaj u vazodilataciji koji izazivaju polifenoli, kao i njihovom vazoprotektivnom i anti-hipertenzivnom desjtvu (slika 3) (Stoclet i sar., 2004)



Slika 3. Endotel-zavisna vazodilatacija izazvana polifenolima. (slika pruzeta iz: Stoclet i sar., 2004).

Endotel-nezavisna relaksacija uključuje aktivnost pojedinih jonskih kanala, pre svega kalijumovih (K^+) i kalcijumovih (Ca^{2+}) kanala (Novaković i sar., 2006a; b; Gojković Bukarica i sar., 2008; Saponara i sar., 2006; Gojković Bukarica i sar., 2002). Prva klinička primena polifenola bila je 1989. godine, kao i njihova venoprotektivna svojstva u terapiji vaskularnih oboljenja (Gargouil i sar., 1989). Pokazano je da biljni ekstrakti koji sadrže visoku koncentraciju

polifenola povoljno utiču na venski tonus, smanjuju venski kapacitet i rastegljivost venskih krvnih sudova (Lyseng-Williamson i Perry, 2003). Međutim, bez obzira na veliki broj naučnih publikacija koje opisuju vazodilatatorno dejstvo polifenola, možemo reći da je tačan mehanizam kojim ove supstance dovode do vazorelaksacije i dalje nejasan (slika 4).

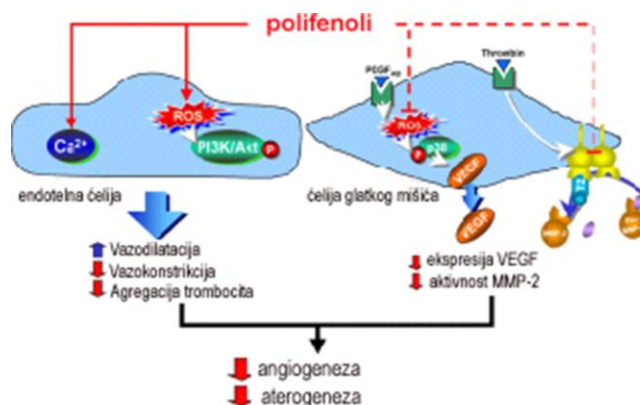


Slika 4. Uloga K-kanala u vazorelaksaciji koju izaziva rezveratrol. Rezveratrol aktivira kalijumove kanale glatkog mišića kronog suda, dovodeći do hiperpolarizacije. Promene u voltaži ćelijske membrane dovode do inaktivacije natrijumskih i kalcijumskih kanala izazivajući vazodilataciju. (Slika preuzeta iz rada Gojković-Bukarica i sar., 2013).

Pored toga što polifenoli dovode do povećane proizvodnje vazodilatatornih faktora, poznato je da utiču i na funkciju endotelnih ćelija i glatke muskulature krvnog suda, kao i da imaju antitrombotske efekte. Takođe inhibitorno deluju na faktore koji imaju ulogu u pro-angiogenezi (a čija uloga je podstaknuta PDGF_{AB} i trombinom). Opisani mehanizmi uključeni su u sprečavanju angiogeneze i u vazoprotekciji do koje dovode polifenoli (slika 5) (Sloclet i sar., 2004).

Opisano je da polifenoli sprečavaju i/ili poboljšati endotelnu disfunkciju i smanjuju krvni pritisak kod spontano hipertenzivnih pacova (Peng i sar., 2005; Machha i Mustafa, 2005), kao i u modelima kod kojih je hipertenzija

prouzrokovana solima deoksikortikosteron acetata (Jimenez i sar., 2007), Nv-nitro-L-argininom (de Moura i sar., 2004) ili angiotenzinom II (Sarr i sar., 2006). Polifenoli iz crvenog vina, pri tome, smanjivali su aktivnost prooksidantnih enzima i/ili povećavali antioksidantnu zaštitu.



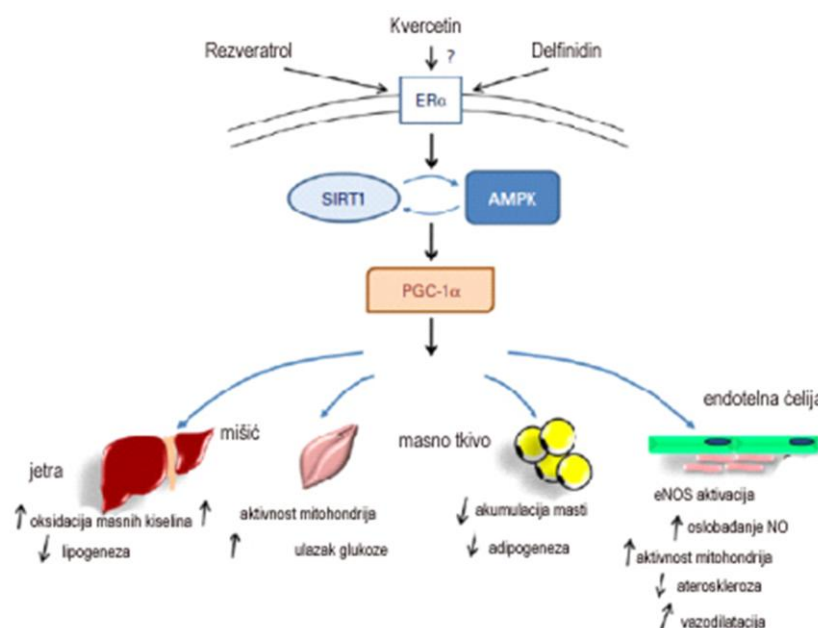
Slika 5. Efekti polifenola na endotelne ćelije i mišićne ćelije krvnog suda (slika pruzeta iz: Stoclet i sar., 2004).

Tako, uzimanje 150 mg/kg/dan ekstrakta polifenola iz crvenog vina u pijaćoj vodi dovelo je do pada krvnog pritiska kod pacova kod kojih je hipertenzija bila izazvana angiotenzinom II (0,4 mg/kg/dan tokom 28 dana) (Sarr i sar., 2006). U tom modelu, hipertenzija je bila posledica poznatog mehanizma: angiotenzin II je izazivao endotelnu disfunkciju u arteriolama pošto je dovodio do ushodne regulacije NADPH oksidaze i tako povećavao stvaranje slobodnih kiseoničnih radikala (ROS) u zidu krvnih sudova, odnosno izazivao oksidativni stres (Griendling i FitzGerald 2003a; 2003b; Sarr i sar., 2006; Harrison i sar., 2003). Ekstrakt crvenog vina sa visokim sadržajem polifenola dovodio je, međutim, do smanjenja aktivnosti NADPH oksidaze, pa samim tim i smanjenja oksidativnog stresa (Sarr i sar., 2006; Steffen i sar., 2008).

Polifenoli smanjuju endotelnu disfunkciju i drugim mehanizmima: povećavaju aktivnost katalaze čime štite NO od vezivanja za ROS. Takođe, oni

ublažavaju nepovoljno dejstvo angiotenzina II na endotel-zavisnu vazokonstrikciju koja uključuje stvaranje tromboksana. Osim toga, polifenoli ispoljavaju i antiinflamatorno dejstvo u krvnim sudovima (Kane i sar., 2010). Pokazano je da rezveratrol sprečava sintezu prostaglandina inhibicijom COX-1 i na taj način ispoljava antiinflamatornu aktivnost (Nakata i sar., 2012).

Proizvodi sa relativno malo polifenola (npr. 250 ml crvenog vina bez alkohola) povećavaju vazodilataciju brahijalne arterije izazvanu povećanim protokom (*flow-mediated vasodilatation*) kod zdravih dobrovoljaca (Agewall i sar., 2000). Isti efekat postignut je i pri primeni 46 g crne čokolade dnevno, tokom dve nedelje (Engler i sar., 2004), kao i nakon primene ekstrakta crnog ili zelenog čaja i grožđa kod bolesnika s koronarnom bolešću (Duffy i sar., 2001; Widlansky i sar., 2007; Lekakis i sar., 2005). Na slici 6 su sumirani protektivni efekti polifenola u razvoju kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti.

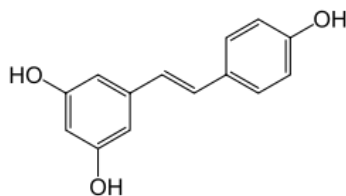


Slika 6. Potencijalni mehanizmi dejstva polifenola u zaštiti organizma od razvoja kardiovaskularnih oboljenja (slika preuzeta: Andriantsitohaina i sar., 2012).

Sistolni pritisak je poboljšán i kod hipertoničara koji su konzumirali proizvode bogate polifenolima, kao što su crna čokolada (Taubert i sar., 2007), dve čaše soka od crvenog grožđa (Park i sar., 2004) ili 50 ml soka od nara (Aviram i Dornfeld, 2001).

4. Rezveratrol-predstavnik stilbena

Poslednjih deset godina rezveratrol je jedna od najviše ispitivanih supstanci u biomedicinskim naukama. To pokazuje broj publikovanih radova koji punih šest decenija nije prešao 800, a poslednjih sedam godina dostiže 4000. Rezveratrol je prvi put opisao Michio Takaoka u članku u japanskom naučnom časopisu 1939. godine. Izolovan je iz biljke čemerike (*Veratrum album*), otrovne i poznate farmakognoziji. Rezveratrol je ime dobio kao rezorcinolski derivat biljaka iz roda *Veratrum* (slika 7).



Slika 7. Hemijska struktura rezveratrola (slika preuzeta: www.wikipedia.org).

Biljni ekstrakt koji je sadržao rezveratrol koristio se u japanskoj i kineskoj tradicionalnoj medicini za liječenje gljivičnih infekcija, raznih kožnih oboljenja, bolesti jetre i kardiovaskularnih bolesti (Arichi i sar, 1982; Vastano i sar 2000). Poznato je da se i u našoj tradicionalnoj medicini koristi troskot (*Poligonum cuspidatum*) za lečenje srčanih oboljenja. Glavni izvor rezveratrola je pokožica zrna grožđa. Osim grožđa, rezveratrol je prisutan u voću poput nara, brusnice, duda, borovnice, u kikirikiju, ali takođe u raznom cveću i lišću, uključujući bor, kukuruz, ljiljan, eukaliptus, smreku itd. (tabela 1).

Tabela 1. Količina rezveratrola u prehrambenim namirnicama (Tabela preuzeta iz rada: Mukherjee i sar., 2010)

Izvor rezveratrola	Koncentracija	Izvor rezveratrola	Koncentracija
Plod divlje (šumske) borovnice (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	~16 ng/g	Pistaći	0,09–1,67 µg/g
100% prirodni puter od kikirikija	~0,65 µg/g	Porto i šeri vina	<0.1 mg/L
Plod američke borovnice (<i>Vaccinium.corymbosum</i>)	~32 ng/g	Sok od crvenog grožđa	~0,50 mg/L
Termički obrađen kikiriki	~5.1 µg/g	Crvena vina	0.1–14,3 mg/L
Svež sok od brusnice	~0,2 mg/L	Pečeni kikiriki	~0,055 µg/g
Suva ljuska od grožđa	~24,06 µg/g	Sok od belog grožđa	~0,05 mg/L
Grožđe	0.16–3,54 µg/g	Bela vina	<0.1–2.1 mg/L
Puter od kikirikija	0,3–1,4 µg/g		
Kikiriki	0,02–1,92 µg/g		

Rezveratrol se sintetiše kao odgovor na stres, kao što je nedostatak vode, UV zračenje, a naročito gljivične infekcije (Das i Maulik, 2006). Osim prirodnih proizvoda, crno vino takođe sadrži rezveratrol u značajnoj koncentraciji. Svi navedene namirnice imaju kardioprotektivnu aktivnost upravo zbog prisutnosti rezveratrola (Baur i sar. 2006).

Farmakodinamija rezveratrola

Rezveratrol je prirodni antioksidans, te dovodi do uništenja intracelularnih slobodnih radikala koji imaju štetan uticaj. Iako rezveratrol nije moćan antioksidans u *in vitro* uslovima, deluje kao snažan antioksidans *in vivo*.

Najverojatnije, *in vivo* antioksidansna aktivnost rezveratrola proizlazi iz njegove sposobnosti da poveća sintezu NO, koji dalje može da deluje kao antioksidans. Pokazano je da rezveratrol povećava sintezu NO u slučaju ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja srca, mozga i bubrega, kao i da smanjuje oksidativni stres u tim modelima (Hattori i sar., 2002;. Cadenas i Barja, 1999).

Određena vina, sorte grožđa i sokovi imaju kardioprotektivne efekte zbog prisustva rezveratrola (Hattori i sar. 2002; Imamura i sar., 2002). Takođe pokazano je da rezveratrol ima kardioprotektivne efekte povećavanjem aktivnosti katalaze u miokardu. Rezveratrol poboljšava postishemijsku ventrikularnu funkciju, smanjuje veličinu polja infarkta miokarda i apoptozu kardiomiocita (Das i sar., 2005). Takođe, pokazano je da povećava ekspresiju GLUT-4 proteina, bez obzira da li postoji unos glukoze ili ne (Lekli i sar., 2008).

Rezveratrol reguliše homeostazu redoks sistema kod sisara održavajući aktivnost nekoliko antioksidativnih enzima, uključujući i glutation peroksidazu, glutation-S-transferazu i glutation reduktazu (Yen i sar., 2003). Takođe, poznato je da rezveratrol sprečava oksidaciju LDL-holesterola (Frankel i sar., 1993). Postoje dokazi da je rezveratrol moćan inhibitor oksidacije nezasićenih masnih kiselina (PUFA) koje ulaze u sastav LDL-holesterola. U stvari, pokazano je da je rezveratrol moćniji u prevenciji oksidacije katalizovane bakrom od flavonoida, na čemu se i zasniva njegova antioksidativna aktivnost na nivou LDL-holesterola (Frankel i sar., 1993). Hebbar i sar. (2005) su pokazali da veće doze rezveratrola (0,3, 1,0 i 3,0 g/kg dnevno) pospešuju ekspresiju gena koji učestvuju u antioksidantnom procesu kod pacova oba pola.

Zbog visoke stope potrošnje kiseonika i niskog nivoa antioksidativnih enzima, mozak i srce su posebno osetljivi na hipoksiju i oksidativni stres. Hem oksigenaza-1 (HO-1) je neuroprotektivni enzim (Doré, 2002) i dovodi do degradacije pro-oksidantnog hema u biliverdin/bilirubin, gvožđe i ugljenmonoksid (CO). Bilirubin može da inaktiviše slobodne radikale.

Ugljenmonoksid je modulator ćelijskog ciklusa i vazodilatator. Poznato je da CO ima antiinflamatorno i antiapoptotičko dejstvo putem regulacije aktivnosti nuklearnog faktora kappa B (NFkapaB) (Kim i sar., 2006). Rezveratrol, primenjen u niskim koncentracijama (1-10 mM), povećava aktivnost HO-1 u primarnoj kulturi neurona i ćelija glatke muskulature humane aorte (Zhuang i sar., 2003; Juan i sar., 2005). Primenjen u visokim koncentracijama (> 20 mM), rezveratrol blokira aktivnost NFkapaB i HO-1. Umeren unos rezveratrola ili crvenog vina bogatog rezveratrolom, ima izražen zaštitni efekat od oksidativnog stresa na nervno i vaskularno tkivo.

Rezveratrol inhibira agregaciju trombocita, što je značajan proces u razvoju ateroskleroze (Olas i sar., 2001; Orsini i sar., 1997). Agregacija trombocita kroz aktiviranje procesa formiranja tromba ima značajnu ulogu u nastanku vaskularne okluzije. Pokazano je da rezveratrol ima dozno-zavisni antiagregacioni efekat. Rezveratrol (0,15 i 0,25 μ M/l) inhibira aktiviranje trombocita do kojeg dovodi kolagen, imobilizaciju intracelularnog Ca^{2+} , formiranje tromboksana A₂ i aktiviranje protein-kinaze C (PKC) (Shen i sar., 2007).

Rezveratrol poseduje i antitumorsku aktivnost, sprečavajući nastanak i razvoj malignih ćelija (Jang i sar., 1997). Pokazano je da visoka koncentracija rezveratrola (50 mM) izazvati smrt ćelija u modelu ljudskog neuroblastoma (van Ginkel i sar., 2007). Izloženost rezveratrolu u koncentraciji od 100 mM tokom 48 h dovodi do apoptoze malignih ćelija debelog creva (DLD1 i HT29 ćelije) (Trincheri i sar., 2007). Potvrđeno je da primena rezveratrola u dozi 10 mg/kg tokom dva dana dovodi do smanjenja napredovanja maligniteta.

Pored opisanog, rezveratrol ima i antiinflamatornu aktivnost putem inhibicije ciklooksigenaze-1 (COX1) i ciklooksigenaze-2 (COX2) (Kundu i sar., 2006). Rezveratrol dovodi do smanjenja proizvodnje prostaglandina E₂ (PGE₂) i formiranje ROS u mikroglijalnim ćelijama aktiviranim lipopolisaharidom (LPS) (Candelario-Jalil i sar., 2007; Kim i sar., 2007). Rezveratrol suprimira aktivnost

T- i B-limfocita i makrofaga (Sharma i sar., 2007). Singh i sar (2007) su pokazali da rezveratrol aktivira i kaspaza-zavisnu i kaspaza-nezavisnu apoptozu aktiviranih T-limfocita miševa. Jedna studija je pokazala da rezveratrol ima analgetički efekat putem inhibicije COX1 i COX2 enzima (Bertelli i sar., 2008).

Rezveratrol, takođe, pokazuje i neuroprotektivnu aktivnost. Pokazano je da može da ima značajan efekat u terapiji *Huntington*-ove (Parker i sar., 2005), *Alzheimer*-ove (Marambaud i sar., 2005) i *Parkinson*-ove bolesti (Karlsson i sar., 2000).

Tokom prethodnih godina, opisano je i dejstvo rezveratrola na krvne sudove. Poznato je da rezveratrol dovodi do endotel-nezavisne i endotel-zavisne vazodilatacije. *Endotel-nezavisna relaksacija* do koje dovodi rezveratrol verovatno uključuje različite jonske kanale ćelijske membrane vaskularne glatke muskulature, kao što su BK_{Ca} ili voltažno-senzitivni kalcijumovi kanali (Ca-kanali). Takođe, margatoksin-senzitivni voltažni kalijumovi kanali (Kv kanali) igraju značajnu ulogu u vazodilataciji koju izaziva rezveratrol (Novaković i sar., 2006a, 2006b; Campos-Toimil i sar., 2007; Gojković-Bukarica, 2008).

Endotel-zavisni mehanizmi uključuju stimulaciju endotelne sintaze azot monoksida (eNOS), koja se odvija na dva načina:

- rezveratrol aktivira SIRT1 i dovodi do deacetilacije eNOS;
- rezveratrol aktivira alfa podtip estrogenskih receptora i pokreće ERK1/2 koji dovode do fosforilacije eNOS (Li i Förstermann, 2009).

Pored opisanog, rezveratrol na više različitih načina smanjuje inaktivaciju NO molekula do koje dovodi superoksid i ublažava endotelnu disfunkciju:

- smanjuje ekspresiju i aktivaciju prooksidantne vaskularne NADPH oksidaze (NOX) i

- stimuliše ekspresiju antioksidantnih enzima - superoksid-dismutaze (SOD), katalaze i glutation peroksidaze (Spanier i sar., 2009).

Tako, *per os* primena rezveratrola dovodi do endotel-zavisne relaksacije. U dvostruko slepoj kliničkoj studiji sa randomizacijom i ukrštenim dizajnom, koja je uključivala 19 gojaznih muškaraca i žena u postmenopauzi sa nelečenom graničnom hipertenzijom, akutna primena rezveratrola (30, 90 i 270 mg), povećaja je protok krvi kroz brahijalnu arteriju (pokazatelj endotel-zavisne vazodilatacije) (Wong, 2011).

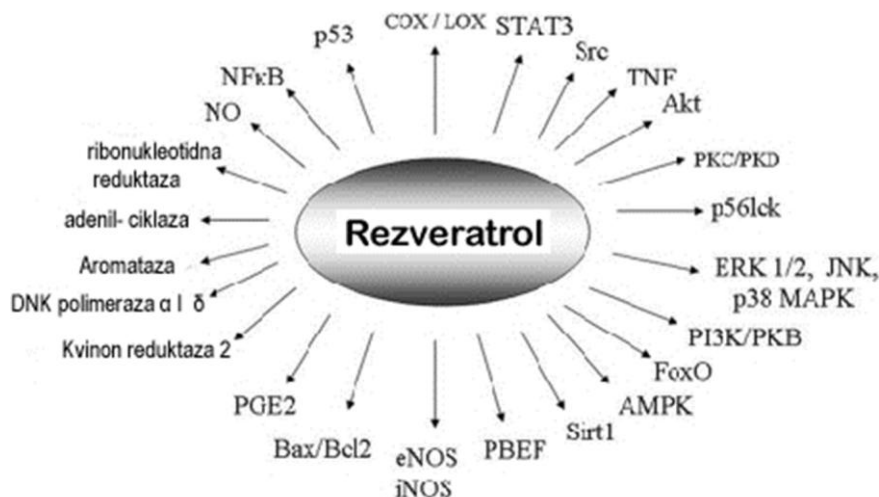
Značajan broj naučno-istraživačkih radova ukazuje na to da rezveratrol može da aktivira gene preko kojih se kontroliše dužina života, sirtuine (SIRT). Takođe, utiče na aktivnost histon deacetilaze (Miyazaki i sar., 2008; Borra i sar 2005). Rezveratrol je produžio životni vek kod vinskih mušica *Drosophila* (Guarente, 2008) i crva *Caenorhabditis elegans* (Gruber i sar., 2007) kao i kod kičmenjaka kao što su ribe *Northobranchius* (Terzibasi i sar., 2007). Bauer i sar. su prvi ukazali da rezveratrol može da produži život i kod sisara (Baur i sar., 2006). U ovoj studiji, visoka kalorijska dijeta (60% kalorija iz masti) dovela je do gojaznosti miševa i inflamatorne reakcije, što je dovelo do komorbiditeta, kao što su dijabetes i ateroskleroza. Na taj način, životni vek miševa je skraćen. Međutim, primena rezveratrola (22,4 mg/kg/dan) zajedno sa visoko kalorijskom dijetom produžila je životni vek. Smatra se da je mehanizam dejstva rezveratrola, u opisanoj studiji, povećana ekspresija SIRT1, što je imitiralo kalorijsku restrikciju (Borra i sar, 2005).

Rezveratrol u različitim koncentracijama proizvodi različite efekte (tabela 2).

Tabela 2. Efekti rezveratrola primenjenog u različitim koncentracijama (tabela preuzeta iz: Gojković-Bukarica i sar., 2013.)

Koncentracija	Efekti
50 nM	Indukuje aktivnost eNOS i aktivira ERK.
0.15-0,25 μ M	Inhibira aktivaciju trombocita
10 μ M	Popravlja srčanu funkciju posle ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja.
	Štiti srce od ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja prekonicioniranjem miokarda.
25 μ M	Ispoljava kardioprotekciju u manjem stepenu.
2,5 mg/kg	Ublažava srčanu disfunkciju u dijabetesu izazvanom streptozotocinom
2,5-5 mg/kg	Popravlja funkciju srca posle ishemije. Smanjuje apoptozu kardiomiocita i infarkt miokarda.
22,4 mg/kg	Produžava životni vek miševa na hiperkalorijskoj dijeti pojačavajući ekspresiju SIRT1
50-100 μ M	Inhibicija metaboličke aktivnosti i ćelijske proliferacije.
1- 100 μ M	Vazodilatacija

Na osnovu rečenog, možemo zaključiti da su dejstva rezveratrola mnogostruka. Samim tim postavlja se pitanje šta je ciljni molekul u dejstvu rezveratrola. Smatra se da postoji veliki broj molekula koji se nalaze intracelularno ili na površini ćelije preko kojih rezveratrol može da ostvari svoje dejstvo. Slika 8 prikazuje različite molekule kao mete dejstva rezveratrola.



Slika 8. Ciljni molekuli u dejstvu rezveratrola: kao farmakološki značajana supstanca, rezveratrol ima veliki broj ciljnih molekula unutar ćelije (slika preuzeta iz: Mukherjee i sar., 2010).

Farmakokinetika rezveratrola

Farmakokinetika rezveratrola ispitivana je u nekoliko studija na eksperimentalnim životinjama, kao i na zdravim dobrovoljcima. Jedna od prvih studija ovog tipa bila je na pacovima koji se gladovali tokom noći. Nakon perioda gladovanja, rezveratrol je primenjen oralno u dozi 2 mg/kg. Uzorci krvi iz kojih su se određivali pojedini farmakokinetički parametri uzimani su iz *v. saphena-e* u 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45 i 60 min. Nakon peroralne primene zaključeno je da se rezveratrol brzo resorbuje (resorpcija počinje već nakon 10 min), a određen nivo rezveratrola beleži se u krvi i nakon 60 min. Rezultati pokazuju da je maksimalna koncentracija *trans*-rezveratrola u plazmi (C_{max}) bila oko 550 ng/ml. Vreme potrebno da se postigne C_{max} (T_{max}) jeste oko 10 min. Poluvreme eliminacije *trans*-rezveratrola ($t_{1/2}$) iznosi oko 15 min. Nakon intenzivnog metabolizma *trans*-rezveratrola u jetri zabeleženo je da je koncentracija nepromenjenog *trans*-rezveratrola u venskoj krvi 3,4%, metabolita rezveratrol-glukuronida 16,8%, a koncentracija metabolita rezveratrol-sulfata

oko 0,3%. Opisani farmakokinetički parametri predstavljani su u tabeli 3. (Juana i sar., 2002).

Tabela 3. Farmakokinetički parametri nakon per os primene trans-rezveratrola (2 mg/kg) dobijeni nekompartmentskom i kompartmentskom analizom (Tabela prilagođena prema radu: Juana i sar., 2002.)

Parametar	Nekompartmentska analiza	Kompartmentska analiza
C _{max} (ng/ml)	586,77	514,21
T _{max} (min)	10,00	7,35
t _{1/2} (min)	15,09	13,23
Cl/F	0,116	0,139

C_{max}-maksimalna koncentracija u plazmi, T_{max}-vreme potrebno da se postigne maksimalna koncentracija u plazmi, t_{1/2}-poluvreme eliminacije, Cl/F-mera klirensa pri oralnoj primeni (Cl, klirens; F, biološka raspoloživost).

U jednoj od najnovijih studija tokom koje je ispitivana farmakokinetika rezveratrola, ovaj polifenol, kao i njegov prekursor 3,5,4-tri-O-acetilrezveratrol (TARES), primenjivani su putem intragastrične sonde kod pacova. Rezveratrol je primenjivan u dozi od 100 mg/kg (što je ekvimolarno sa 155 mg/kg TARES-a). Uzorci krvi za farmakokinetičku analizu u zapremini od 0,5 ml prikupljeni su u 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720 min nakon primene rezveratrola. Ovo je jedna od prvih studija koja opisuje distribuciju rezveratrola u organizmu (tabela 4) (Liang i sar., 2013).

Za razliku od moćnih i brojnih farmakodinamičkih efekata rezveratrola, zbog intenzivnog metabolizma u jetri i u zidu creva, biološka raspoloživost ovog polifenola je mala.

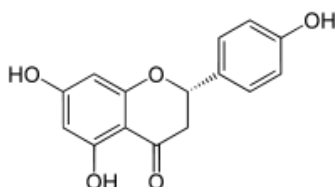
Tabela 4. Distribucija rezveratrola kod pacova nakon primene putem intragastrične sonde u različitim biološkim uzorcima (tabela preuzeta iz: Liang i sar., 2013)

Biološki uzorak	Koncentracija (g/ml)
Plazma	0,05-10,0
Želudac	0,1-10,0
Tanko crevo	0,1-10,0
Srce	0,05-5,0
Jetra	0,05-5,0
Slezina	0,05-5,0
Pluća	0,1-10,0
Bubreg	0,05-5,0
Mozak	0,01-1,0
Urin	0,01-1,0
Feces	0,01-1,0

Studija sprovedena tokom 2011. godine na miševima pokazala je da piperin, alkaloid iz crnog bibera, dovodi do inhibicije glukuronidacije rezveratrola u jetri. Na taj način dolazi do porasta biološke raspoloživosti rezveratrola (Johnson i sar., 2011). Opisana studija, kao i istraživanja koja ukazuju da različite formulacije mogu da povećaju liposolubilnost rezveratrola (Atanacković i sar., 2009), a posledično i biološku raspoloživost daju nadu u rešavanju prirodno niske biološke raspoloživosti rezveratrola.

5. Naringenin-predstavnik flavanona

Naringin, predstavnik flavanona, u prirodi se najčešće nalazi u obliku glikozida (49,5,7-trihidroksiflavanone-7-ramnoglukozid ili naringenin-7-ramnoglukozid, slika 9).



Slika 9. Hemijska struktura naringenina. (slika preuzeta: www.wikipedia.org)

Znatno je manje ispitivana supstanca od stilbena, rezveratrola. Prisutan je u visokoj koncentraciji u grejpfrotu (*Citrus paradisi*) i odgovoran je za gorak ukus soka od grejfruta. Procena je da 100 g grejfruta sadrži oko 50 mg naringenina. Koncentracija naringenina u plazmi osoba koje konzumiraju grejfrut variva između 0,7 i 14,8 μM . Pored grejfruta, naringenin se nalazi u soku od narandže i u kori paradajza. Međutim, konzumiranje soka od grejfruta može da obezbedi znatno višu koncentraciju naringenina u plazmi u odnosu na sok od narandže. Poznato je da naringenin ima pozitivne efekte na zdravlje: ima antioksidantno, antiinflamatorno i estrogensko dejstvo, pospešuje metabolizam karbohidrata i moduliše funkciju imunog sistema (Felgines i sar., 2000; Erlund i sar., 2001).

Farmakodinamija naringenina

Studije na eksperimentalnim životinjama, kao i epidemiološke studije pokazale su da flavonoidi iz citrusnog voća, gde spada i naringenin, mogu da imaju protektivno dejstvo u razvoju kardiovaskularnih bolesti i nekih vrsta maligniteta. Iako se flavonoidi proučavaju tokom poslednjih 50 godina, mehanizmi uključeni u njihovu biološku aktivnost još uvek nisu u potpunosti

poznati. Mnogi od farmakoloških svojstava flavonoida iz citrusa mogu biti povezana sa sposobnošću ovih jedinjenja da inhibiraju enzime koji su uključeni u proces aktivacije ćelija. Pokazano je da citrusni flavonoidi mogu da spreče formiranje novih malignih ćelija, kao i da blokiraju metabolizam postojećeg malignog tkiva (Benavente-García i Castillo, 2008).

Pored opisane antikancerske aktivnosti, epidemiološke studije su pokazale da je redovna primena flavonoida povezana sa smanjenim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Ovo dejstvo ostvaruju zahvaljujući antiagregacionom, antiishemijskom, antioksidacionom i vazorelaksantnom efektu. Pretpostavlja se da flavonoidi smanjuju rizik od nastanka srčanih bolesti na tri različita načina: pospešuju koronarnu vazodilataciju, smanjuju agregaciju trombocita i sprečavaju oksidaciju LDL-holesterola (Benavente-García i Castillo, 2008).

Takođe, proučavano je i njihovo antiinflamatorno dejstvo. Nekoliko ključnih istraživanja su pokazala da su antiinflamatorna svojstva citrusnih flavonoida zasnovana na inhibiciji sinteze i biološke aktivnosti različitih inflamatornih medijatora, uglavnom derivata arahidonske kiseline, kao što su prostaglandini E₂, F₂ i tromboksana A₂. Antioksidativna i antiinflamatorna svojstva citrusnih flavonoida mogu odigrati ključnu ulogu u njihovom delovanju protiv nekoliko degenerativnih bolesti, naročito protiv neuroloških oboljenja (Benavente-García i Castillo, 2008).

Na osnovu prethodnog, jasno je da naringenin ima više različitih intracelularnih molekula koji mogu da predstavljaju ciljne molekule preko kojih ovaj polifenol ostvaruje svoje dejstvo. U tabeli 5 prikazani su enzimi kao ciljni molekuli u dejstvu naringenina.

Pored opisanog, pojedine publikacije ukazuju na delovanje naringenina na jonske kanale ćeijske membrane.

Tabela 5. Dejstvo naringenina na različite enzime.

Sulfotransferaze	Interakcija	Doza	Referenca
SULT1A1	Značajna inhibicija	?	Nishimuta i sar., 2007
SULT1A3	Delimična inhibicija	?	Nishimuta i sar., 2007
Monoaminooksidaze	Interakcija	Doza	Referenca
MAO-B	Delimična inhibicija	IC ₅₀ =28 8 μM	Anna i sar., 2011
P-Glikoprotein	Interakcija	Doza	Referenca
P-Ggp	Inhibicija	?	Bansal i sar., 2008
Ksantin Oksidaza	Interakcija	Doza	Referenca
XO	Umerena inhibicija	IC ₅₀ =50- 100 μM	Naoghare i sar., 2010.
7bHSD2	Interakcija	Doza	Referenca
Oksidativna7bHSD2	50% inhibicije	IC ₅₀ =14. 4 μM	Schuster i sar., 2008.

Poznato je da BK_{Ca} kanali imaju značajnu ulogu u kontroli tonusa glatkih mišića krvnih sudova, menjajući svoju aktivnost u zavisnosti od intracelularne koncentracije jona Ca²⁺ (Nelson i Quayle, 1995). Nadalje, promena Ca²⁺ dovodi do aktivacije BK_{Ca} kanala, što predstavlja zaštitni mehanizam od prekomerne depolarizacije i vazokonstrikcije. Elektrofiziološkim metodama (*patch clamp* studije) pokazano je da naringenin dovodi do aktivacije ovih kanala u preparatima izolovane aorte i repne arterije pacova (Saponara i sar., 2006). Naringenin blokira i srčane HERG kanale, utičući na repolarizaciju kardiomiocita (Scholz i sar., 2005).

Farmakokinetika naringenina

Farmakokinetika naringenina ispitivana je na životinjskim modelima, kao i na zdravim dobrovoljcima. Choudhury i sar. (Choudhury i sar., 1999.) su pokazali da se naringenin resorbuje brzo iz želuca ili tankog creva, a da se maksimalna koncentracija (C_{max}) postiže nakon 40 min. Nakon metabolizma, glikozidi naringenina nisu detektovani ni u plazmi, ni u urinu. Pokazano je da su glavni metaboliti naringenina konjugati glukuronida i/ili sulfata. Hromatografski rezultati pokazuju da su isti metaboliti prisutni i u urinu, i u plazmi. Estri sulfata i naringenina čine oko 90% metabolita (Felgines i sar., 2000). Pored toga, naringenin se metaboliše i do fenolne kiseline koja može da se detektuje i u plazmi i u urinu (Booth i sar., 1958; Griffiths i Smith, 1972.). Interesantno je da se relativno visoki procenat naringenina metaboliše u intestinalnoj mikroflori (Griffiths i Barrow, 1972.).

Farmakokinetika naringenina je proučena i u dvostruko slepoj studiji sa randomizacijom i ukrštenim dizajnom, na zdravim dobrovoljcima ($n = 16$) (Bredsdorff i sar., 2010). Nakon konzumiranja voćnog soka merena je koncentracija naringenina u plazmi, određivani su njegovi metaboliti kao i eliminacija. Prosečna doza naringenina iznosila je 0,83 mg/kg. Dobijene vrednosti farmakokinetičkih parametara prosečno su iznosile:

- C_{max} - 0,12 μM ;
- T_{max} - 311 min;
- procenat oralno unetog naringenina koji je dokazan u urinu - 7%.
- AUC (0-600 min) - 18 $\mu\text{M} \times \text{min}$.

KALIJUMOVI KANALI KAO CILJNO MESTO ZA DELOVANJE LEKOVA

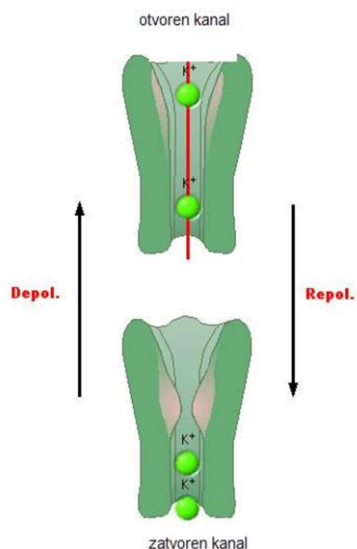
1. Struktura i funkcija K-kanala

Jonski kanali se sastoje iz proteinskih kompleksa koji formiraju poru, prostiru se kroz membranu i mogu se naizmenično zatvarati i otvarati. Brzina i pravac kretanja jona zavise od elektrohemijskog gradijenta koji se određuje na osnovu koncentracije jona sa obe strane membrane i od membranskog potencijala. Jonski kanali su selektivni za određenu vrstu jona. Ova selektivnost nije potpuna, međutim postoji velika razlika između pojedinih kanala u sprovođenju jona. Veličina jona nije presudna za selektivnost, jer u tom slučaju svi kanali bi mogli da sprovode najmanje jone. Selektivnost kanala određena je, prvenstveno, strukturom mesta za koje se vezuju joni unutar kanala (Gojković Bukarica i Kažić, 2004). Na slici 10 prikazan je jonski kanal koji može da bude u otvorenom ili zatvorenom stanju.

Kalijumovi kanali (K-kanali) su najbrojnija i najraznovrsnija grupa jonskih kanala koju kodira oko 70 različitih lokusa humanog genoma (Gutman i sar., 2005).

Različiti K-kanali nalaze se u membranama različitih ćelija, kao što su: srčane, mišićne, nervne, ćelije endokrinog pankreasa, pljuvačnih žlezda, hipofize, bubrega, jetre.... (Gojković Bukarica i Kažić, 2004). K-kanali su proteini koji igraju značajnu ulogu u regulaciji pasivnog toka jona K^+ kroz ćelijsku membranu. Regulacija protoka vrši se zahvaljujući konformacijskoj promeni proteina koja omogućava dva različita stanja ovog proteina: otvoreno i zatvoreno. To je dinamičan proces koji ne može u potpunosti da se objasni strukturom kanala (Haider, 2005). Njihova uloga u ćelijama je da: učestvuju u fazi repolarizacije ćelijske membrane ekscitabilnih ćelija, kao što su nervne i mišićne ćelije, uključujući i srčane ćelije; modulišu sinaptičku transmisiju; utiču na sekreciju hormona iz endokrinih ćelija (na primer iz beta ćelija pankreasnih

ostrvaca) i regulišu tonus glatkih mišića vaskularnog sistema (Ca^{2+} -zavisni K-kanali, voltažno-zavisni K-kanali) (Gojković-Bukarica i Kažić, 2004).



Slika 10. Aktivnost K-kanala (slika je dostupna na sajtu www.clubs.de)

K-kanali klasifikovani su u tri grupe, na osnovu broja transmembranskih domena koji ulaze u sastav α subjedinice: K-kanali sa dva, četiri i šest transmembranskih domena (Gojković-Bukarica i Kažić, 2004). Podela K-kanala prikazana je u tabeli 6.

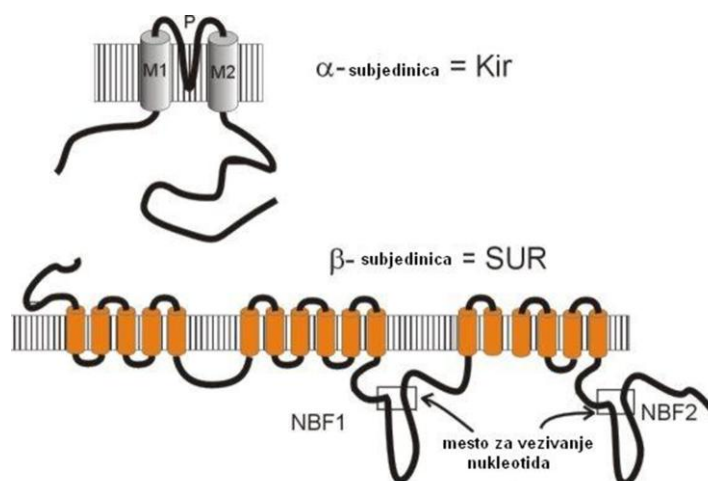
Alfa subjedinica sadrži poru, koja se nalazi u dva različita stanja (otvoreno ili zatvoreno) i selektivni filter koji je najodgovorniji za selektivno propuštanje K^+ jona. Selektivni filter sadrži glicin - tirozin - glicin sekvencu, a mutacija bilo koje aminokiseline u ovoj sekvenci dovodi do pada selektivnosti kanala (Maser i sar., 2002).

Tabela 6. Klasifikacija kalijumovih kanala

K-kanali sa dva TM domena	K-kanali sa četiri TM domena	K-kanali sa šest TM domena	
		K _V	K _{Ca}
K _{IR} 1.x	TWIK	K _V 1.x	K _{Ca} 1.x(BK)
K _{IR} 2.x	TREK	K _V 2.x	K _{Ca} 4.x (BK)
K _{IR} 3.x	TASK	K _V 3.x	K _{Ca} 5.x (BK)
K _{IR} 4.x	TALK	K _V 4.x	K _{Ca} 2.x (SK)
K _{IR} 5.x	THIK	K _V 7.x	K _{Ca} 3.x (IK)
K _{IR} 6.x	TRESK	K _V 10.x	
K _{IR} 7.x		K _V 11.x	
		K _V 12.x	

K-kanali=kalijumovi kanali; TM=transmembranski

Kanali sa dva transmembranska domena - ulazno ispravljajući K-kanali (Kir) su velika grupa kanala, koja je voltažno-nezavisna. Nađeni su u neuronima, srčanim i skeletnim mišićnim ćelijama i ćelijama epitela (Ashcroft FM, 2000). ATP senzitivni K-kanali (K_{ATP} kanali) pripadaju ovoj grupi K-kanala, a prvo su otkriveni na membrani miocita (gde im je gustina velika), a zatim u pankreasnim β-ćelijama, ćelijama glatkih i skeletnih mišića, moždanim ćelijama i nervnim završecima. Ovi kanali su oktameri sastavljeni od četiri Kir_{6x} proteina, a svaki od njih vezuje po jednu sulfonil-urea receptorsku subjedinicu (SUR1, SUR2A, SUR2B) (Antcliff i sar., 2005; Campell, 2003). Shematski prikaz K_{ATP} kanala, njegovih subjedinica (Kir i SUR) prikazan je na slici 11.



Slika 11. Shematski prikaz transmembranskih segmenata K_{ATP} kanala (izvor slike Bienengraeber i sar., 2004).

Imaju značajnu ulogu u povezivanju ćelijskog metabolizma sa ekscitabilnošću i možemo reći da predstavljaju metaboličke senzore ćelije. Kada je intacelularna koncentracija ATP u fiziološkim granicama, K_{ATP} kanali su zatvoreni (Hodgson i sar., 2003). Molekuli koji otvaraju ove kanale stvaraju se za vreme ishemije, pa samim tim omogućavaju izlazak jona K^+ iz ćelije. Otvaranje K_{ATP} kanala u ishemičnom miokardu smanjuje potrošnju energije i sprečava nagomilavanje jona Ca^{2+} . Upravo na ovim događajima se zasniva kardioprotektivna uloga K_{ATP} kanala za vreme ishemije (Gojković Bukarica i Kažić, 2004).

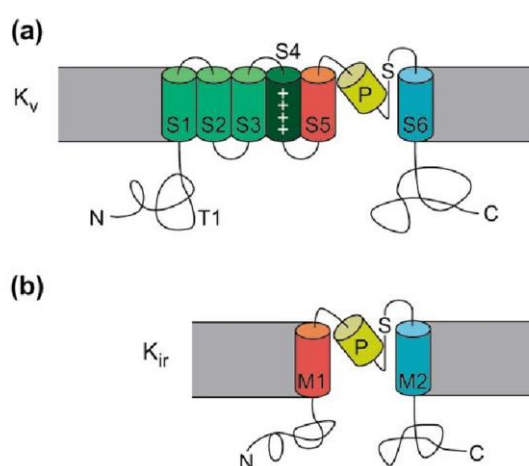
Pored značajne uloge u kardioprotekciji, K_{ATP} kanali imaju važnu ulogu u procesu vazodilatacije. Otvaranjem K_{ATP} kanala u vaskularnim, glatkim mišićnim ćelijama nastaje hiperpolarizacija ćelijske membrane i na indirektan način smanjuje se raspoloživost jona Ca^{2+} intracelularno. Kao krajnji efekt nastaje vazodilatacija (Kažić i Gojković Bukarica, 1999). Smanjenje broja K_{ATP} kanala u glatkim mišićnim ćelijama krvnog suda dovodi do lakšeg nastanka vazokonstrikcije i hipertenzije (Jahangir i Terzić, 2005).

Krajem XX veka, intenzivno je ispitivan protok jona K^+ kroz membranu mitohondrija. K_{ATP} kanali u unutrašnjoj membrani mitohondrija (mito K_{ATP} kanali) identifikovani su 1991. godine. Upravo ovi kanali igraju značajnu ulogu u moduliranju funkcija mitohondrija, preživljavanju ćelija i procesima ishemijskog prekondicioniranja. Njihova uloga u mitohondrijama povezana je sa oksidativnom fosforilacijom, produkcijom ATP i prometom jona Ca^{2+} (Holmuhamedov i sar., 1998).

Pored nabrojanog, poznata je uloga K_{ATP} -kanala sekreciji insulina iz β -ćelija pankreasa (Kažić i Gojković Bukarica, 1999.).

Kanali sa četiri transmembranska domena se često nazivaju K-kanali sa dve pore (K2p kanali). Čine ih četiri transmembranska domena (TM1 do TM4) i dve pore (P1 i P2). Terminalni N- i C-regioni postavljeni su intracelularno, a petlja između TM4 i P1 postavljena je ekstracelularno. To su voltažno-nezavisni kanali koji u fiziološkim uslovima (visoka koncentracija jona K^+ u citoplazmi, a niska ekstracelularno) sprovode jone K^+ iz ćelije u ekstracelularni prostor. Ovi kanali su pod jakom kontrolom niza hemijskih i fizičkih faktora kao što su: pO_2 u tkivima, pH ravnoteža, lipidni status, istezanja ćelijske membrane, neurotransmiteri i G-protein. Oni su odgovorni za održavanje membranskog potencijala u miru, odnosno pasivog provođenja jona K^+ u miru (Sano Y i sar., 2003). Eksperimentalnim radovima pokazano je da ovi kanali imaju važnu funkciju u neuronima. Za većinu pripadnika ove grupe određena je tačna lokacija u centralnom nervnom sistemu. Oni predstavljaju ciljno mesto za mnoge endogene molekule (Kim Y i sar., 2000). Pojedini predstavnici ove grupe eksprimiraju se u okviru specijalizovanih receptora za toplo i hladno koji se nalaze u ganglijama duž dorzalnih rogova kičmene moždine, kao i u hipotalamusu i učestvuju u procesima termoregulacije, odnosno aktiviraju se kao odgovor na toplotu. Takođe, eksperimentalno je pokazano da jonska struja koja nastaje u TREK-2 i TRAAK kanalima raste 20 puta kada se temperatura u vodenom kupatilu podigne sa $24^{\circ}C$ na $42^{\circ}C$ (Kang i sar., 2005).

Kanali sa šest transmembranskih domena su grupa K-kanala u koju ubrajamo dve velike podgrupe: voltažno-zavisne (K_v) i kalcijum-zavisne (K_{Ca}) kanale (Gojković-Bukarica i Kažić, 2004). U njihovu strukturu ulazi α subjedinica koja sadrži 6 ili 7 transmembranskih segmenata (S1-S6, S7), uključujući i pozitivno naelektrisan segment S4, koji predstavlja voltažni senzor. Struktura K_v i K_{ir} kanala prikazana je na slici 12.



Slika 12. Struktura (a) K_v - kanala i (b) K_{ir} kanala (slike preuzete sa sajta www.genomebiology.com)

K_v kanali su najveća grupa K-kanala, za koju je odgovorno oko 40 različitih gena, a mogu biti homotetrameri ili heterotetrameri sastavljeni iz različitih subjedinica koje pripadaju istoj familiji. Povezivanje α subjedinice sa pomoćnim subjedinicama modifikuje funkciju kanala. U pomoćne subjedinice ubrajamo: β subjedinicu, koja je prisutna u K_v1 i K_v2 kanalu, KCHIP1- nalazi se u K_v4 kanalu, kalmodulin u K_v10 kanalu i minK u $K_v1.1$ kanalu (Gutman i sar., 2005).

K_v kanali su otvoreni za vreme depolarizacije ćelijske membrane i omogućavaju kretanje jona K⁺ u pravcu koncentracijskog gradijenta. Većina vaskularnih mišića različitih životinjskih vrsta poseduje ove kanale. Za vreme plato faze akcionog potencijala (AP) u srcu izlazna struja jona K⁺ u ravnoteži je sa ulaznom strujom jona Ca²⁺, a za vreme repolarizacije, ova struja postaje sve jača i određuje trajanje repolarizacije (Katz, 1992).

Poseban značaj ima (pod)familija Kv11 koja ima tri člana: Kv11.1, Kv11.2 i Kv11.3 kanale. Pokazano je da Kv 11.1 kanali imaju bitnu ulogu u nastajanju nekih oblika srčanih aritmija koje su povezane sa naprasnom srčanom smrću, a da se ova (pod)familija razlikuje u strukturi od ostalih Kv kanala u nekoliko karakteristika. Prvo, sadrže tzv. CNBD domen, odnosno domen za vezivanje cikličnih nukleotida. Nekoliko studija je pokazalo da ovaj domen utiče direktno ili indirektno na aktivaciju Kv11.1 kanala. Druga bitna karakteristika ove (pod)familije jeste da N-terminalni kraj svih Kv11 kanala sadrži PAS domen koji je uključen u nekoliko transdukcionih mehanizama, a mutacija PAS domena povezana je sa poremećenom deaktivacijom kanala (Bronstein-Sitton, 2006).

Druga velika grupa kanala sa 6/7 transmembranskih domena su K_{Ca} kanali. Delimo ih na kanale koji: brzo sprovode jone (BK_{Ca}), srednjom brzinom sprovode jone (IK_{Ca}) i sporo sprovode jone (SK_{Ca}) (Wei i sar., 2005). BK_{Ca} kanali se nalaze u skoro svim ćelijskim tipovima (Ashcroft, 2000). BK kanali igraju glavnu ulogu u regulaciji kontraktilnosti glatkih mišića vaskularnog sistema (Morrow, 2006). Pored toga imaju važnu ulogu u ekcitabilnosti nervnih ćelija i oslobađanju neurotransmitera (Ashcroft, 2000). Postavlja se pitanje da li je za aktivaciju BK_{Ca} kanala potrebna promena potencijala ćelijske membrane i povećavanje koncentracije intracelularnog jona Ca²⁺ ili je dovoljno da se ostvari jedan od ova dva faktora? Jaka depolarizacija može da otvori kanal, čak i kada je niska [Ca²⁺]_i. Ukoliko je [Ca²⁺]_i visoka, dovoljna je mala promena voltaže koja će dovesti do otvaranja BK_{Ca} kanala. BK_{Ca} kanal je zatvoren na potencijalu

mirovanja ćelije, međutim, može se aktivirati nakon povećanja $[Ca^{2+}]_i$. Isto tako značajnu ulogu u aktivaciji kanala imaju neurotransmiteri i hormoni (Wei i sar., 2005). SK_{Ca} kanali imaju strukturu sličnu K_v kanalima. Međutim, SK_{Ca} kanali su voltažno-nezavisni (Ashcroft, 2000). Ovi kanali ne vezuju jone Ca^{2+} direktno, ali detektuju promenu u koncentraciji jona Ca^{2+} preko kalmodulina koji interreaguje sa COOH- terminalnim regionom polipeptidnog lanca SK_{Ca} kanala. Konformacijska promena koja nastaje pri vezivanju jona Ca^{2+} za kalmodulin dovoljan je signal za otvaranje ovih kanala (Wei i sar., 2005). Struktura IK_{Ca} kanala je slična strukturi SK_{Ca} kanala, osim što poseduju kraći N-kraj. Nalaze se u ćelijama glatkih mišića. IK_{Ca} kanali mogu biti otvoreni i kada je fiziološka $[Ca^{2+}]_i$, tj. potrebno je da se veže samo nekoliko jona Ca^{2+} za kanal da bi došlo do njegove aktivacije. (Ashcroft, 2000)

2. Kalijumove jonske struje

Protok jona kroz K-kanale dovodi do nastanka jonskih, tj. K-struja koje se međusobno razlikuju. Na osnovu podele K-kanala na osnovu strukture, jasno je da različiti podtipovi K-kanala proizvode različite K-struje. Svaka nastala struja ima ulogu u razvoju AP ekcitolabilnih ćelija.

Poznato je da se AP mišićne ćelije srca sastoji iz 5 faze: faza brze depolarizacije (faza 0), šiljak (faza 1-parcijalna repolarizacija), plato (faza 2-apsolutni refraktarni period), kompletna repolarizacija (faza3) iz koje ćelija ulazi u potencijal mirovanja (faza 4). Različiti K_v kanali mišićne ćelije srca proizvode nekoliko različitih jonskih struja: spora komponenta kasno-ispravljačke K-struje (IK_s), brza komponenta kasno-ispravljačke K-struje (IK_r), prolazna izlazna K-struja (I_{to}), ultra-brza struja (I_{Kur}). Pored toga, za nastanak AP srca odgovorna je i struja koja nastaje u K_{ir} kanalima (IK_{ir}), kao i u K_{ATP} kanalima (IK_{ATP}). Poznato je da I_{to} ima značaj u fazi 0 i 1, IK_s u drugom delu faze 2 i tokom faze 3 (tokom prve polovine faze 2 značaj imaju voltažno-zavisni Ca- kanali i jonska

struja koja nastaje u njima), IKr u fazi 3, IKir u fazi 4, tj. u potencijalu mirovanja ćelije. Tokom čitavog AP razvija se IK_{ATP} (Giudicessi, 2012).

3. Ekspresija K-kanala

U okviru ovog poglavlja, zbog obimnosti podataka i preglednosti, ekspresija K-kanala po tkivima prikazana je tabelarno (tabele 7-10).

Tabela 7. Ekspresija K_{ir} kanala po tkivima (tabela pripremljena prema Kubo i sar. 2005).

Kanal	Distribucija	Kanal	Distribucija	Kanal	Distribucija
K _{ir} 1.1	Bubrezi, skeletni mišići, pankreas, slezina, mozak, srce i jetra	K _{ir} 3.1	Nervno tkivo, srce	K _{ir} 4.2	Bubrezi, pankreas, jetra, pluća, testisi
K _{ir} 2.1	Mozak, srce, skeletni mišići, endotelne ćelije	K _{ir} 3.2	Mozak, pankreas	K _{ir} 5.1	Bubrezi, pankreas, retina, jetra, slezina, testisi, nervno tkivo
K _{ir} 2.2	Mozak, skeletni mišići, bubrezi, srce	K _{ir} 3.3	Mozak	K _{ir} 6.1	Vaskularni glatki mišići
K _{ir} 2.3	Nervno tkivo, srce, bubrezi	K _{ir} 3.4	Mozak, srce	K _{ir} 6.2	Pankreasne β ćelije, srce, skeletni mišići, mozak
K _{ir} 2.4	Mozak, srce, retina	K _{ir} 4.1	Retina, bubrezi, gljalne ćelije	K _{ir} 7.1	Bubrezi, pluća, prostata, testisi, tanko crevo

Tabela 8. Ekspresija K_{Ca} kanala po tkivima (tabela pripravljena prema Wei i sar., 2005)

Kanal	Distribucija	Kanal	Distribucija	Kanal	Distribucija
K_{Ca} 1.1	Mozak, skeletni i glatki mišići, pankreas, bubrezi, kolon	K_{Ca} 2.3	Mozak, limfociti, skeletni mišići, miometrijum, prostata, bubrezi, srce, jetra, pankreas, endotelne ćelije	K_{Ca} 4.2	Mozak, srce
K_{Ca} 2.1	Mozak, aorta, tumorske ćelije	K_{Ca} 3.1	Placenta, prostata, eritrociti, limfociti, jetra, pankreas, glatki mišići, endotel	K_{Ca} 5.1	Testisi, spermatozoidi
K_{Ca} 2.2	Mozak, prostata, pluća, jetra, srce, skeletni mišići, miometrijum	K_{Ca} 4.1	Mozak, testisi, bubrezi,		

Tabela 9. Ekspresija K_V kanala (tabela formirana na osnovu: Gutman i sar., 2003)

Kanal	Distribucija	Kanal	Distribucija	Kanal	Distribucija
K_V 1.1	Mozak, srce, retina, skeletni mišići, vaskularni endotel i glatki mišići	K_V 4.1	Mozak, srce, kolon, pluća, želudac, testis, jetra, pankreas	K_V 9.1	Mozak, melanociti, očno sočivo,
K_V 1.2	Mozak, srce, kičmena moždina, retina, vaskularni endotel i glatki mišići	K_V 4.2	Mozak, Purkinje ćelije	K_V 9.2	Mozak, retina, kičmena moždina,
K_V 1.3	Mozak, pluća, timus, slezina, limfni čvorovi, fibroblasti, limfociti, vaskularni	K_V 4.3	Srce, mozak, glatki mišići	K_V 9.3	Mozak, kolon, srce, mišići, bubrezi, želudac, uterus

glatki mišiči

Kv1.4	Mozak, skeletni mišiči, srce, pancreas, vaskularni gladki mišiči	Kv5.1	Mozak, srce, skeletni mišiči, jetra, bubrezi, pankreas	Kv10.1	Mozak, skeletni mišiči, bubrezi, maligne čelije
Kv1.5	Aorta, kolon, bubrezi, želudac, gladki mišiči, plućna arterija, mozak	Kv6.1	Skeletni mišiči, mozak, uterus, pancreas, bubrezi, placenta, kosti, prostate, koža	Kv10.2	mozak
Kv1.6	Mozak, kolon, srce, pluća, ovarijum, testisi, vaskularni gladki mišiči	Kv6.2	Miociti, mozak, germinativne čelije	Kv11.1	Srce, mozak, krvne čelije, bubrezi, jetra, pluća, pankreas, testisi, ovarijumi, uterus, tanko crevo
Kv1.7	Placenta, skeletni mišiči, srce, plućna arterija	Kv6.3	Mozak, kičmena moždina, testis, tanko crevo, timus	Kv11.2	Mozak, uterus
Kv1.8	Bubrezi, mozak, srce, skeletni mišiči, nadbubrežna žleza	Kv6.4	Mozak, jetra, tanko crevo, kolon	Kv11.3	Mozak, simpatičke ganglije
Kv2.1	Mozak, srce, skeletni mišiči, retina, oči, pluća	Kv7.1	Srce, bubrezi, rectum, pancreas, pluća, placenta	Kv12.1	Simpatičke ganglije, testisi, mozak, pluća, uterus
Kv2.2	Mozak, simpatički nervi, gladka muskulatura GITa, mezenterična arterija	Kv7.3	Srce, retina, testis, kolon	Kv12.2	Mozak, pluća, oči
Kv3.1	Mozak, skeletni miošiči, pluća, testis, limfociti	Kv7.4	Placenta, kohlea, vestibularni organ, mozak	Kv12.3	Mozak, jednjak, pluća
Kv3.2	Mozak, mezenterična	Kv7.5	Mozak, simpatičke ganglije, skeletni mišiči		

arterija, Švanove ćel.

Kv3.3	Mozak, Purkinjeve ćelije, kornea, očno sočivo	Kv8.1	Mozak, bubrezi
Kv3.4	Paratiroidne žlezde, prostate, mozak, skeletni mišići, pancreas	Kv8.2	Pluća, jetra, pancreas, slezina, timus, prostata, kolon, testis, ovarijum

Tabela 10. Ekspresija K_{2P} kanala po tkivima (tabela pripremljena prema Goldstein i sar., 2005)

Kanal	Distribucija	Kanal	Distribucija	Kanal	Distribucija
K _{2P} 1.1	Mozak, srce, pluća, bubrezi, jetra, placenta	K _{2P} 6.1	Pankreas, placenta, srce	K _{2P} 13.1	Mozak, srce, pluća, bubrezi, jetra, slezina
K _{2P} 2.1	Mozak, srce	K _{2P} 7.1	Mozak, retina	K _{2P} 15.1	Mozak, srce, pluća, bubrezi, jetra, pankreas
K _{2P} 3.1	Mozak, srce, pluća, bubrezi, tanko crevo, kolon, pankreas, prostata, uterus, placenta	K _{2P} 9.1	Mozak	K _{2P} 16.1	Srce, pluća, jetra, pankreas, placenta
K _{2P} 4.1	Mozak, bubrezi, tanko crevo, placenta, prostata,	K _{2P} 10.1	Bubrezi, pankreas, prostata, timus, jetra, srce	K _{2P} 17.1	Srce, pluća, jetra, pankreas, placenta
K _{2P} 5.1	Mozak, bubrezi, jetra, tanko crevo, pankreas, placenta	K _{2P} 12.1	Mozak, srce, pluća, bubrezi, jetra, tanko crevo, kolon, pankreas, prostata, placenta, slezina, timus, jajnici	K _{2P} 18.1	Mozak, kičmena moždina, testisi

4. Kanalopatije K-kanala

Danas se zna da su mutacije gena koje su odgovorne za pojavu kanalopatija K-kanala u sklopu mnogih oboljenja. Zbog obimnosti podataka koji nas upućuju na povezanost različitih K-kanalopatija i oboljenja, u okviru ovog poglavlja ukazujemo na značaj K-kanalopatija u razvoju aritmija, vaskularne disfunkcije, hipertenzije i metaboličkih oboljenja.

Značaj kanalopatija u razvoju aritmija

Fridrih Majsner je 1856. godine opisao slučaj devojčice koja je umrla nakon akutnog emotivnog stresa. Devojčica Steinin rođena je gluva, kao i njena dva rođena brata koja su takođe umrla od posledice emotivnog stresa. Opis slučaja je zabeležen 100 godina pre nego što se otkrio entitet koji je nazvan *long QT sindrom* (LQT sindrom). Kasnije su opisane porodice u kojima se javljao produžen QT interval, koji se manifestovao pojavom sinkopa. Genetska osnova pojave LQT sindrom identifikovana je tokom 1995. i 1996. godine. Poznato je da su mutacije gena koji su odgovorni za sintezu pojedinih subjedinica K-kanala odgovorne za pojavu kanalopatija koje se manifestuju pojavom različitih oboljenja, kao što su aritmije, poremećaj adaptacije srčanog mišića na različite oblike stresa, pojave neonatalnog dijabetes mellitusa, kongenitalnog hiperinsulinizma, epilepsije ili miopatije (Perrin, 2008). Klasifikacija srčanih aritmija na osnovu K-kanalopatije, odnosno mutacije gena koji su odgovorni za sintezu pojedinih subjedinica K-kanala prikazana je u tabeli 11.

Budući razvoj molekularne medicine trebalo bi da nam omogući efikasniju terapiju oboljenja vezanih za kanalopatije (Giudicessi, 2012).

Tabela 11. Klasifikacija srčanih aritmija na osnovu K-kanalopatija.

Gen	Jonska struja	K-kanal	Poremećaj funkcije K-kanala	Sindrom	Način nasleđivanja kanalopatije
KCNQ1	I_{Ks}	K_V	↓	LQT1 (RWS)	AD
KCNQ1	I_{Ks}	K_V	↓	LQT1 (JLN)	AR
KCNQ1	I_{Ks}	K_V	↑	SQT2	AD
KCNQ1	I_{Ks}	K_V	↑	FAF2	AD
KCNE1	I_{Ks}	K_V	↓	JLN2	AR
KCNE1	I_{Ks}	K_V	↓	LQT5	AD
AKAP9	I_{Ks}	K_V	↓	LQT11	AD
KCNH2	I_{Kr}	K_V	↓	LQT2	AD
KCNH2	I_{Kr}	K_V	↑	SQT1	AD
KCNH2	I_{Kr}	K_V	↑	FAF2	AD
KCNE2	I_{Kr}	K_V	↓	LQT6	AD
KCNJ2	I_{Kir}	K_{ir}	↑	SQT3	AD
KCNJ2	I_{Kir}	K_{ir}	↑	FAF4	AD
KCNJ2	I_{Kir}	K_{ir}	↓	LQT7 (ATS)	AD
KCNJ8	I_{KATP}	K_{ATP}	↑	BrS8	AD
KCNJ8	I_{KATP}	K_{ATP}	↑	ERS	AD
KCNE3	I_{to}	K_V	↓	BrS5	AD
KCND3	I_{to}	K_V	↑	BrS9	AD

I_{Ks} -spora komponenta kasno-ispravljačke K-struje koja nastaje u voltažno-zavisnim K-kanalima (K_V); I_{Kr} -brza komponenta kasno-ispravljačke K-struje koja nastaje u voltažno-zavisnim K-kanalima (K_V); I_{Kir} -K-struja nastala u ulazno

ispravljačkim K-kanalima (Kir); IKATP-K⁺ struja nastala u ATP senzitivnim K-kanalima; Ito-prolazna izlazna K-struja koja nastaje u voltažno-zavisnim K-kanalima(KV); ↓-smanjena funkcija K-kanala; ↑-pojačana funkcija K-kanala; LQT-long QT sindrom; RWS-Roman-Ward sindrom; JLN- Jervall-Lange-Nielsen sindrom; SQT-skraćen QT sindrom; FAF-porodična atrijalna fibrilacija; ATS-Andersen-Tawil-ov sindrom; BrS-Brugada sindrom; ERS-sindrom rane repolarizacije; AD-autozomno-dominantno nasleđivanje; AR-autozomno-recesivno nasleđivanje.

Značaj K-kanalopatija u razvoju hipertenzije

Esencijalna hipertenzija je čest oblik hipertenzije. Mehanizam(mi) razvoja esencijalne hipertenzije nisu poznati. Najnovija istraživanja iz 2013. godine ukazuje na postojanje povezanosti K-kanalopatija i hipertenzije. Tako, razvoj primarnog aldosteronizma kod eksperimentalnih životinja i kod čoveka nastaje kao posledica mutacije gena *HERG* i *KCNJ5*. Mutacije *KCNJ5* gena uzrokuju bilateralni, porodični primarni aldosteronism. Somatske *KCNJ5* mutacije se javljaju u oko 40% adenoma koji proizvode aldosteron, a povezani su sa mlađom životnom dobi, ženskim polom, težim primarnim aldosteronism i histološkim promenama u zoni fasciculata nadbubrega. *KCNJ5* mutacije dovode do smanjenja selektivnosti filtera kanala za K⁺ jone, povećanog ulaska jona Na⁺ i Ca²⁺ i povećanja ekspresije gena koje kontrolišu sintezu aldosterona. (Stowasser, 2013). Pokazano je da različite mutacije ovog gena koji je odgovoran za ekspresiju Kir3.4 kanala utiču na visinu arterijskog krvnog pritiska (Tabela 12) (Scholl i sar., 2012).

Pokazano je da delecija gena koji su odgovorni za sintezu subjedinica TASK-1 i TASK-3 K_{2P} kanala kod miševa (T1T3KO) proizvodi model ljudske esencijalne hipertenzije (Guagliardo i sar., 2012). Opisana istraživanja ukazuju da bi jedan od mehanizama u razvoju esencijalne hipertenzije mogao da bude i kanalopatija različitih K-kanala.

Tabela 12. Povezanost različitih mutacija Kir3.4 kanala sa vrednostima arterijskog krvnog pritiska. (Tabela preuzeta iz: Scholl i sar., 2012)

Subjedinica kanala	Mutacija	Visina krvnog pritiska
767-1	G151R	174/85
767-2	G151R	120/70
767-3	G151R	130/90
409-1	G151R	127/80
1486-1	G151E	135/85
1486-2	G151E	153/94
1486-3	G151E	130/nije dostupan podatak
1486-4	Nije dostupan podatak	160/120
124-1	G151E	Visok
124-2	G151E	Visok

Značaj K-kanalopatija u disfunkciji kronih sudova

Detaljni mehanizmi endotelne disfunkcije koja postoji u hipertenziji, diabetes mellitusu i hiperholesterolemiji još uvek nisu razjašnjeni. Ipak, opšte je prihvaćeno da smanjena sinteza NO uvek prati endotelnu disfunkciju (Yetik-Anacak i Catravas, 2006) što dovodi do oslabljene regulacije vaskularnog tonusa. Vaskularna disfunkcija može biti posledica smanjene funkcije K-kanala.

Pokazano je da kod spontano hipertenzivnih pacova, postoji povećana aktivnost BK_{Ca} kanala, kao i povećan influks Ca²⁺ jona u glatkim mišićnim ćelijama femoralne arterije (Asano i sar, 1995.). U istom eksperimentalnom modelu, inhibicija BK_{Ca} kanala specifičnim blokatorima uzrokuje jaku

depolarizaciju i suženje aorte (England i sar. 1993), mezenterične arterije (Cox i sar., 2001) i cerebralne arterije (Liu i sar., 1997).

Porast protoka jonske struje kroz BK_{Ca} kanal u glatkim mišićnim ćelijama tokom hipertenzije uključuje povećanu ekspresiju α -i β 1-podjedinice i porast mirovnog membranskog potencijala glatke mišićne ćelije krvnih sudova ograničavajući dalje povećanje vaskularnog tonusa (Liu i sar, 1997; Navarro-Antolin i sar., 2005; Chang i sar., 2006). Rezultati elektrofizioloških merenja potvrđuju porast jonske struje BK_{Ca} kanala u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova što verovatno proizilazi iz duže otvorenosti ovih kanala tokom hipertenzije (Rusch i sar., 1992; Martens i Gelband, 1996). Međutim, hipertenzija izazvana angiotenzinom kod pacova povezana je sa nishodnom regulacijom β 1-podjedinice u glatkim mišićnim ćelima i kasnijim smanjenjem sposobnosti jona Ca²⁺ da aktiviraju BK_{Ca} kanale (Amberg i sar., 2003). Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim na „ β 1-knock out“ miševima kod kojih je skraćeno vreme tokom kojeg su BK_{Ca} kanali otvoreni (Brenner i sar., 2000.). Uzevši prethodno u obzir, jasno je da složene abnormalnosti u funkcionisanju BK_{Ca} kanala koje nastaju kao posledica kanalopatije BK kanala mogu da budu uzrok nastanka vaskularne disfunkcije.

U aterosklerotičnim promenama humanih koronarnih arterija vreme tokom kojeg su BK_{Ca} kanali otvoreni je duže nego u mišićnim ćelijama medije krvnog suda (Wiecha i sar.1997). Bolotina (1991) je pokazao da aterosklerotični segmenti humane aorte sadrže dve različite vrste BK_{Ca} kanala, za razliku od zdravog krvnog suda u kojem se eksprimira samo jedna vrsta.

Takođe, senzitivnost BK_{Ca} kanala za jone Ca²⁺ u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova smanjena je kod postojanja *diabetes mellitus*a i povezana je sa smanjenom ekspresijom pomoćne β 1-subjedinice (McGahon i sar., 2007). Promene u molekularnoj strukturi BK_{Ca} kanala dovode do pojave vazokonstrikcije, i odgovorne su za pojavu hipertenzije u sklopu *diabetes mellitus*-a.

Značaj K-kanalopatija u razvoju metaboličkih oboljenja

Mutacije gena KCNJ11 odgovornog za ekspresiju Kir6.2 subjedinice i ABCC8 odgovornog za ekspresiju SUR1 subjedinice K_{ATP} kanala dovode do poremećaja u sekreciji insulina i metabolizmu glukoze. Mutacije koje dovode do gubitka funkcije ovih kanala dovode do hiperinsulinemije koja se manifestuje već u ranom detinjstvu. Najčešći uzrok pojave ovog oboljenja jeste mutacija ABCC8 gena (SUR1 subjedinice). Tip I ovih mutacija dovodi do smanjenja broja ovih kanala na ćelijskoj membrani, dok tip II mutacija smanjuje vreme otvorenosti kanala koji su prethodno ispravno formirani. Mutacije KCNJ11 (Kir6.2) manje su čest uzrok nastanka hiperinsulinemije i rezultiraju nižom aktivnošću kanala. Mutacije koje dovode do povećane aktivnosti K_{ATP} kanala na β ćelijama pankreasa dovode do hiperpolarizacije β -ćelija i smanjenja sekrecije insulina, a posledica njihovog postojanja jeste pojava neonatalnog *diabetes mellitus*a. Mutacije klastera koji se nalaze u blizini mesta za vezivanje ATP-a na K_{ATP} kanalu, smanjuju afinitet za vezivanje ATP-a.

Postoje indicije da je polimorfizam gena koji je odgovoran za ekspresiju K_{ATP} kanala povezan sa pojavom *diabetes mellitus*a tipa II kod odraslih. Funkcionalne studije su pokazale da su pojedine genske varijante K23 alela za povećanu otvorenost K_{ATP} kanala što dovodi do smanjene osetljivosti kanala na ATP. Oboljenja povezana sa mutacijama K_{ATP} kanala prikazana su u tabeli 13. (Olson i Terzic, 2010).

Tabela 13. Oboljenja koja su povezana sa mutacijom gena koji su odgovorni za kodiranje K_{ATP} kanala (tabela prilagođena prema: Olson i Terzić, 2010).

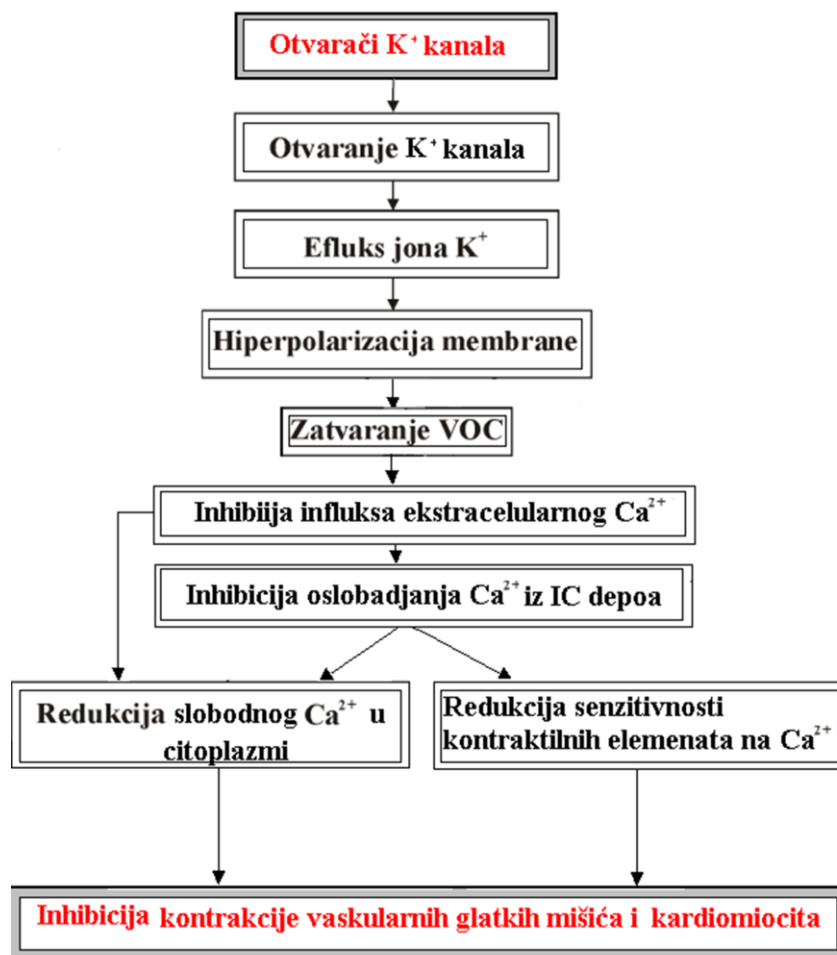
Gen na kojem se javlja mutacija	Oboljenje
ABCC8	Porodična hiperinsulinemija sa posledičnom hipoglikemijom, tip I
KCNJ11	Porodična hiperinsulinemija sa posledičnom hipoglikemijom, tip II
ABCC8 i KCNJ11	Neonatalni diabetes mellitus (permanentni i tranzitorni)
ABCC9	Kardiomiopatija i/ili atrijalna fibrilacija

POLIFENOLI KAO MODULATORI K-KANALA U KRVNIM SUDOVI

Prvi radovi o ulozi K-kanala kao ciljnom mestu za dejstvo lekova proistekli su iz naše laboratorije još pre dvadeset pet godina. U međuvremenu, rezultati koje smo postigli svstavaju našu laboratoriju u jednu od vodećih za proučavanje uloge kalijumovih kanala u krvnim sudovima (Kažić i Gojković-Bukarica, 1998).

Sve modulatore K-kanala možemo da podelimo na blokatore i otvarače kanala. Antiaritmici III grupe blokiraju K-kanale koji učestvuju u repolarizaciji i na taj način produžavaju trajanje AP, suprimiraju pojavu aritmija i smanjuju normalni automatizam srčanih ćelija. Većina lekova koja blokira ove kanale interreaguje i sa β adrenergičkim receptorima i sa drugim jonskim kanalima. Najvažniju ulogu u repolarizaciji imaju K_v kanali (Hardman, 2011). Aktivacija

bilo koje vrste kalijumske stuje u vaskularnim glatkim mišićima dovodi do hiperpolarizacije ćelijske membrane i nastanka vazodilatacije (slika 13).



Slika 13. Mehanizam dejstva otvarača kalijumovih kanala (izvor slike: Gojković Bukarica, 2011).

Supstance koje se zajedničkim imenom nazivaju *otvarači K-kanala* (OKK) imaju isto mesto dejstva: K_{ATP} kanale. Prva sintetisana supstanca iz ove grupe bila je kromakalim, a njegov mehanizam dejstva opisan je 1986. godine. Dejstvo pinacidila i levkromakamila istipivano je i na izolovanoj veni porte kunića u našoj laboratoriji (Gojkovic-Bukarica i Kazic, 1999.). Ovoj grupi lekova, pored novosintetisanih supstanci, priključeni su i neki stari vazodilatatori kao što su diazoksid i minoksidil. OKK su zauzeli značajno mesto u terapiji

kardiovaskularnih oboljenja kada je opisano da neki od njih imaju važnu ulogu u terapiji ishemijske bolesti srca, srčane insuficijencije, hipertenzije i aritmija (Kažić i Gojković-Bukarica, 1999.). U kardiohirurgiji, za vreme bajpas operacije i za vreme transplatacije srca, OKK mogu predstavljati glavni sastojak kardioplegičnih rastvora.

Do danas je poznato da u vaskularnim glatkim mišićima postoji četiri glavna tipa K-kanala: BK_{Ca} , K_{ATP} , K_V i Kir kanali.

Poslednjih desetak godina, eksperimentalnim radom u našoj laboratoriji pokazano je da je rezveratrol modulator kalijumovih kanala. U eksperimentima u *in vitro* uslovima, na životinjskim i humanim krvnim sudovima pokazano je da rezveratrol možemo da svrstamo u grupu OKK. Rezultati eksperimentalnog istraživanja pokazuju da je ovaj polifenol snažan vazodilatator i antivazokonstriktor, a da ove svoje osobine ostvaruje delimično otvaranjem K-kanala. Vrsta K-kanala koju rezveratrol moduliše zavisi od vrste tkiva (Gojković Bukarica i sar., 2008; 2011; Novaković i sar., 2006a; 2006b). Dobijeni rezultati mogu da budu od značaja u razvoju rezveratrola kao leka u terapiji različitih oboljenja perifernih krvnih sudova.

1. Polifenoli kao modulatori K_{ATP} kanala u krvnim sudovima

Dejstvo polifenola na K_{ATP} kanale krvnih sudova istražena su u maloj meri. Ogata i sar. (1997) opisali su da genistein inhibira K_{ATP} kanale portne vene kunića. Jin i sar. opisali su da polifenoli iz zelenog čaja smanjuju aktivnost K_{ATP} kanala. Zanimljivo je da su pokazali da polifenoli zelenog čaja u visokim koncentracijama direktno blokiraju K_{ATP} kanal, dok niske koncentracije polifenola dovode do smanjene aktivnosti K_{ATP} kanala. Sa druge strane polifenol iz čaja „Rooibos“ dovodi do vazodilatacije kod anestetisanih pacova, a kao moguć mehanizam dejstva navodi se aktivacija vaskularnih K_{ATP} kanala (Jin sar., 2007).

2. Polifenoli kao otvarači BK_{Ca} kanala u kromim sudovima

Kao što je objašnjeno, aktivacija BK_{Ca} kanala je dobro uspostavljen mehanizam vazorelaksacije. Dejstvo polifenola na BK_{Ca} kanale je detaljno proučeno. Xu i sar. su pokazali da kemferol vrši deo svoje vazodilatatorne aktivnosti putem aktivacije BK_{Ca} kanala (Xu i sar., 2007). Slični rezultati su prikazani za mnoge druge polifenole. Tako, na primer, dioklein, flavonoid izolovan iz korena mahunarke koju koriste Indijanci, *Dioclea grandiflora*, uzrokuje hipotenziju kod normotenzivnih pacova. Istraživanja koja su vršena na izolovanoj mezenteričnoj arteriji pacova pokazala su da polifenoli dovode do vazorelaksacije aktivirajući BK_{Ca} u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova (Côrtes i sar., 2001). Pored toga, Saponara i sar. pokazao je da naringenin dovodi do vazodilatacije aortnog prstena pacova aktivacijom BK_{Ca} kanala (Saponara i sar., 2006). Slične efekte imaju i proantocijanidi, rezveratrol, katehin i ostali (Nagaoka i sar., 2007; Romano i sar., 2009; Gao i sar., 2007; Kuhlmann i sar., 2005; Dal i sar., 2008; Cogolludo i sar., 2007). Možemo zaključiti da je aktivacija BK_{Ca} kanala krvnih sudova jedan od vodećih mehanizama kojima polifenoli dovode do vazorelaksacije i utiču na smanjenje krvnog pritiska.

3. Dejstvo polifenola na K_V kanale kromih sudova

Dejstvo polifenola na K_V kanale analizirano je u mnogim laboratorijama širom sveta. Pored toga, opisano je da genistein inhibira K_V kanale (Ko i sar., 2009). Analizirajući učinke procijanida, Kim i sar. pokazali su da vazodilatatorno dejstvo može nastati usled aktivacije K_V kanala (Kim i sar., 2000). Iwasaki-Kurashige i sar. prikazali su da koncentrat ribizle vrši vazodilataciju aktivacijom K_V kanala (Iwasaki-Kurashige i sar., 2006). Dalje, Matsui i sar. opisali su da procijanidi iz jabuke dovode do dilatacije aorte pacova verovatno aktivacijom nekoliko različitih vrsta K-kanala (Matsui i sar., 2009). Predložen mehanizam vazodilatacije za amentoflavone, kolaviron, pinocembrin, luteolin i kardamonin jeste sinergističko aktiviranje K-kanala i

blokiranje Ca-kanala (Zhu i sar., 2007; Adaramoye i sar., 2009; Kang i sar., 2004; Jiang i sar., 2005; Fusi i sar., 2010). Dejstvo polifenola na aktivnost K-kanala prikazana je u tabeli 14.

Tabela 14. Polifenoli kao modulatori K-kanala (tabela pripremljena prema Scholz i sar, 2010)

Jonska struja	Polifenoli kao modulatori K-kanala
I_K	Amentoflavon, kardamonin, kolaviron, luteolin, pinocebrin
BK_{Ca}	Dioclein, epigalokatehin kempferol, naringenin, proantocianidini, puerarin, kvercetin, rezveratrol
K_{ATP}	Hrizoeriol, epikatehin, genistein, epigalokatehin
K_V	Delfinidin, genistein, procianidi, tilianin, rezveratrol

4. Klinički značaj polifenola kao modulatora K-kanala

Nasuprot tome što je raznovrsnost lekova koji se koriste u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja porastao tokom poslednjih dvadeset godina, infarkt miokarda i moždani udar još uvek predstavljaju prvi uzrok smrtnosti u razvijenim zemljama. Tokom poslednjih godina proučavanje patogeneze ateroskleroze i prpratnih događaja dalo je nove informacije koje imaju klinički značaj i predstavljaju polje na kojem će se razvijati novi lekovi (ili su oni već u razvoju). Međutim, momenat kada će se novi lekovi naći na tržištu još uvek je daleko. Stoga se sve veći značaj daje zdravom načinu ishrane, koji između ostalog podrazumeva dnevni unos velike količine polifenola. Pojedini predstavnici polifenola (npr. rezveratrol) već se primenjuju kao suplementi, a studije koje će ukazati na klinički značaj pojedinih polifenola su u toku.

Jonski kanali u kardiovaskularnom sistemu prepoznati su kao važna ciljna mesta u ostvarivanju efekata različitih polifenola. Trenutno, značajna količina dokaza ukazuje da mnogi polifenoli pokazuju antihipertenzivne učinke bilo inhibicijom Ca-kanala i/ili aktiviranjem K-kanala krvnih sudova. Značaj modulacije jonskih kanala u srcu još uvek nije potpuno jasan. Do ove nejasnoće dovodi činjenica da većina polifenola istovremeno deluje na nekoliko različitih jonskih kanala. Stoga za većinu polifenola ne možemo sa sigurnošću da tvrdimo da li imaju anti- ili proaritmicko dejstvo. Sa druge strane, s obzirom da polifenoli čine mnogobrojnu grupu različitih jedinjenja koje se istovremeno nalaze u namirnicama, još uvek ne možemo sa sigurnošću da tvrdimo da li sinergističko dejstvo pojedinih predstavnika ima veći značaj od efekata pojedinačnih polifenola. Da bismo mogli da govorimo o kliničkom značaju polifenola kao lekova u terapiji hipertenzije, aritmija i/ili drugih oboljenja kardiovaskularnog sistema neophodno je sačekati rezultate velikih, multicentričnih kliničkih studija. Njihov klinički značaj porašće kada se na osnovu dokaza (*evidence-based medicine*) definiše njihova optimalna dnevna doza, režim doziranja, poboljša njihova biološka raspoloživost, odrede potencijalni neželjeni efekti posebno u slučaju njihove dugotrajne primene, interakcije sa brojnim lekovima, itd. Pre svega ovoga, neophodno je odrediti ciljnu grupu/e pacijenata koja će imati koristi od primene polifenola.

IZOLOVANI KRVNI SUDOVI KAO MODEL ZA FARMAKOLOŠKA ISTRAŽIVANJA: SLIČNOSTI I RAZLIKE IZMEĐU ARTERIJSKIH I VENSKIH KRVNIH SUDOVA

Krvni sudovi različitih organa mogu različito odgovoriti na dejstvo istih supstanci i lekova. Takođe, to može biti slučaj i u odgovoru pre- i postkapilarnog vaskularnog sistema, tj. venskog i arterijskog sistema. Istraživanja koja ukazuju na anatomske i fiziološke razlike između arterija i vena stara su

više od 50 godina. Najveći značaj u ostvarenju različitog odgovora arterija i vena na brojne vazokonstriktore i vazodilatatore daje se funkciji endotela, što su među prvima pokazali Vanhoutte i njegov saradnik Mey davne 1982. godine. Eksperimente su izvodili na izolovanim venskim i arterijskim krvnim sudovima psa (*a. i v. femoralis*, *a. i v. pulmonaris*, *a. i v. saphena*, *a. i v. splenica*). Iako je od ranije bilo poznato da postoji razlika u količini sintetisanog prostaciklina u endotelnim ćelijama arterija i vena, ova istraživanja su ukazala da to nije jedina razlika između dve vrste krvnih sudova. U tom momentu nisu mogli sa sigurnošću da opišu sve razlike, ali su otvorili novo polje za istraživanje (Mey i Vanhoutte, 1982).

Blokatori Ca-kanala kao vazodilatatori imaju veliki značaj u terapiji hipertenzije, tokom poslednje tri decenije. Svi predstavnici ove grupe lekova imaju isti mehanizam dejstva: blokada L-tipa voltažno zavisnih Ca-kanala u glatkoj muskulaturi krvnih sudova. Međutim, njihova primena je ograničena zbog nemogućnosti ove grupe lekova da deluju na tonus venskih krvnih sudova. Mehanizam putem kojeg venski sistem ne reaguje na delovanje ove grupe lekova *in vivo* je još uvek nepoznat. Jedna od mogućnosti je da su L-tip Ca-kanala u arterijama i u venama fundamentalno različiti u njihovim fiziološkim i farmakološkim osobinama. Samo nekoliko studija se sprovedeno koje su pokušale da dokumentuju ovu hipotezu. Začudo, ove studije pokazuju da, slično arterijama, L-tip Ca-kanala u glatkoj muskulaturi velikih vena zadržavaju osetljivost na blokatore Ca-kanala. Rezultati istraživanja sprovedenih na mezenteričnoj veni pacova objavljeni tokom 2010. godine potvrdila su da se ovaj tip Ca-kanala nalazi u sličnom broju u glatkim mišićima vena, ali da kanali nisu funkcionalni. Naime, opisano je da pražnjenje intracelularnih depoa jona Ca^{2+} (sarkoplazmatski retikulum) i porast koncentracije jona Ca^{2+} u citoplazmi dovodi da smanjenja funkcije L-tipa Ca-kanala ćelijske membrane glatkih mišićnih ćelija venskih krvnih sudova (*eng. „silences L-type Ca-channels“*). Dalje, ovi podaci su ukazali da bi uticaj na

intracelularno kretanje jona Ca^{2+} mogao da bude jedan od mehanizama dejstva novih venodilatatora. U kliničkom smislu, selektivna venodilatacija (bez dilatacije arterija) mogao bi da smanji vraćanje krvi u srce i time dovede do poboljšanja bolesti kao što je srčana insuficijencija (Keshari i sar., 2010).

Pored opisanog, postoji značajna razlika u anatomskoj strukturi arterija i vena: vene imaju tanji zid, valvule za prevenciju retrogradnog toka krvi, veću komplijansu i više kolagena, ali manje elastina i glatkih mišićnih ćelija od arterijskih krvnih sudova. (Shapherd i Vanhoutte, 1975). Postoje dokazi da valvule imaju inhibitorni efekat na endotel-zavisnu relaksaciju vena. (Eguchi i Katušić, 2001). Takođe, značajna je i razlika u organizaciji organela u ćelijama vaskularnog mišića arterija i vena. Smatra se da je najbitnija razlika u položaju sarkoplazmatskog retikuluma, tj. on se nalazi mnogo bliže ćelijskoj membrani u mišićnim ćelijama vena (Devine i sar., 1972). Između ostalog, opisano je da su vene, za razliku od arterija, manje osetljive na delovanje vazodilatatornih metabolita iz cirkulacije, i da pri tome imaju intenzivniju simpatičku inervaciju (Lewis i Mellander 1962; Mellander i Lewis, 1963).

Čini se da se prvi odgovor na pitanje odakle potiče razlika u funkciji i strukturi pre- i post-kapilarnog vaskularnog sistema dobija u eri razvoja genetike. Jedan od najznačajnijih molekula u našem organizmu koji utiče na morfologiju jeste efrin. Otkriće da se efrin-B2 eksprimira u endotelnim ćelijama arterijskih krvnih sudova, ali ne i na endotelnim ćelijama vena uputilo je istraživače da odgovor traže u procesu diferencijacije tokom embrionalnog razvoja. Interesantno je da ova razlika u ekspresiji efrin-B2 molekula kao i njegovog receptora postoji vrlo rano, u fazi postojanja vrlo primitivne vaskularne mreže (Wang i sar., 1998). Tokom 2003. godine, prvi put je sprovedeno istraživanje koje je jasno pokazalo da postoji razlika u genskoj ekspresiji i signalnim putevima koji kontrolišu razvoj krvnih sudova još u ranoj embrionalnoj fazi razvoja (Adams, 2003.).

EKSPERIMENTALNI MODEL ZA IZUČAVANJE VASKULARNIH EFEKATA POLIFENOLA: IZOLOVANA PUPČANA VENA ČOVEKA I PORTNA VENA PACOVA

Nekoliko venskih krvnih sudova u našem organizmu preuzimaju ulogu arterija, a njihov tonus je značajan u održavanju normalne funkcije pojedinih organa. Upravo u ovu grupu spadaju portna vena (*v. porta*) i pupčana vena (*v. umbilicalis*).

Splanhnička cirkulacija koja sadrži oko jedne četvrtine ukupne zapremine krvi predstavlja najznačajniji venski basen u ljudskom organizmu. Krvni sudovi koji ulaze u splanhničku cirkulaciju bogato su inervisani simpatičkim nervima (Pang, 2001). Struktura i funkcija portne vene su jasno definisane. Postoji nekoliko razloga zašto smo, kao eksperimentalni model, izabrali portnu venu pacova: portna vena pacova je dobro opisan eksperimentalni model za ispitivanje farmakološkog dejstva lekova i prirodnih supstanci. (Burt 2003; Burt 2005; Hughes 1967;) ispitivanje delovanja supstanci koje utiču na tonus portne vene može biti od značaja u poboljšavanju terapije portne hipertenzije, kao i ciroze jetre; dejstvo opisanih polifenola još uvek nije ispitivano na portnoj veni pacova. Interesantno je da se ispita uloga K-kanala u mehanizmu delovanja rezveratrola i naringenina na portnoj veni. Ranije je pokazano da K-kanali imaju značajnu ulogu u regulaciji tonusa ove vene (Mukerji, 2000).

Tokom embrionalnog razvoja, u sistem portne cirkulacije ulazi i *v. umbilicalis*, od koje nakon rođenja nastaje obla veza jetre (lat. *ligamentum teres hepatis*). Za pravilan rast i razvoj ploda, krucijalan značaj ima protok krvi od placente do fetusa, koji se ostvaruje preko *v. umbilicalis* i zavisi od njenog tonusa. Poznato je da *v. umbilicalis* nema adrenergičku inervaciju. Adrenergička nervna vlakna prisutna su u delu *a. umbilicalis* koji se nalazi u blizini fetusa. Regulacija tonusa *v. umbilicalis* zavisi od dejstva vazoaktivnih supstanci koje se

proizvode u okolnom tkivu ili se u cirkulaciji konvertuju u takve (Skulstad, 2004). Tokom 2006. godine, Wareing je pokazao da K-kanali imaju značajnu ulogu u kontroli fetoplacentalnog vaskularnog tonusa (Wareing, 2006). Na osnovu prethodnog, možemo zaključiti da je značajno ispitati kako konzumiranje hrane koja sadrži visoku koncentraciju polifenola tokom trudnoće može da utiče na tonus v. umbilicalis, a samim tim i na dotok krvi od majke do fetusa.

ZNAČAJ POLIFENOLA U TERAPIJI PORTNE HIPERTENZIJE, HIPERTENZIJE U TRUDNOĆI, PREEKLAMPSIJE I EKLAMPSIJE

1. Portna hipertenzija

Istraživanja koja mogu ukazati na značaj moduliranja tonusa portne vene je vrlo važno za bolje razumijevanje portne hipertenzije. Portna hipertenzija razvija se kod većine bolesnika s cirozom i to predstavlja najrasprostranjeniju komplikaciju hronične bolesti jetre. Posledično dolazi do rasta pritiska u portnoj cirkulaciji i razvoja gastroezofagealnih varikoznih vena, ascitesa, disfunkcije jetre i bubrega i encefalopatija. U posljednjih nekoliko godina pokazalo se da sniženje pritiska u portnoj cirkulaciji ima značaja u smanjenju rizika od krvarenja, kao i od razvoja drugih komplikacija. Pored toga, povezana je sa dužim životnim vekom ovih pacijenata. Trenutno se i u primarnoj i u sekundarnoj profilaksi komplikacija portne hipertenzije najčešće koriste neselektivni beta-blokatori. Ipak, nova saznanja o patofiziologiji portne hipertenzije nedavno su ukazala da će u budućnosti terapija biti usmerena na povećanje intrahepatičke vazorelaksacije. Sve navedeno otvara polje u kojem se pruža mogućnost primene novih lekova koji će modulirati tonus krvnih sudova koji ulaze u sastav portnog sistema (Laleman i sar., 2006).

2. Hipertenzija u trudnoći, preeklampsija i eklampsija

Preeklampsija i eklampsija predstavljaju ozbiljnu perinatalnu komplikaciju, a njihovo rano otkrivanje, pre pojave prvih simptoma, predstavlja značajan klinički izazov. Savremene metode *screeninga* za preeklampsiju i trudnoćom izazvanu hipertenziju uključuju različite biohemijske analize i identifikaciju fetalne DNK i RNK u serumu majke. Ove rane dijagnostičke metode omogućavaju pokretanje lečenja u ranoj trudnoći i smanjenje stope komplikacija. U ovom trenutku mnogi lekovi i suplementi koji bi smanjili pojavu hipertenzije u trudnoći se istražuju. Smatra se da se takve supstance moraju uvesti u ranoj trudnoći (do 16 nedelje), pre pojave prvih kliničkih simptoma bolesti. Na primer, pokazano je da primena male doze aspirina smanjuje rizik od preeklampsije kod rizične grupe trudnica. Sa druge strane, nedavna istraživanja su pokazala da omega-3 masne kiseline smanjuju učestalost preeklampsije. Interesantno je da su do sada dostupni podaci koji ukazuju da vitamini C, D ili E ne utiču na pojavu hipertenzije u trudnoći (Poprawski i sar., 2012). Da bismo mogli da ukažemo na značaj primene polifenola u prevenciji hipertenzije u trudnoći i komplikacija ovog oboljenja, neophodno je sprovesti kliničke studije koje bi ukazale pre svega na bezbednost primene polifenola u trudnoći, odbacile postojeće sumnje i dale odgovore na brojna pitanja iz ovog područja medicine.

Uzimajući u obzir navedeno, može se postaviti

Radna hipoteza:

Rezveratrol i naringenin izazivaju relaksaciju venskih krvnih sudova aktivacijom K-kanala na ćelijskoj membrani mišićnih ćelija krvnog suda. Ovo dejstvo je koncentracijski-zavisno. Rezveratrol i naringenin imaju i dejstva koja ne zavise od modulacije K-kanala. U ovim dejstvima učestvuju i membranski Ca^{2+} kanali.

II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati da li rezveratrol i naringenin imaju antivazokonstriktorne i vazodilatatorne efekte na portnoj veni pacova i humanoj pupčanoj veni koje su prethodno kontrahovane na različite načine.

2. Pokazati postojanje K-kanala u glatkim mišićima humane pupčane vene i portne vene pacova i ispitati da li i koji K-kanali imaju značajnu ulogu u antivazokonstriktornom i vazodilatatornom efektu rezveratrola i naringenina.

3. U okviru analize mehanizma dejstva rezveratrola i naringenina na izolovanim venskim krvnim sudovima ispitati: da li je dejstvo naringenina i rezveratrola endotel-nezavisno, da li postoje dodatni mehanizmi dejstva rezveratrola i naringenina na izolovanim venskim krvnim sudovima koji nisu vezani za otvaranje K-kanala i da li postoji presinaprički efekat rezveratrola i naringenina.

III MATERIJAL I METODE

Eksperimentalno istraživanje vršili smo na izolovanim, humanim i životinjskim, venskim krvnim sudovima („*in vitro*“ uslovi) (slika 14).



Slika 14. Eksperimentalna laboratorija za rad sa izolovanim krvnim sudovima: kupatilo za izolovane organe i sistem za registraciju signala (rukovodilac: prof. dr Ljiljana Gojković Bukarica)

Za istraživanje koristili smo portnu venu pacova i humanu pupčanu venu. Portna vena pacova je model na kojem smo ispitivati delovanje rezveratrola i naringenina na fazne kontrakcije krvnog suda (opisujemo antivazokonstriktorno dejstvo ispitivanih supstanci), dok smo humanu pupčanu venu koristiti kao model za ispitivanje dejstva polifenola na toničke kontrakcije venskog krvnog suda (opisujemo vazodilatatorno dejstvo ispitivanih supstanci).

ETIČNOST PROCEDURE

Ogledi u kojima su korišćeni krvni sudovi pacova sprovedeni su u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije („Službeni glasnik RS”, broj 41/09) i odgovarajućim pravilnikom („Službeni glasnik RS”, broj

39/10), kao i međunarodnom zakonskom regulativom (Directive 2010/63/EU; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed, NIH, USA). Odobrenje je dobijeno od strane Ministra poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, a uz pribavljeno mišljenje Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (Odluka br. 323-07-03985/2012-05.)

Procedure korišćenja humanih tkiva (retrospektivna studija sa uzorcima humane pupčane vene) odobrene su Odlukom Komiteta za etička pitanja Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu br. 29/X-16.

PREPARACIJA KRVNIH SUDOVA

1. Izolovanje *v. portae pacova*

U eksperimentalnom radu korišćena je *v. porta* mužjaka, Wistar pacova čija telesna težina se kretala između 250 - 300 g, starosti oko 3 meseca (12 nedelja). Nakon žrtvovanja životinje cervikalnom dislokacijom, izoluje se *v. porta*. Izolovani krvni sud se stavlja u Krebs-Ringerov rastvor, a okolno vezivno tkivo se uklanja. Endotel se uklanja mehanički pomoću čelične žice. Izolovani krvni sud (10 - 15 mm) se postavlja longitudinalno u vodeno kupatilo koje sadrži Krebs-Ringerov rastvor u zapremini od 10 ml (mmol/L: NaCl 120, KCl 5, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2, glucose 11, Na₂EDTA 0,032). *V. porta* se inkubira u vodenom kupatilu tokom 40 minuta (temperatura 37° C, opterećenje 1 g, pO₂ = 95%, 5% CO₂, pH = 7,4). Tokom ovog perioda, krvni sud je ispiran na svakih 10 minuta svežim Krebs-Ringerovim rastvorom. Ukoliko je tokom eksperimentalnog rada korišćen *Ca²⁺-free* rastvor, rastvor je uvek sadržao 1 mM EGTA. Rastvor sa visokim sadržajem K⁺ jona (*K⁺ rich Krebs-Ringer rastvor*) pripremljen je tako što je 100 mM NaCl zamenjeno sa 100 mM KCl. Povremeno, tokom perioda inkubacije, opterećenje krvnog suda je

korigovano na 1 g. Kontrakcije longitudinalnih mišića krvnog suda su registrovane pomoću transdusera (K30, Hugo Sachs, Freiburg, Nemačka) koji je povezan sa sistemom za zapis (R60, Rikadenki, Tokyo, Japan). Pored toga, za registrovanje kontrakcija korišćen je i kompjuterski program *Isolab*.

2. Uzorkovanje pupčanika

Segmenti pupčanika uzimani su nakon prirodnog, terminskog porođaja zdravih, normotenzivnih žena koje su bile hospitalizovane u Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Srbije. Uzorci koji su se koristiti u naučno-istraživačke svrhe su odbačeni, a uzorkovanje materijala ni na koji način nije uticao na zdravlje majke i/ili novorođenčeta. Takođe, ne vezuje se za identifikaciju istih. Na slici 15 prikazano je uzorkovanje pupčanika.



Slika 15. Uzorkovanje pupčanika

Propratne podatke koji su nam neophodni tokom istraživanja uzimalo je medicinsko osoblje porodilišta iz medicinske dokumentacije porodilje i nije ih davala sama porodilja (retrospektivna studija sa uzorcima). Podaci od interesa tokom ove studije bili su: datum porođaja, starost porodilje, da li je porođaj obavljen u terminu, pušenje u trudnoći, postojanje hipertenzije i/ili diabetes mellitusa tokom trudnoće, postojanje medikamentne terapija tokom trudnoće,

odnosno porođaja. Karakteristike porodilja nakon čijeg porođaja je korišćen materijal prikazane su u tabeli 15.

Tabela 15. Karakteristike porodilja od kojih je uziman uzorak pupčanika

Karakteristika porodilje	X ± S. E. M.
Starost majke (godine)	27,0 ± 3,0
Trudnoća	1,7 ± 0,3
Gestaciona starost (nedelja graviditeta)	38,6 ± 0,6
Pušenje cigareta tokom trudnoće	8 (20 %)
Arterijski pritisak	
...Sistolni	117,2 ± 0,8
...Dijastolni	75,0 ± 0,4

Eksperimentalna procedura odobrena je Odlukom Komiteta za etička pitanja Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu br. 29/X-16. Neposredno posle vaginalnog porođaja segmenti pupčanika prenosili su se na 4° C u Krebs-Ringerovom rastvoru od Klinike za ginekologiju i akušerstvo KCS do Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu gde se obavlja eksperimentalni rad. Eksperimenti su se izvodili najkasnije 24 sata nakon porođaja.

3. Izolovanje humane v. umbilicalis

Segmenti v. umbilicalis u obliku prstena izolovani su iz pupčanika, dok je vezivno tkivo je pažljivo uklonjeno. Svaki segment izolovane v. umbilicalis

bio je dužine oko 5 mm. Endotel je uklonjen mehanički pomoću laboratorijske čelične žice. Izolovani segmenti v. umbilicalis postavljeni su u vodeno kupatilo koje je sadržalo 10 ml Krebs-Ringerovog rastvora. Inicijalno opterećenje krvnog suda bilo je 2 g (temperatura 37 ° C, pO₂ = 95%, 5% CO₂, pH = 7,4). Period inkubacije krvnog suda trajao je oko 1 sat. Tokom ovog perioda, krvni sud je ispiran na svakih 10 minuta svežim Krebs-Ringerovim rastvorom. Rastvor sa visokim sadržajem K⁺ jona (K⁺ rich Krebs-Ringer rastvor) pripremljen je tako što je 100 mM NaCl zamenjeno sa 100 mM KCl. Povremeno, tokom perioda inkubacije, opterećenje krvnog suda je korigovano na 2 g (Caliskan i sar., 2006; Radenković i sar., 2007). Kontrakcije glatkih mišića v. umbilicalis registrovane su pomoću transdusera (K30, Hugo Sachs, Freiburg, Nemačka) koji je povezan sa sistemom za zapis (R60, Rikadenki, Tokyo, Japan). Pored toga, za registrovanje kontrakcija korišćen je i kompjuterski program Isolab.

ANTIVAZOKONSTRIKTORNO DEJSTVO POLIFENOLA

1. Ispitivanje antivazokonstriktornog dejstva rezveratrola i naringenina i uloge K-kanala u njihovom antivazokonstriktornom dejstvu

Ispitivanje antivazokonstriktornog dejstva polifenola, rezveratrola i naringenina, ispitivali smo na faznim kontrakcijama izolovane portne vene pacova. Da bismo proverili da li je endotel uklonjen, portna venu smo kontrahovali fenilefrinom (1 µM), a zatim smo u vodeno kupatilo dodavali acetilholin (20 µM). Ukoliko bi acetilholin izazovao relaksaciju krvog suda manju od 10% od početne kontrakcije, smatrali smo da funkcionalni endotel ne postoji.

Fazne kontrakcije portne vene pacova izazivali smo na sledeće načine:

- električnom stimulacijim (ES, 20 Hz),

- noradrenalinom (NA, 100 μ M) ili adenzin-trifosfatom (ATP, 1 mM)
- kalijum hloridom (KCl, 100 mM) i
- kalcijum hloridom (CaCl₂, 100 μ M).

1. Električnom stimulacijom, pomoću dve elektrode koje postavljamo paralelno u vodeno kupatilo, stimulisali smo nervne završetke portne vene pacova. Parametri stimulacije su: frekvenca 20 Hz, trajanje paketa 3 s, jedan impuls 0,3 ms i submaksimalna voltaža od 60-80 mV. Na opisan način stimulišemo adrenergičke nervne završetke. Tokom eksperimentalnog rada koristili smo *Grass S44* električni stimulator (Gojkovic-Bukarica et al., 1999). Nakon stabilizacije kontrakcija krvnog suda u trajanju od 30 minuta, u vodeno kupatilo dodavali smo kumulativno rezveratrol ili NS1619 u rastućim koncentracijama. Sledeću koncentraciju supstance dodavali smo u vodeno kupatilo kada prethodna završi svoje dejstvo, tj. kada se postigne stanje ekvilibrijuma.

U posebnim serijama eksperimenata ispitivali smo da li rezveratrol deluje aktivirajući K-kanale, tako što su specifični blokatori K-kanala dodavani u vodeno kupatilo 20 minuta pre rezveratrola. Na ovaj način ispitali smo presinaptičke efekte rezveratrola. Koristili smo sledeće blokatore K-kanala: glibenklamid, 4-aminopiridin (4-AP), margatoksin, tetraetilamonium hlorid (TEA), karibdotoksin i iberiotoksin. Amplituda kontrakcije koja nastaje neposredno pre dodavanja rezveratrola smatrala se kontrolnom kontrakcijom (100%).

U posebnoj seriji eksperimenata, u cilju potvrde činjenice da kontrakcija krvnog suda do koje dovodi ES nastaje kao posledica oslobađanja neurotransmitera iz simpatičkih nervnih završetaka koristili smo tetrodotoksin (1 μ M), fentolamin (1 μ M) i inhibitor P2-receptor-suramin (0,1 mM). Nabrojane supstance dodavali smo u vodeno kupatilo 20 minuta pre nego što smo započinjali kontrakciju krvnog suda električnom stimulacijom.

2. U sledećoj seriji eksperimenata, fazne kontrakcije v. portae izazivali smo dodavanjem rastvora NA (100 μ M) ili ATP (1 mM). Cilj je bio postizanje ujednačenih kontrolnih kontrakcija koje su po obliku i amplitudi bile jednake kontrakcijama koje smo postigli primenom ES. Nakon postizanja maksimalne amplitude fazne kontrakcije pomoću NA ili ATP, ispirali smo venske preparate kako bi sprečili razvoj toničke kontrakcije. Rezveratrol ili naringenin su se dodavali u vodeno kupatilo 10 minuta pre NA ili ATP. Efekat NS 1619, visoko selektivnog otvarača BK_{Ca} kanala, ispitivali smo samo na kontrakcijama koje smo izazivali pomoću NA. NS 1619 dodavan je u vodeno kupatilo na isti način kao i ispitivani polifenoli. Kontrolne NA- i ATP-kontrakcije smatrali smo maksimalnim odgovorom krvnog suda (100%). Potom, efekti naringenina i rezveratrola bili su ispitivani i u prisustvu blokatora K-kanala (glibenklamid, 4-AP, margatoksin, TEA, karibdotoksin, iberiotoksin) koji su se u vodeno kupatilo dodavali 20 minuta pre rezveratrola ili naringenina.

3. i 4. U posebnim serijama eksperimenata, izolovana v. portae pacova kontrahovana je pomoću CaCl₂ (100 μ M) or KCl (100 mM). Na ovaj način želeli smo da ispitamo ulogu K⁺- i Ca²⁺-kanala u antivazokonstriktornim efektima ispitivanih polifenola. Kada smo za kontrakciju venskih krvnih sudova koristili CaCl₂, vodeno kupatilo sadržalo je *Ca²⁺-free* ili *high K⁺, Ca²⁺-free* rastvor. Nakon postizanja maksimalne kontrakcije pomoću CaCl₂ ili KCl, venski preparati su ispirani kako bi se sprečio nastanak toničke kontrakcije. Rezveratrol ili naringenin su dodavani u vodeno kupatilo 10 minuta pre CaCl₂ ili KCl. Pored opisanog, ispitivaćemo ulogu K-kanala u dejstvu polifenola, tako što ćemo u posebnoj seriji eksperimenata kontrakcije v. portae izazivati KCl i pratiti efekte rezveratrola i naringenina na KCl kontrakcije, što će nam ukazati na ulogu K-kanala u delovanju ispitivanih supstanci.

Kontrakcije krvnog suda nisu mogle da se izazovu pomoću ES, NA, CaCl₂ i KCl, ukoiko je nifedipin (10 nM - 1 μ M, n = 15) dodavan u vodeno

kupatilo (rezultati nisu prikazani). Prema tome, efekte polifenola nismo uspeli da ispitamo u prisustvu nifedipina.

Kontrakcije pre dodavanja supstanci (u svakoj seriji eksperimenata), predstavljaju kontrolne kontrakcije i njihova veličina predstavlja 100% vrednosti. Efekti polifenola određuju se u odnosu na kontrolne kontrakcije.

VAZODILATATORNO DEJSTVO POLIFENOLA

1. Ispitivanje vazodilatatornog dejstva rezveratrola i naringenina i uloga K-kanala u njihovom vazodilatatornom dejstvu

Vazodilatatorno dejstvo rezveratrola i naringenina ispitivali smo na segmentu izolovane humane v. umbilicalis bez endotela. Nakon perioda ekvibracije, submaksimalna kontrakcija segmenta izolovane humane v. umbilicalis postiže se pomoću serotonina (100 μ M). Acetilholin (1 μ M) dodavan je nakon postizanja početne kontrakcije u cilju provere integriteta endotela. Samo za venske preparate kod kojih je acetilholin prouzrokovao relaksaciju manju od 10% smatrali smo da ne postoji funkcionalni endotel. Upravo su ti preparati ušli u eksperimentalnu proceduru. Nakon testiranja integriteta endotela, usledio je period ekvibracije u trajanju od 1 časa, tokom kojeg je krvi sud ispiran svežim Krebs-Ringerovim rastvorom na svakih 10 minuta.

Segmenti izolovane, humane v. umbilicalis kontrahovani su serotoninom (100 μ M) ili rastvorom koji sadrži 100 mM K^+ (*K⁺-rich Krebs-Ringer* rastvor). Kada kontrakcija postigne stabilan plato rezveratrol (1-100 μ M) ili naringenin (0,01-1 mM) su dodavani na kumulativan način. Sledeću koncentraciju supstance dodavali smo u vodeno kupatilo kada prethodna završi svoje dejstvo, tj. kada se postigne stanje ekvilibrijuma.

U sledećim eksperimentalnim serijama, blokatori K-kanala (glibenklamid, 4-AP, TEA ili barium-hlorid, BaCl₂) dodavani su u vodeno kupatilo pojedinačno ili u kombinaciji 20 min pre rezveratroal ili naringenina, u cilju ispitivanja uloge K-kanala u vazodilatatornim efektiva rezveratrola i naringenina. Blokatori K-kanala korišćeni su isključivo kada je kontrakcija krvnog suda izazvana pomoću serotonina.

Veličina postignutog tonusa predstavlja kontrolnu vrednost, a efekti supstanci se izražavaju kao % smanjenja tonusa u odnosu na kontrolu.

ISPITIVANJE UTICAJA RASTVARAČA NA TONUS IZOLOVANIH VENSKIH KRVNIH SUDOVA

Protokol eksperimenata u kojima smo ispitivali uticaj rastvarača na tonus krvnog suda prikazan je na slici 16.

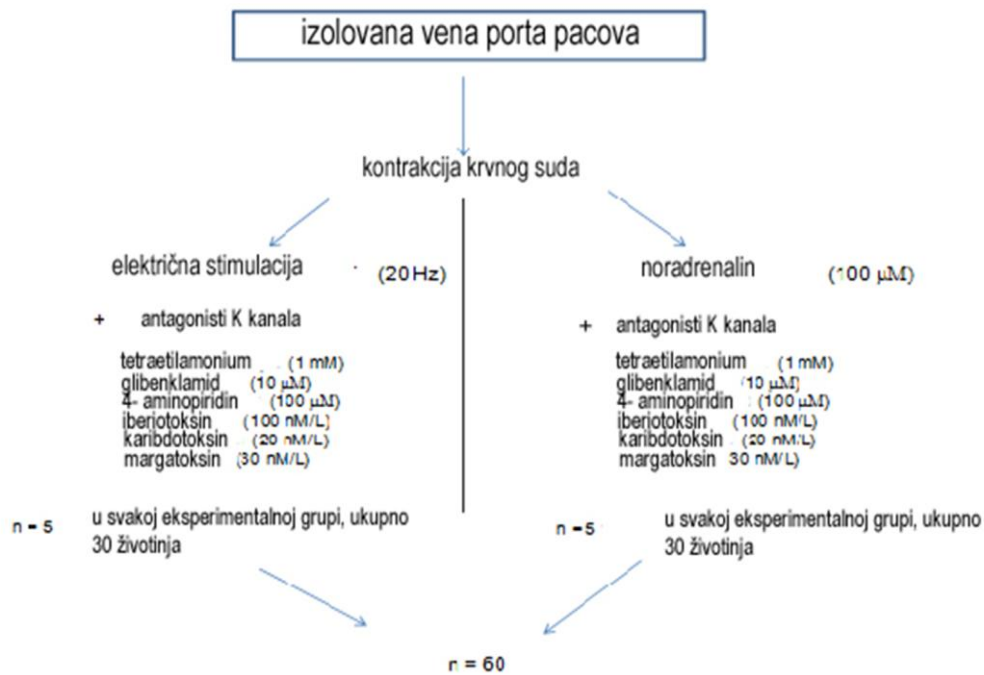


Slika 16. Protokol eksperimenata u kome smo ispitivali uticaj rastvarača na tonus

Tokom izrade naučno-istraživačkog rada kao rastvarače ispitivanih polifenola koristili smo etanol i dimetilsulfoksid (DMSO). Oba rastvarača razblažena su pomoću destilovane vode pre nego što su upotrebljeni. Koncentracija etanola i DMSO u vodenom kupatilu bila je manja od 0,01% (v/v) tokom eksperimenta. Koncentracije rastvarača nisu uticale na tonus izolovane v. porte pacova i izolovane humane v. umbilikalis.

ISPITIVANJE UTICAJA BLOKATORA K-KANALA NA TONUS IZOLOVANIH VENSКИH KRVNIH SUDOVA

Glibenklamid (10 μ M), 4-AP (300 μ M), margatoksin (30 nM) TEA (1 mM), karibdotoksin (20 nM) i iberiotoksin (100 nM) nisu uticali na bazalni tonus izolovanih venskih krvnih sudova. Takođe, njihovo prisustvo nije uticalo na veličinu i oblik kontrakcija krvnog suda koje smo izazivali pomoću ES, NA ili serotoninom. Rezultati uticaja blokatora K-kanala na tonus v. portae pacova prikazani su prikazani u tabeli 16 (n = 72). Veća koncentracija TEA (3 mM, n = 7) ili 4-AP (0,5 and 1 mM, n = 5 u obe serije) uticala je na bazalni tonus izolovane v. portae pacova, kao i na kontrakcije izazvane ES ili NA (rezultati nisu prikazani). Međutim, veće koncentracije blokatora nisu imale uticaj na kontrakciju izolovane v. umbilikalis. Eksperimentalni protokol u kojem smo ispitivali uticaj blokatora K-kanala na tonus izolovanih venskih krvnih sudova prikazan je na slici 17.



Slika 167. Protokol eksperimenata u kojima smo ispitivali uticaj blokatora K-kanala na tonus izolovanih venskih krvnih sudova

IDENTIFIKACIJA K-KANALA U IZOLOVANOJ V. PORTAE PACOVA I HUMANOJ V. UMBILIKALIS

U poslednjoj seriji eksperimenata, Western-blot metodom identifikovali smo K-kanale u portnoj veni pacova i humanoj pupčanoj veni. Koristili smo antitela (Alomone labs, Isreal) za sledeće K-kanala: voltažno-zavisne K-kanale (Kv 2.1), ulazno-ispravljačke K-kanale (Kir) i Ca²⁺-zavisne K-kanale koji brzo sprovode jone (BK_{Ca}).

1. Western blot analiza

Uzorci izolovane vene porte pacova i humane v. umbilicalis homogenizovani su u RIPA puferu sa proteaznim inhibitorima (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemačka). Nakon toga, usledilo je centrifugiranje uzoraka tokom 20 minuta na 11000 obrtaja, na 4°C. Supernatant je prebačen u nove epruvete. Koncentracija proteina determinisana je koristeći Bradford-ov metod. Proteini su inkubirani na 70°C tokom 10 minuta, razdvojeni pomoću natrijum dodecil sulfatepoliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE; Invitrogen, California, USA) i preneti na nitroceluloznu membranu. Membrana je blokirana pomoću 5% mleka-0,1% Tween 20 tokom 1 sata na sobnoj temperaturi uz primenu primarnog antitela preko noći na 4°C. Hiperfilm je razvijan kako bi bila moguća vizualizacija sekundarnog antitela (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Membrana je stripovana pomoću 0,2M NaOH tokom 10 minuta, oprana, blokirana i inkubirana sa antitelom za β-aktin 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) tokom noći na 4°C. (Cokic i sar., 2006).

SUPSTANCE

Korišćeni su sledeći lekovi: *(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, Acetylcholine chloride, Tetrodotoxin, Suramin sodium, Phentolamine hydrochloride, L-Norepinephrine hydrochloride, Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate, Resveratrol, Naringenin, Serotonin hydrochloride, NS 1619, Glibenclamide, 4-Aminopyridine, Margatoxin, Tetraethylammonium chloride, Charybdotoxin, Iberiotoxin, Potassium chloride, Calcium chloride, Nifedipine, Ethanol* (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, MO, USA). Rezveratrol, NS 1619 i nifedipin su rastvarani 70% v/v etanolu, a dalja razblaženja su pravljena neposredno pre upotrebe u destilovanoj vodi. Radne koncentracije etanola u kupatilu su bile < 0,01% (v/v). Polietilenglikol je korišćen za rastvaranje glibenklamida. Noradrenalin (norepinefrin) je rastvaran u 0,01 N HCl, a svi ostali lekovi su rastvarani u destilovanoj vodi. U ranijim eksperimentima je pokazano da korišćeni rastvarači ne utiču na preparate u primenjenim koncentracijama. Svi lekovi su

dodavani direktno u kupatilo za izolovane organe tako da su postizane prikazane finalne koncentracije. Eksperimenti sa rezveratrolom su izvođeni u zamračenoj prostoriji.

STATISTIČKA ANALIZA

Rezultate smo izražavali kao srednje vrednosti \pm standardna greška ($\bar{X} \pm S. E. M.$). Broj eksperimenata u eksperimentalnoj grupi biće obeležen sa n . Za proračune koristili smo kompjuterski program Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc. San Diego, U.S.A.). Svi grafici crtani su u programu SigmaPlot 11.0. Značajnost statističke razlike između dve grupe podataka određivana je Studentovim t-testom, a verovatnoća manja od 0,05 smatra se statistički značajnom. Kada je bilo potrebno da se porede tri ili više grupa podataka sa normalnom raspodelom, korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA).

Koncentracija agoniste koja proizvodi 50% maksimalnog odgovora označena je kao srednja efektivna koncentracija (EC_{50}), a računata se za svaku grupu eksperimenata pomoću grafikona, linearnom interpolacijom. Razlike između EC_{50} vrednosti dobijenih u različitim serijama eksperimenata poređene su Studentovim t testom.

Odnosi EC_{50} vrednosti za agoniste u prisustvu ili bez antagonista (CR vrednosti), izračunate za svaki pojedinačni eksperiment.

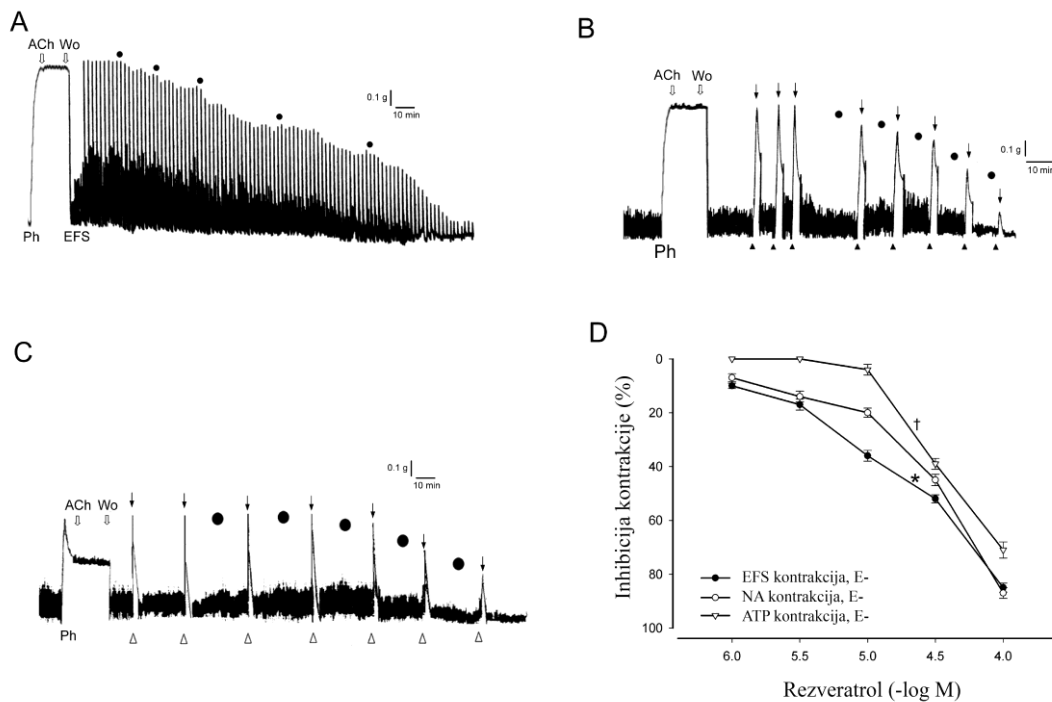
IV REZULTATI

ANTIVAZOKONSTRIKTORNO DEJSTVO REZVERATROLA

Tetrodotoksin ($1 \mu\text{M}$) u potpunosti suprimira kontrakcije izolovane *v. portae* pacova koje nastaju pod dejstvom ES ($n = 5$, rezultati nisu prikazani). Takođe, kombinacija fentolamina ($1 \mu\text{M}$) i antagoniste P2 receptora, suramina ($0,1 \text{ mM}$) dovodi do gašenja kontrakcija koje nastaju kao posledica ES.

1. Efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane *v. portae* pacova koje nastaju pod dejstvom ES, NA i ATP

Originalni zapis eksperimenta u kojem se jasno vidi efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane *v. portae* pacova koje nastaju pod dejstvom ES, NA i ATP prikazan je na slici 12 A, B i C. Rezveratrol ($1-100 \mu\text{M}$) izaziva koncentracijski-zavisnu inhibiciju kontrakcija koje nastaju pod dejstvom ES sa $EC_{50} = 27,5 \pm 1,7 \mu\text{M}$ i E_{max} od $85,0 \pm 1,7\%$ ($n = 8$, slika 18 D). Takođe, rezveratrol dovodi do inhibicije kontrakcija koje nastaju pod dejstvom NA sa EC_{50} vrednošću od $38,5 \pm 2,3 \mu\text{M}$ i maksimalnim efektom od $87,0 \pm 1,3\%$ ($n = 8$, slika 18 D). Postoji statistički značajna razlika između EC_{50} u predhodne dve grupe eksperimenata ($P < 0,05$). Rezveratrol dovodi do inhibicije kontrakcija izolovane *v. portae* koje nastaju pod dejstvom ATP (EC_{50} vrednost $51,3 \pm 3,2 \mu\text{M}$ i E_{max} od 71% ($n = 8$, slika 18 D). Postoji statistički značajna razlika između EC_{50} vrednosti rezveratrola između eksperimentalnih grupa u kojima je izolovani venski krvni sud prekontrahovan pomoću ES, NA ili ATP.

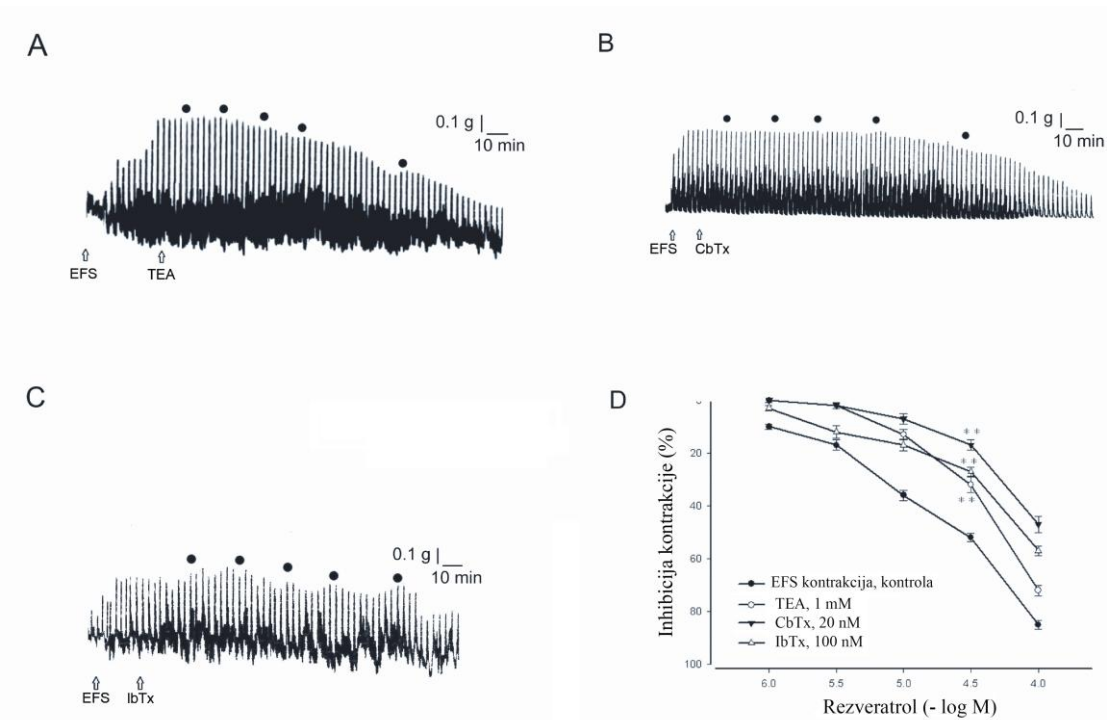


Slika 178. Inhibitorni efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane v. portae pacova koje nastaju pod dejstvom ES, NA i ATP. Provera integriteta endotela vršena pomoću acetilholina (Ach, bele strelice). Ako je relaksacija vene koja je prethodno kontrahovana fenilefrinom (Ph) bila manja od 10%, smatrali smo da to potvrđuje uklanjanje endotela. Originalni zapis efekta rezveratrola na kontrakcije portne vene pacova izazvane (A) električnom stimulacijom (ES, 20 Hz, adrenergičkog porekla), (B) egzogenim norepinefrinom (NE, 10 mM, crni trouglovi) ili (C) hidratom dinatrijumove soli egzogenog adenzin 50-trifosfata (ATP, 1 mM, beli trouglovi). Posle 2 min, kontrakcije izazvane NE prekidane su ispiranjem (crne strelice). Kontrakcije izazvane ATP-om prekidane su ispiranjem posle 1 min (crne strelice). Kumulative koncentracije rezveratrola (crni krugovi) dodavane su u kupatilo za izolovane organe. D. Koncentracijska kriva koja pokazuje efekat rezveratrola na venu portu pacova kontrahovanu ES (crni krugovi), NE (beli krugovi) ili ATP-om (beli trouglovi). Efekti su prikazani kao % inhibicije kontrolne kontrakcije. Svaka tačka prikazuje srednju vrednost \pm S. E. M. ($n = 8$ u svakoj grupi). * $P < 0,05$ pokazuje značajnost razike između

EC₅₀ vrednosti za rezveratrol dobijene na portnoj veni pacova kontrahovanoj ES (crni krugovi) i NE (beli krugovi); † P<0,01 pokazuje značajnost razike između EC₅₀ vrednosti za rezveratrol dobijene na portnoj veni pacova kontrahovanoj ATP-om (beli trouglovi) i ES (crni krugovi) ili NE (beli krugovi).

2. Efekti različitih blokatora K-kanala na rezveratrolom izazvanu inhibiciju ES- i NA-kontrakcija izolovane v. portae pacova

Originalni zapis eksperimenta u kojem se vidi dejstvo rezveratrola na ES-kontrakciju portne vene pacova u prisustvu inhibitora Ca²⁺ senzitivnih K (K_{Ca})-kanala, TEA (1 mM, n = 6), karibdotoksina (20 nM, n = 6) i iberiotoksina (100 nM, n = 6) prikazani su na slici 13 A, B i C. TEA inhibira dejstvo rezveratrola na venskim preparatima koji su prekontrahovani pomoću ES (EC₅₀ vrednost: 27,5 ± 1,7 μM u kontrolnoj seriji eksperimenata vs. 61,3 ± 3,2 μM u prisustvu TEA, P < 0,01) sa statistički značajnom promenom u maksimalnom odgovoru (85,0 ± 1,7% u kontrolnoj grupi vs. 72,0 ± 3,6% u prisustvu TEA, P < 0,01, slika 19 D i tabela 16).



Slika 18. Analiza efekata različitih blokatora K-kanala na rezveratrolom

izazvanu inhibiciju kontrakcija izolovane v. portae pacova izazvanu električnom stimulacijom (ES, 20 Hz). A. Efekat tetraetilamonijuma (TEA, 1 mM) na rezveratrolom-izazvanu inhibiciju kontrakcija v. portae pacova. B. Efekat karibdotoksina (CbTx, 20 nM) na rezveratrolom-izazvanu inhibiciju kontrakcija v. portae pacova. C. Efekat iberiotoksina (IbTx, 100 nM) na rezveratrolom-izazvanu inhibiciju kontrakcija v. portae pacova. D. Koncentracijska kriva efekata rezveratrola bila je dobijena na portnoj veni pacova kontrahovanoj ES sa i bez TEA (1 mM, beli krugovi), CbTx (20 nM, crni trouglovi) i IbTx (100 nM, beli trouglovi). Efekti su prikazani kao % inhibicije kontrolne kontrakcije. Svaka tačka prikazuje srednju vrednost \pm S. E. M. ($n = 6$ u svakoj grupi). ** $P < 0,01$.

Tabela 16. Efekat blokatora K-kanala na rezveratrolom izazvanu inhibiciju ES- i NE-kontrakcija izolovane v. portae pacova.

Eksperimentalna grupa	EC50	Emax
Rezveratrol (1-100 μ M)	27,5 \pm 1,7 μ M	85,0 \pm ,1,7 %
Rezveratrol+glibenklamid (10 μ M)	34,2 \pm 2,8 μ M	85,0 \pm 1,3 %
Rezveratrol + 4-AP (300 μ M)	20,8 \pm 3,3 μ M	82,0 \pm 0,8 %
Rezveratrol + MgTx (30 nM)	23,5 \pm 2,0 μ M	82,0 \pm 2,0 %
Rezveratrol + TEA (1 mM)	61,2 \pm 3,2 μ M*	72,0 \pm 3,6 %*
Rezveratrol + CBTx (20 nM)	/	47,0 \pm 3,4 %*
Rezveratrol + IBTx (100 nM)	83,4 \pm 2,0 μ M*	57,0 \pm 1,8 %*

	Kontrakcije izazvane NA	
Rezveratrol (1-100 μ M)	38,5 \pm 2,3 μ M	87,0 \pm 1,3 %
Rezveratrol +glibenklamid (10 μ M)	35,8 \pm 2,7 μ M	89,2 \pm 2,3 %
Rezveratrol + 4-AP (300 μ M)	32,6 \pm 3,2 μ M	85,0 \pm 2,5 %
Rezveratrol + MgTx (30 nM)	32,4 \pm 1,7 μ M	86,3 \pm 2,0 %
Rezveratrol + TEA (1 mM)	33,8 \pm 2,1 μ M	90,0 \pm 1,8 %
Rezveratrol + CBTx (20 nM)	38,5 \pm 3,0 μ M	87,2 \pm 2,6 %
Rezveratrol + IBTx (100 nM)	35,2 \pm 2,5 μ M	87,0 \pm 1,3 %

* $P < 0,01$

4-AP = 4-aminopiridin, TEA = tetraetilamonijum, CbTx = karibdotoksin, IbTx = iberiotoksin, MgTx = margatoksin; Kontrakcije su bile izazvane električnom stimulacijom (ES, 20 Hz) ili egzogenim norepinefrinom (NE, 10 mM). EC₅₀ je koncentracija rezveratrola koja izaziva 50% svog maksimalnog odgovora (srednja vrednost \pm S. E. M., $n = 6$). Emax je maksimalni odgovor na rezveratrol (srednja vrednost \pm S. E. M., $n = 6$).

Karibdotoksin, blokator K_{Ca} kanala koji sporo ili srednjom brzinom sprovode jone dovodi do statistički značajne blokade kontrakcija izolovane v. portae pacova koje nastaju pod dejstvom ES (slika 19 D, tabela 16). U prisustvu karibdotoksina, maksimalni odgovor rezveratrola je značajno inhibiran. (85,0 \pm 1,7% u kontrolnoj grupi vs. 47,0 \pm 3,4% u grupi eksperimenata u kojoj je priomenjen karibdotoksin, $P < 0,01$). Međutim, u ovoj seriji eksperimenata EC₅₀ vrednost rezveratrola nije izračunata jer nije postignut maksimalan odgovor.

Iberiotoksin, selektivni inhibitor BK_{Ca} kanala (inhibitor K_{Ca} 1.x, K_{Ca} 4.x, K_{Ca} 5.x) visoko statistički značajno antagonizuje inhibitorski efekat rezveratrola

na kontrakcijama koje nastaju pod dejstvom ES (EC_{50} vrednost: $27,5 \pm 1,7 \mu\text{M}$ u kontrolnoj grupi vs. $83,4 \pm 2,0 \mu\text{M}$ u prisustvu iberiotoksina, $P < 0,01$; tabela 16 i slika 19 D). Takođe, u prisustvu iberiotoksina E_{max} rezveratrola je značajno inhibiran ($85,0 \pm 1,7\%$ u kontrolnoj grupi vs. $57,0 \pm 2,0\%$ u prisustvu iberiotoksina, $P < 0,01$; slika 19 D i tabela 16).

Glibenklamid ($10 \mu\text{M}$, $n = 6$), selektivni inhibitor ATP-senzitivnih K (K_{ATP})-kanala nije statistički značajno ($P > 0,05$) modulirao dejstvo rezveratrola na kontrakcije izolovane v. portae pacova koje nastaju pod dejstvom ES. (EC_{50} vrednost: $27,5 \pm 1,7 \mu\text{M}$ u kontrolnoj grupi vs. $34,2 \pm 2,8 \mu\text{M}$ u prisustvu glibenklamida; maksimalni odgovor: $85,0 \pm 1,7\%$ u kontrolnoj grupi vs. $85,0 \pm 1,3\%$ u prisustvu glibenklamida, $P > 0,05$ za obe vrednosti). Rezultati su prikazani u tabeli 16.

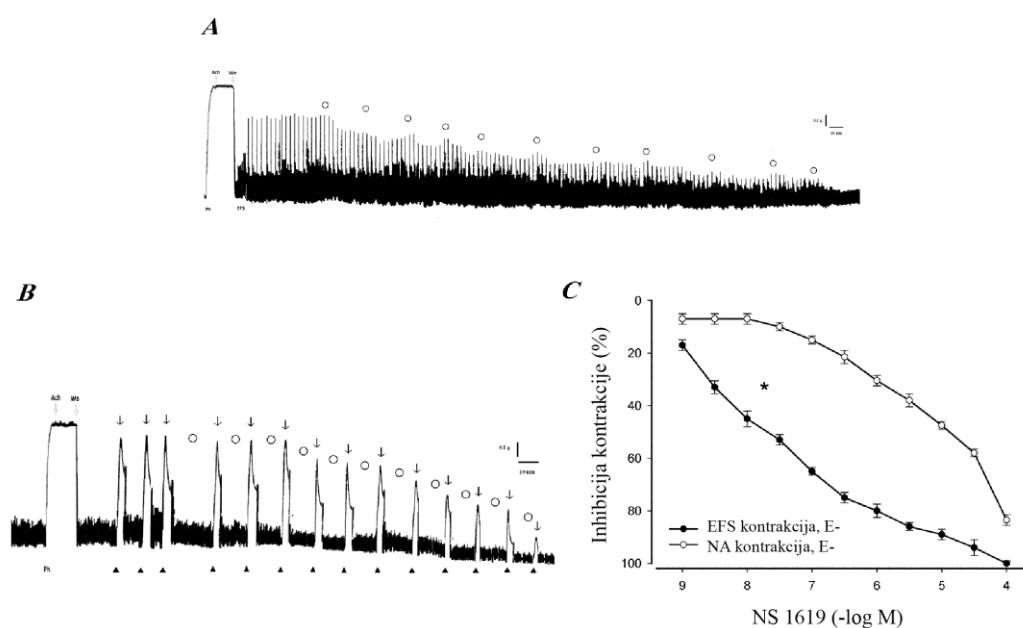
4-AP ($300 \mu\text{M}$, $n = 6$), predominantni blokator K_v kanala, nije imao uticaja na ES-kontrakcije izolovane vene (EC_{50} vrednost: $27,5 \pm 1,7 \mu\text{M}$ u kontrolnoj grupi vs. $20,80 \pm 3,30 \mu\text{M}$ u prisustvu 4-AP, $P > 0,05$; E_{max} : $85,0 \pm 1,7\%$ u kontroli vs. $82,0 \pm 0,8\%$ u prisustvu 4-AP, $P > 0,05$). Podaci su prikazani u tabeli 16

Margatoksin (30 nM , $n = 6$), blokator $K_v1.1$, $K_v1.2$ i $K_v1.3$ kanala, nije uticao na rezveratrolom izazvanu inhibiciju ES-kontrakcija izolovane v. portae pacova (EC_{50} vrednost: $27,5 \pm 1,7 \mu\text{M}$ u kontrolnoj grupi vs. $23,5 \pm 2 \mu\text{M}$ u prisustvu margatoksina $P > 0,05$; E_{max} : $85,0 \pm 1,7\%$ u kontrolnoj grupi vs. $82,0 \pm 2,0\%$ u prisustvu margatoksina, $P > 0,05$). Podaci su prikazani u tabeli 16.

Glibenklamid ($10 \mu\text{M}$), 4-AP ($300 \mu\text{M}$), margatoksin (30 nM), TEA (1 mM), karibdotoksin (20 nM) i iberiotoksin (100 nM) nisu imali uticaj na efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane v. portae pacova koju nastaju pod dejstvom NA (podaci su prikazani u tabeli 16, $n = 5$ u svakoj grupi eksperimenata).

3. Poređenje efekata rezveratrola sa visokoselektivnim otvaračem BK_{Ca} kanala NS1619

U cilju određivanja značaja BK_{Ca} kanala u antivazokonstriktornom efektu rezveratrola poredili smo efekat rezveratrola sa visokoselektivni otvaračem BK_{Ca} kanala, NS1619 (0,001 - 100 μM). Originalni eksperimentalni zapis dejstva NS1619 na izolovanu v. portae pacova kontrahovanu pomoću ES I NA prikazan je na slici 14 A i 14 B. NS 1619 dovodi do koncentracijski-zavisne inhibicije ES-kontrakcija sa EC₅₀ 0,02 ± 0,002 μM i maksimalnim efektom od 100 ± 1% (n = 8, slika 20 C). NS1619 dovodi do koncentracijski-zavisne inhibicije NA-kontrakcija sa EC₅₀ 16,5 ± 2,0 μM i maksimalnim efektom od 83,5 ± 2,0% (n = 8, slika 20 C).

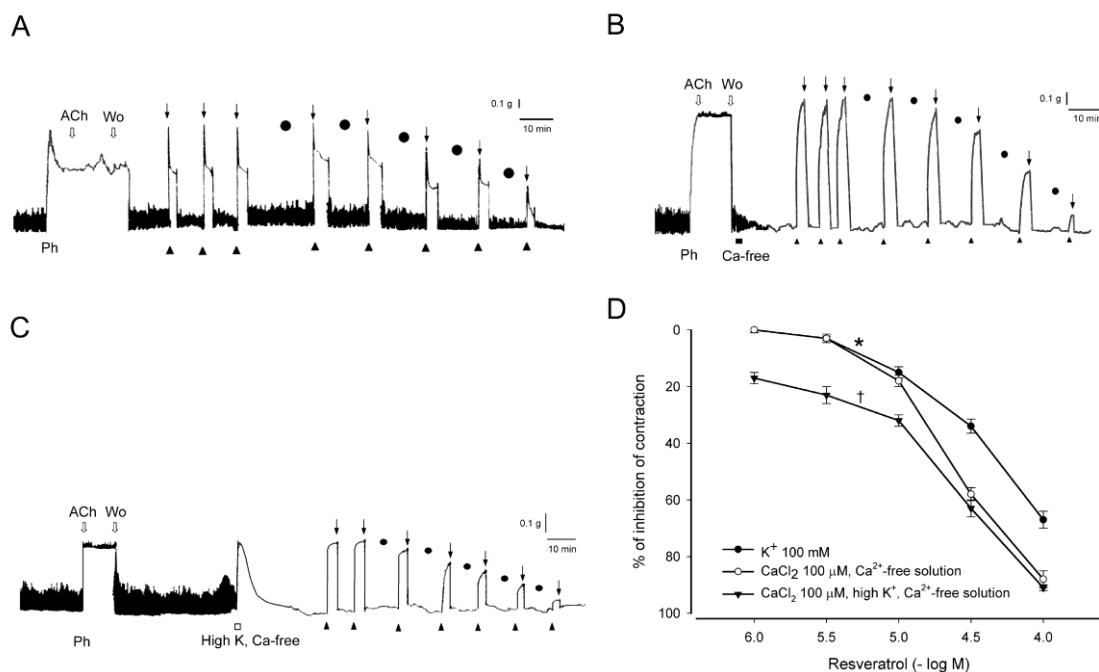


Slika 20. Originalni eksperimentalni zapis delovanja NS 1619 na kontrakcije izolovane v. portae pacova kontrahovane pomoću (A) električne stimulacije (ES, 20 Hz) i (B) noradrenalinom (NA, 10 μM, crni trougao). Provera integrititeta endotela pomoću acetilholina (Achbela strelica). Relaksacija vene koja je prethodno kontrahovana fenilenilom (Ph) manja od 10% uzeta je kao dokaz da endotel ne postoji.

NS 1619 (beli krug) dodavan je u vodeno kupatilo na kumulativan način. (D) Koncentracijska kriva za NS 1619 na izolovanoj v. portae pacova koja je prethodno kontrahovana pomoću ES (crvi krug) ili NA (beli krug). Efekti su prikazani kao % inhibicije kontrolne kontrakcije. Svaka tačka prikazuje srednju vrednost \pm S. E. M. ($n = 6$ u svakoj grupi). $**P < 0,01$.

4. Efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane v. poprtae pacova koje nastaju pod dejstvom CaCl_2 i KCl

Originalni eksperimentalni zapisi dejstva rezveratrola na kontrakcije venskog krvnog suda koje nastaju pod dejstvom KCl (100 mM) i CaCl_2 (100 μM) u Ca^{2+} free ili high K^+ , Ca^{2+} -free rastvora prikazani su a slici 21 A, B i C.



Slika 191. Dejstva rezveratrola na izolovanu v. portae pacova nezavisna od K -kanala. Provera integriteta endotela vršena pomoću acetilholina (ACh, bele strelice). Ako je relaksacija vene koja je prethodno kontrahovana fenilefrinom (Ph) bila manja od 10%, smatrali smo da to potvrđuje uklanjanje endotela. Originalni zapis efekta rezveratrola na kontrakcije portne vene pacova izazovane (A) (A) KCl (100 mM), (B) CaCl_2 (100 μM) u Ca -free rastvoru (počev od crnog kvadrata, do kraja eksperimenta) ili (C) CaCl_2 (100

μM) u *high K*, *Ca-free* rastvoru (počev od belog kvadrata, do kraja eksperimenta). Spontana aktivnost v. portae pacova se ne održava u rastvoru koji ne sadrži jone Ca^{2+} (D) Koncentracijska kriva efekata rezveratrola bila je dobijena na portnoj veni pacova kontrahovanoj pomoću KCl (100 mM, crni krug), CaCl_2 (100 μM , beli krug) u *Ca-free* rastvoru i CaCl_2 (100 μM , crni trougao) u *high K*, *Ca-free* rastvoru. Svaka tačka prikazuje srednju vrednost \pm S. E. M. ($n = 6$ u svakoj grupi). $**P < 0,01$, $\dagger P < 0,05$

Rezveratrol (1 - 100 μM , $n = 6$) izaziva koncentracijski-zavisnu inhibiciju kontrakcija izolovane v. portae pacova koja nastaje pod dejstvom KCl (EC_{50} vrednost $65,0 \pm 3,0 \mu\text{M}$ i $\text{E}_{\text{max}} 67,0 \pm 3,0\%$, slika 21 D) i CaCl_2 ($n = 6$) u Ca^{2+} -free rastvoru (EC_{50} vrednost od $26,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$ E_{max} od $88,0 \pm 3,0\%$, slika 21 D). Postoji statistički značajna razlika između EC_{50} vrednosti i maksimalne efikasnosti rezveratrola između ove dve grupe eksperimenata ($P < 0,01$, za oba).

Kada se u vodeno kupatilo doda *rich K⁺*, Ca^{2+} -free rastvor nastaje inicijalna kontrakcija krvnog suda. Rezveratrol (1 - 100 μM) dovodi do koncentracijski-zavisne inhibicije kontrakcija venskog krvnog suda koje nastaju pod dejstvom CaCl_2 ($n = 6$) u *rich K⁺*, Ca^{2+} -free rastvoru (EC_{50} vrednost $19,9 \pm 1,3 \mu\text{M}$ i maksimalna efikasnost od $91,0 \pm 3\%$, slika 21 D). Postoji statistički značajna razlika između EC_{50} vrednosti za rezveratrol u grupama eksperimenata u kojima se venski krvni sud nalazi u Ca^{2+} -free rastvoru i *rich K⁺*, Ca^{2+} -free rastvoru ($P < 0,05$). Takođe, postoji statistički značajna razlika između EC_{50} vrednosti rezveratrola u grupama eksperimenata u kojima se kontrakcije venskog krvnog suda izazivaju pomoću KCl ili CaCl_2 u *rich K⁺*, Ca^{2+} free rastvoru ($P < 0,01$).

ANTIVAZOKONSTRIKTORNO DEJSTVO NARINGENINA

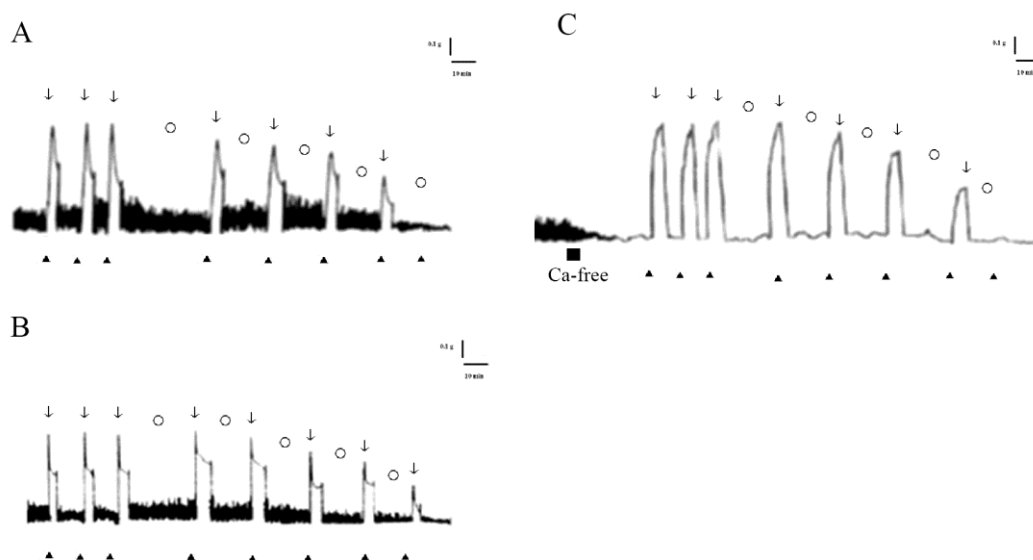
1. Efekat naringenina na kontrakcije izolovane v. portae pacova koje nastaju pod dejstvom NA, CaCl₂ i KCl

Naringenin (0,1 -1 mM) dovodi do dozno-zavisne inhibicije kontrakcija koje se nastale kao posledica egzogeno aplikovanog NA na izolovanu v. portae pacova ($EC_{50} = 398 \pm 2 \mu\text{M}$). Maksimalna efikasnost naringenina u ovoj grupi eksperimenata bila je $100 \pm 0\%$.

Naringenin (0,1 -1 mM) dovodi do dozno-zavisne inhibicije kontrakcija koje se nastale kao posledica egzogeno aplikovanog CaCl₂ na izolovanu v. portae pacova ($EC_{50} = 251 \pm 5 \mu\text{M}$). Maksimalna efikasnost naringenina u ovoj grupi eksperimenata bila je $100 \pm 0\%$.

Naringenin (0,1 -1 mM) dovodi do dozno-zavisne inhibicije kontrakcija koje se nastale kao posledica egzogeno aplikovanog KCl na izolovanu v. portae pacova ($EC_{50} = 354 \pm 5 \mu\text{M}$). Maksimalna efikasnost naringenina u ovoj grupi eksperimenata bila je $80 \pm 3\%$.

Originalni eksperimentalni zapis antivazokonstriktivnog dejstva naringenina prikazan je na slici 22.



Slika 20. Inhibitorni efekat naringenina na kontrakcije izolovane v. portae

pacova koje nastaju pod dejstvom NA, KCl i CaCl₂. Originalni zapis efekta naringenina na kontrakcije portne vene pacova izazvane (A) egzogenim noradrenalinom (NA, 10 μM, crni trougao), (B) kalijum-hloridom (KCl, 100 mM, crni trougao) ili (C) kalcijum-hloridom (CaCl₂, 100 μM, crni trougao). Posle 2 min, kontrakcije su prekidane ispiranjem (crne strelice). Kumulative koncentracije naringenina (beli krug) dodavane su u kupatilo za izolovane organe.

2. Efekti različitih blokatora K-kanala na naringeninom izazvanu inhibiciju NA-kontrakcija izolovane v. portae pacova

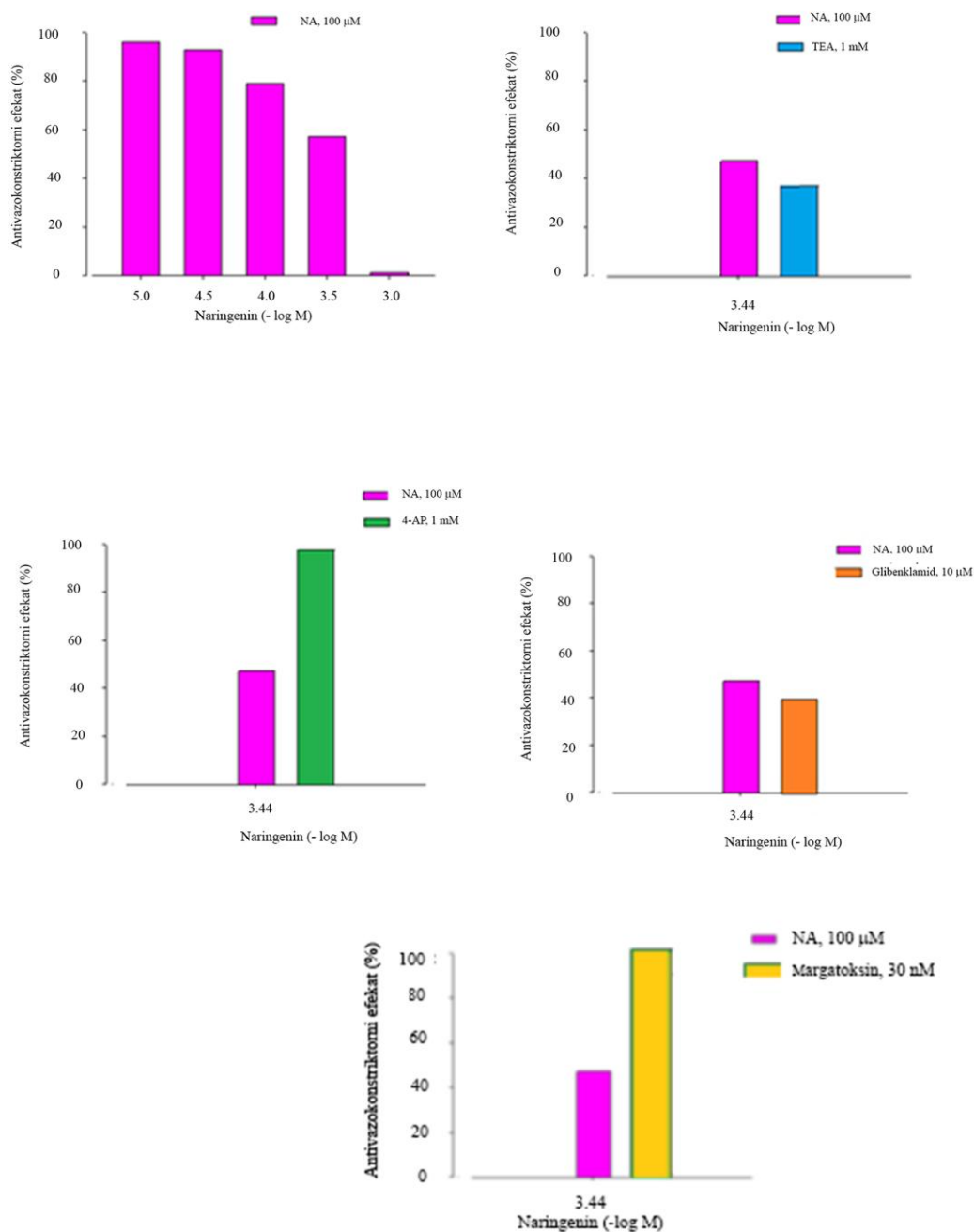
4-AP (1 mM, n = 6) statistički značajno ($P < 0,01$) antagonizuje dejstvo naringenina na izolovanu v. portae pacova koja je prethodno kontrahovana NA. U prisustvu 4-AP, naringenin primenjen u koncentraciji koja približno odgovara EC₅₀ vrednosti nije uspeo da ostvari svoj antivazokonstriktivni efekat. Kontrakcija koja se postiže pomoću NA u prisustvu 4-AP i naringenina iznosi 90% od kontrolne kontrakcije (kontrakcija venskog krvnog suda izazvana NA bez prisustva naringenina i 4-AP).

Margatoksin (30 μM, n = 6), selektivni inhibitor K_v kanala, u potpunosti antagonizuje antivazokonstriktorno dejstvo naringenina na izolovanoj v. portae pacova koja je prethodno kontrahovana NA ($P < 0,01$). Kontrakcija koja se postiže pomoću NA u prisustvu margatoksina i naringenina, primenjenog u koncentraciji koja je približno jednaka EC₅₀ vrednosti naringenina, približno je jednaka kontrolnoj kontrakciji.

Primena TEA (1 mM, n = 6) i glibenklamida (10 μM, n = 6) nije dovela do inhibicije antivazokonstriktornog dejstvo naringenina na izolovanoj v. portae pacova koja je prethodno kontrahovana NA ($P > 0,05$). Kontrakcija koja se postiže pomoću NA u prisustvu TEA ili glibenklamida i naringenina primenjenog u koncentraciji koja je približno jednaka EC₅₀ vrednosti

naringenina, približno je jednaka kontrakciji koja se postiže u prisustvu naringenina, bez prisustva blokatora.

Efekti različitih antagonista K-kanala prikazani su na slici 23.



Slika 213. Uticaj različitih blokatora K-kanala na antivazokonstriktorno dejstvo naringenina na izolovanoj v. portae pacova.

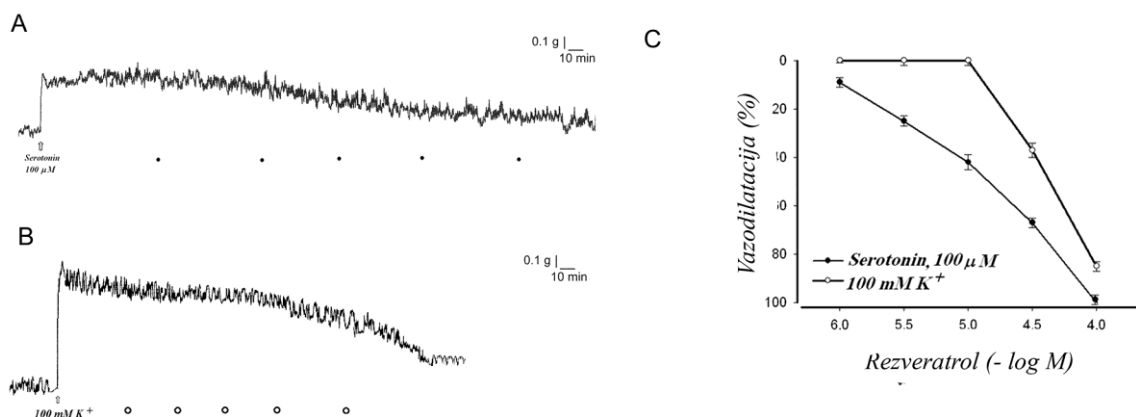
VAZODILATATORNO DEJSTVO REZVERATROLA

1. Vazodilatatorno dejstvo rezveratrola na toničku kontrakciju izolovane humane v. umbilicalis izazvanu pomoću serotoninina

Originalni eksperimentalni zapis u kojem je prikazan efekat rezveratrola na toničnu kontrakciju izolovane v. umbilicalis bez endotela prikazan je na slici 24 A. Rezveratrol (1 - 100 μM) dovodi do koncentracijski-zavisne vazorelaksacije izolovane, humane v. umbilicalis bez endotela (EC_{50} vrednost $16,5 \pm 2,8 \mu\text{M}$, $n = 12$, slika 24 C). Maksimalna efikasnost rezveratrola iznosi $100 \pm 2\%$.

2. Vazodilatatorno dejstvo rezveratrola na toničku kontrakciju izolovane humane v. umbilicalis izazvanu pomoću 100 mM K^+

Rezveratrol (1-100 μM) dovodi do koncentracijski-zavisne relaksacije izolovane humane v. umbilicalis bez endotela koja je prethodno bila kontrahovana pomoću 100 mM K^+ (EC_{50} vrednost: $16,5 \pm 2,8 \mu\text{M}$ u kontrolnoj grupi vs. $49 \pm 2 \mu\text{M}$ u prisustvu 100 mM K^+ , $P < 0,01$; sa Emax : $100 \pm 2\%$ u kontrolnoj grupi vs. $84 \pm 2\%$ u prisustvu 100 mM K^+ ; $P < 0,01$; $n = 6$, slika 24 C). Originalni eksperimentalni zapis prikaza je na slici 24 B.



Slika 224. Vazodilatatorno dejstvo rezveratrola na izolovanu v. umbilicalis. A. Originalni eksperimentalni zapis dejstva rezveratrola (crni krug) na izolovanu humanu

v. umbilicalis koja je prethodno kontrahovana serotoninom (100 μ M) B. Originalni eksperimentalni zapis dejstva rezveratrola (beli krug) na izolovanu humanu *v. umbilicalis* koja je prethodno kontrahovana rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona K^+ (100 mM K^+) C. Koncentracijska kriva efekata rezveratrola bila je dobijena na izolovanoj humanoj *v. umbilicalis* kontrahovanoj pomoću serotoninina (100 μ M, crni krug) i rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju K^+ (100 mM, beli krug) Svaka tačka prikazuje srednju vrednost \pm S. E. M. ($n = 6$ u svakoj grupi).

3. Efekat blokatora K- kanala na rezveratrolom-izazvanu vazorelaksaciju izolovane humane *v. umbilicalis* prekontrahovane serotoninom

Ni jedan od korišćenih blokatora K-kanala: glibenklamid (10, 30 μ M), 4 - AP (1, 3 mM), TEA (1, 3 mM) i $BaCl_2$ (1, 3 mM) nije uticao na tonus izolovane humane *v. umbilicalis* bez endotela prekontrahovane pomoću 100 μ M serotoninina (podaci nisu prikazani, $n = 4 - 6$ u svakoj eksperimentalnoj grupi)

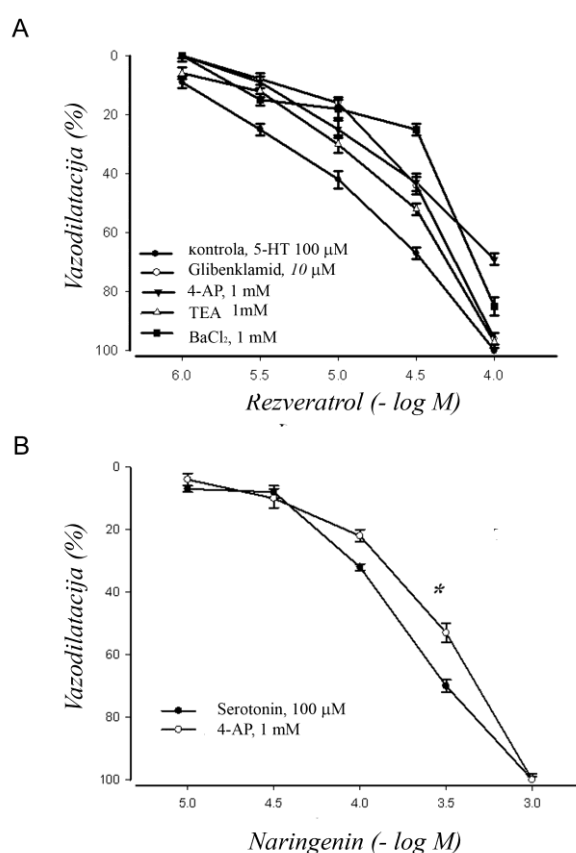
Glibenklamid (10 μ M, $n = 6$) selektivni bloker ATP-senzitivnih K-kanala (K_{ATP}), statistički značajno modifikuje vazorelaksantno dejstvo rezveratrola na izolovani venski krvni sud. (EC_{50} vrednost: $16,5 \pm 2,8 \mu$ M u kontrolnoj grupi vs. 38μ M $\pm 2,0 \mu$ M u prisustvu glibenklamida, $P < 0,01$) bez značajne promene E_{max} ($100 \pm 2\%$ u kontrolnoj grupi vs. $96 \pm 2\%$ u prisustvu glibenklamida, $P > 0,05$, Slika 25 A).

4-AP (1 mM, $n = 6$), koji predominantno blokira voltažno-zavisne K-kanale (K_v), inhibira vazorelaksantno dejstvo rezveratrola na humanu, izolovanu *v. umbilicalis* koja je prethodno kontrahovana pomoću serotoninina (EC_{50} vrednost: $16,5 \pm 2,8 \mu$ M u kontrolnoj seriji vs. $49 \pm 3 \mu$ M u prisustvu 4-AP, $P < 0,01$, slika 25 A) sa statistički značajnom promenom u E_{max} ($100 \pm 2\%$ u kontrolnoj seriji eksperimenata vs. $69 \pm 2\%$ u prisustvu 4-AP).

TEA (1 mM, $n = 6$), koji predominantno blokira Ca^{2+} -senzitivne K-kanale (K_{Ca}) inhibira vazodilatatorni efekat rezveratrola na izolovanom venskom

krvnom sudu (EC_{50} vrednost: $16,5 \pm 2,8 \mu\text{M}$ u kontrolnoj seriji eksperimenata vs. $28,0 \pm 3,0 \mu\text{M}$ u prisustvu TEA, $P < 0,05$, slika 25 A) bez značajne promene u E_{max} ($100 \pm 0 \%$ vs. $97 \pm 2\%$).

BaCl_2 (1 mM, $n = 6$), antagonist Kir kanala, statistički značajno inhibira relaksaciju krvnog suda do koje dovodi rezveratrol (EC_{50} : $16,5 \pm 2,8 \mu\text{M}$ vs. $50,6 \pm 2,5 \mu\text{M}$, $P < 0,01$, slika 25 A) bez statistički značajne promene u E_{max} ($100 \pm 0 \%$ vs. $85 \pm 3\%$, $P < 0,01$).



Slika 235. Koncentracijske krive (A) rezveratrola i (B) naringenina, kao i uticaj različitih blokatora K-kanala na njihove efete na izolovanoj humanojoj v. umbilicalis.

Kombinacija različitih blokatora K-kanala, glibenklamida (10 μM), 4 - AP (1 mM), TEA (1 mM) i BaCl_2 (1 mM) dovodi do izražene inhibicije vazorelaksantnog dejstva rezveratrola na izolovanoj, humanojoj v. umbilicalis (EC_{50} : $49 \pm 2 \mu\text{M}$ u seriji eksperimenata sa 100 mM K^+ vs. $68 \pm 3 \mu\text{M}$,

$P < 0,01$) bez statistički značajne promene E_{max} vrednosti ($84 \pm 2\%$ vs. $80 \pm 3\%$, $P > 0,05$).

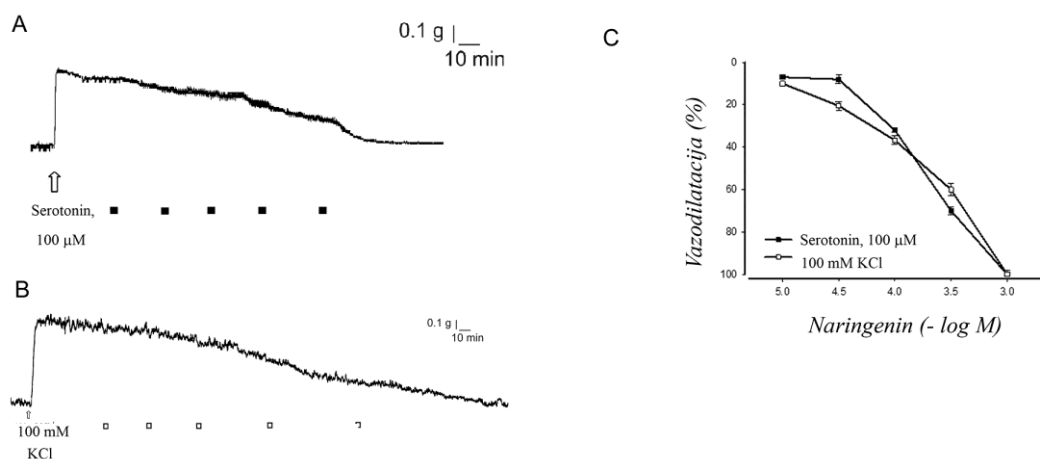
VAZODILATORNO DEJSTVO NARINGENINA

1. Vazodilatatorno dejstvo naringenina na toničku kontrakciju izolovane humane v. umbilicalis izazvanu pomoću serotoninina

Originalni eksperimentalni zapis u kojem je prikazan efekat naringenina na toničnu kontrakciju izolovane v. umbilicalis bez endotela koja je kontrahovana serotoninom prikazan je na slici 24 A. Naringenin ($0,01 - 1 \text{ mM}$) dovodi do koncentracijski-zavisne vazorelaksacije izolovane, humane v. umbilicalis bez endotela (EC_{50} vrednost $175,7 \pm 3 \mu\text{M}$, $n = 7$, slika 26 C). Maksimalna efikasnost naringenina iznosi $100 \pm 2\%$.

2. Vazodilatatorno dejstvo naringenina na toničku kontrakciju izolovane humane v. umbilicalis izazvane pomoću 100 mM K^+

Naringenin ($0,01 - 1 \text{ mM}$) dovodi do koncentracijski-zavisne relaksacije izolovane humane v. umbilicalis bez endotela koja je prethodno kontrahovana pomoću 100 mM K^+ (EC_{50} vrednost: $175,7 \pm 3 \mu\text{M}$ u kontrolnoj grupi vs. $219,6 \pm 3 \mu\text{M}$ u prisustvu 100 mM K^+ , $P < 0,01$; sa E_{max} : $100 \pm 2\%$ $n = 6$, slika 26 C). Originalni eksperimentalni zapis prikaza je na slici 26 B.



Slika 24. Originalni eksperimentalni zapis dejstva naringenina na izolovanu humanu v. umbilicalis

A. prethodno kontrahovanu serotoninom (100 μ M, crni) B. prethodno kontrahovana rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju jona K^+ (100 mM K, beli kvadrat) C. Koncentracijska kriva efekata naringenina dobijena je na izolovanoj humanoj v. *umbilicalis* kontrahovanoj pomoću serotonina (100 μ M, crni kvadrat) i rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju K^+ (100 mM, beli kvadrat) Svaka tačka prikazuje srednju vrednost \pm S. E. M. (n = 6 u svakoj grupi).

3. Efekat blokatora K-kanala na naringeninom-izazvanu vazorelaksaciju izolovane humane v. *umbilicalis* prekontrahovane serotoninom

Glibenklamid primenjen u koncentraciji u 10 μ M (n = 6) ne utiče na relaksaciju venskog krvnog suda koju izaziva naringenin (EC₅₀ vrednost: 175,7 \pm 3 μ M u kontrolnoj seriji eksperimenata vs. 186,2 \pm 1 μ M u prisustvu glibenklamida, P > 0,05). Kada se glibenklamid primeni u većoj koncentraciji (30 μ M, n = 6), postoji visoko statistički značajna razlika (P < 0,01) između EC₅₀ vrednosti naringenina u kontrolnoj grupi eksperimenata i grupi u kojoj je prisutan glibenklamid (175,7 \pm 3 μ M vs. 216,9 \pm 3 μ M). Glibenklamid ne utiče na maksimalnu efikasnost naringenina ni u jednoj eksperimentalnoj seriji (100 \pm 0% u svim eksperimentalnim grupama).

Vazodilatatorni efekat naringenina na izolovanu, humanu v. *umbilicalis* je statistički značajno antagonizovan primenom 1 mM 4-AP (n = 6; P < 0,01; EC₅₀ vrednost: 175,7 \pm 3 μ M u kontrolnoj grupi vs. 281,8 \pm 1 μ M u prisustvu 4-AP, slika 24 B). Emax naringenina bila je 100% u obe eksperimentalne grupe.

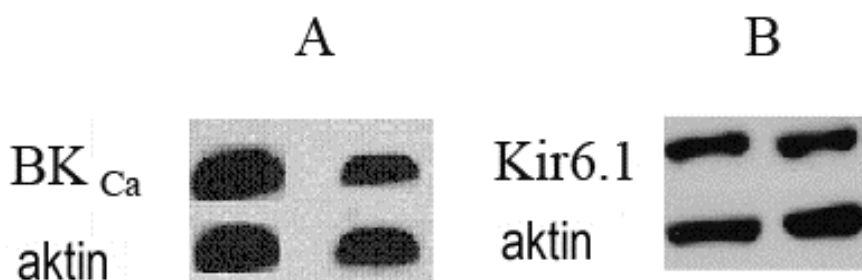
TEA (1, 3 mM, n = 6) nije antagonizovao vazorelaksantno dejstvo naringenina na izolovanoj, humanoj v. *umbilicalis* koja je prethodno kontrahovana serotoninom (EC₅₀: 175,7 \pm 3 μ M u kontroli vs. 177,8 \pm 1 μ M u prisustvu 1 mM TEA i 176,1 \pm 2 μ M u prisustvu 3 mM TEA; podaci nisu pokazani). Maksimalna efikasnost naringenina ostala je nepromenjena u prisustvu TEA.

BaCl₂ (1, 3 mM, n=6) nije antagonizovao vazodilatatorni efekat naringenina na izolovanoj, humanoj v. umbilicalis (EC₅₀: 175,7 ± 3 μM u kontroli vs. 185,2 ± 2 μM u prisustvu 1 mM BaCl₂ i 183,1 ± 2 μM u prisustvu 3 mM BaCl₂, podaci nisu prikazni). Maksimalna efikasnost naringenina ostala je nepromenjena u prisustvu TEA.

Veće koncentracije antagonista K-kanala korišćene su samo ukoliko manje, selektivnije koncentracije nisu imale nikakav uticaj na vazodilatatorno dejstvo ispitivanih polifenola.

IDENTIFIKACIJA K-KANALA

Analizom pomoću Western blot-a pokazali smo da v. portae pacova eksprimira K_{Ca}1.1 (BK_{Ca}) protein (slika 27 A), a humana v. umbilicalis Kir protein (slika 27 B). Proteini su izolovani iz uzoraka venskih krvnih sudova koji nisu imali endotel. Western blot analizom nismo mogli da utvrdimo tačnu lokaciju izolovanih proteina (da li se protein nalaze u glatkom mišiću krvnog suda, perivaskularnim nervima i/ili okolnom vezivnom tkivu). Nakon inkubacije sa antitelom za β-aktin preko noći na +4°C vizualizacijom smo pokazali da ispitivani uzorci sadrže β-aktin.



Slika 25. Ekspresija proteina koji ulaze u sastav K-kanala. (A) Ekspresija K_{Ca}1.1 (BK_{Ca}) proteina i β-aktina u veni porte pacova. (B) Ekspresija Kir proteina i β-aktina. Proteini su u tkivu detektovani Western blot metodom.

V DISKUSIJA

AKTUELNOST TEME

Naša studija vaskularnih efekata odabranih polifenola pokazala je da ove supstance imaju antivazokonstriktorno i vazodilatatorno dejstvo na izolovanim venskim krvnim sudovima. Poslednjih deset godina rezveratrol je jedna od najviše ispitivanih supstanci u biomedicinskim naukama. To pokazuje broj publikovanih radova koji punih šest decenija nije prešao 800, a poslednjih sedam godina dostiže 4000. Ipak, dejstva rezveratrola na tonus venskih krvnih sudova još nisu objašnjena.

Prema nama dostupnim saznanjima, ova studija je jedna od prvih koja ispituje dejstva polifenola na venskim krvnim sudovima. Pre nas, Rakici i sar. (2005) pokazali su da rezveratrol dovodi do vazodilatacije humane vene safene, kao i da popravlja njenu endotelnu disfunkciju, dok za naringenin ima manje podataka.

Uzimajući u obzir činjenicu da različiti vazodilatatori, kao što su npr. blokatori kalcijumskih kanala, imaju ograničeno dejstvo na arterijsku cirkulaciju, mogli bismo očekivati da ispitivani polifenoli pokazuju različit uticaj na tonus arterijskih i venskih krvnih sudova. Li i sar. (2006) pokazali su da lokalni tkivni metaboliti manje utiču na tonus vena nego na tonus arterija. Razlike u strukturi i funkciji arterija i vena detaljno su opisane u uvodu. Tako je istaknuto da umbilikalna vena predstavlja izuzetak u pogledu regulacije vaskularnog tonusa: gotovo da nema simpatičku inervaciju, a glavnu ulogu u regulaciji njenog tonusa igraju kalijumovi kanali i lokalni metabolički faktori (v. Uvod).

Mehanizam kojim polifenoli utiču na tonus krvnih sudova nije jasan. Kao što je prethodno rečeno, poznato je da resveratrol i/ili naringenin mogu dovesti do endotel-zavisne i endotel-nezavisne vazorelaksacije.

KONCENTRACIJSKI RASPON KORIŠĆENIH SUPSTANCI

U našoj studiji, antivazokonstriktorno i vazodilatatorno dejstvo rezveratrola i naringenina postignuto je u mikromolarnim koncentracijama. Rezveratrol ostvaruje biološke efekte u širokom rasponu plazmatskih koncentracija od 32 nM do 100 μ M u zavisnosti od vrste tkiva (tabela 2, v. Uvod) (Gojkovic Bukarica i sar., 2013).

S obzirom da su i rezveratrol i naringenin polifenoli, mogli bismo očekivati da pokazuju vazodilatatorne efekte u sličnom koncentracijskom rasponu. Međutim, u našoj studiji pokazali smo da je rezveratrol znatno potentniji vazodilatator od naringenina. Da bismo postigli 50% od maksimalne vazodilatacije izolovane humane umbilikalne vene, neophodna je 11 puta veća koncentracija naringenina nego rezveratrola. Ovo ukazuje da naringenin i rezveratrol imaju različite mehanizme vazodilatarnog dejstva koji su verovatno zavisni od tkiva, kao i od strukture ovih polifenola. Opisano je da relaksantni efekti različitih flavonoida na mišićni tonus izolovanog želuca miša zavise od hemijske strukture: relaksantna aktivnost se progresivno smanjuje u zavisnosti od saturacije dvostruke veze između C2 i C3 atoma, postojanja hidroksilne grupe na C3 atomu, glikozilacije i dr. (Amira i sar., 2008).

ANTIVAZOKONSTRIKTORNO DEJSTVO REZVERATROLA I NARINGENINA

Prema nama dostupnim informacijama, ovo je prva studija koja opisuje inhibitorni efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane portne vene pacova izazvane električnom stimulacijom. Električna stimulacija (ES) dovodi do aktivacije perivaskularnih nervnih završetaka oslobađajući različite neurotransmitere i ko-transmitere (NA, ATP i neuropeptid Y). Oslobađanje neurotransmitera dovodi do kontrakcije krvnog suda (Smyth i sar., 2000).

Tetrodotoksin dovodi do potpune inhibicije kontrakcija portne vene pacova izazvanih ES, što potvrđuje neurogenu prirodu ovih kontrakcija. NA i ATP se zajedno oslobađaju iz vezikula simpatičkog nervnog završetka i ispoljavaju aditivno dejstvo na vaskularni tonus. Suramin (antagonist P2x receptora) i fentolamin (antagonist alfa-adrenoceptora) značajno smanjuju kontrakcije do kojih dovodi ES (Sayet i sar., 1993). Međutim, udeo ATP-a u ovoj kontrakciji je manji od 15%.

Gojkovic-Bukarica i sar. (2006-2008) pokazali su u seriji radova da rezveratrol ima relaksantni, endotel-nezavisni efekat na arterijama pacova i čoveka. Takođe, rezveratrol dovodi do endotel-nezavisne inhibicije kontrakcija koje izaziva ES, dok oba polifenola inhibiraju kontrakcije portne vene pacova nastale pod dejstvom NA. Kontrakcije izazvane ES pokazuju veću osetljivost na dejstvo rezveratrola nego kontrakcije prouzrokovane dejstvom NA. To bi moglo da dovede do zaključka da rezveratrol inhibira oslobađanje neurotransmitera iz perivaskularnih nerava. Međutim, slab efekat rezveratrola na kontrakcije izazvane ATP-om ne idu u prilog ovoj pretpostavci.

U cilju ispitivanja uloge kalijumovih kanala u antivazokonstriktornom efektu rezveratrola i naringenina, koristili smo različite blokatore kalijumovih kanala.

TEA, karibdotoksin i iberiotoksin su korišćeni u cilju ispitivanja uloge K_{Ca} kanala u inhibitornom efektu rezveratrola na kontrakcije koje su izazvane ES i NA. U niskim milimolarnim koncentracijama TEA pokazuje selektivnost za BK_{Ca} kanale sa IC_{50} vrednošću od 2, 88 mM. Karibdotoksin inhibira BK_{Ca} kanale i K_{Ca} kanale koji sprovode jone srednjom brzinom. Inhibiciju kanala izazivaju niske, nanomolarne koncentracije karibdotoksina (K_D 0,3 nM za BK_{Ca} , a 10 nM za K_{Ca} srednje sprovodljivosti) (Wallner i sar., 1999). Koncentracija visokoselektivnog blokatora BK_{Ca} kanala (100 nM) iberiotoksina, koja je korišćena u našim eksperimentima je dovoljna za blokadu BK_{Ca} kanala. Iznenadujuće, ali ni jedan od upotrebljenih antagonista BK_{Ca} kanala nije

antagonizovao inhibitorno delovanje rezveratrola na kontrakcije izazvane NA. Inhibitorni efekat rezveratrola na kontrakcije izazvane ES na pacovskoj portnoj veni verovatno uključuju aktivaciju TEA-, karibdotoksin- i iberiotoksin-senzitivnih BK_{Ca} kanala u vaskularnom glatkom mišiću i/ili perivaskularnim nervnim završecima. Otvaranje BK_{Ca} kanala dovodi do hiperpolarizacije membrane, koja dovodi do repolarizacije. Upravo ovi kanali igraju značajnu ulogu u regulaciji ekscitacije glatkomišićne vaskularne ćelije. Poznato je da jaka depolarizacija dovodi do otvaranja BK_{Ca} kanala (Cui i sar., 2009). BK_{Ca} kanali su tetrameri sastavljeni od 4 alfa subjedinice koje formiraju poru i 4 pomoćne beta subjedinice. Postoji tkivna razlika između subjedinica koje ulaze u sastav ovog kanala. Tako se beta-1 subjedinica eksprimira u mišićnim ćelijama krvnog suda, dok se beta-3 eksprimira u nervnom tkivu (Ghatta i sar. 2006). Ranije smo imunohistohemijskom analizom pokazali da se proteini koji ulaze u sastav ovog kanala eksprimiraju u humanoj radijalnoj arteriji (Gojkovic-Bukarica i sar., 2011). Kontroverzni su podaci o postojanju BK_{Ca} kanala u endotelnim ćelijama. Najveći deo publikacija potvrđuje pretpostavku da se oni nikada ne eksprimiraju u zdravom endotelu (Sandow i Grayson, 2009). Malo je studija koje su potvrdile prisustvo ovih kanala u perivaskularnom nervnom tkivu. Martinez i sar. (2009) i Pagán i sar. (2009), potvrdili su da kontrakcije izazvane ES radijalne arterije pacova i svinje uključuju aktivnost BK_{Ca} kanala, što je pokazano i imunohistohemijom perivaskularnih nervnih završetaka. Tokom ove studije, pokazano je postojanje ovih kanala i Western blot analizom. Međutim, ovaj tip istraživanja ne ukazuje na tačnu lokaciju BK_{Ca} kanala. S obzirom da naši preparati nisu sadržali endotel, možemo pretpostaviti da se BK_{Ca} kanali nalaze u glatkoj mišićnoj ćeliji krvnog suda i/ili nervnim završecima. Da bismo odredili tačnu lokaciju, neophodno je sprovesti dalja istraživanja.

U cilju potvrde naše pretpostavke da rezveratrol inhibiše ES kontrakcije izolovane portne vene pacova aktivirajući TEA-, karibdotoksin- i iberiotoksin-senzitivne BK_{Ca} kanale u perivaskularnim nervima i/ili glatkim mišićnim

ćelijama, koristili smo visokoselektivni otvarač BK_{Ca} kanala NS 1619 (Ghatta i sar., 2006). Ponovo, dobijamo isti rezultat: ES kontrakcije su znatno osetljivije na dejstvo NS 1619, nego NA kontrakcije. Ovi rezultati su u skladu sa opisanim antivazokonstriktornim dejstvom rezveratrola na izolovanoj portnoj veni pacova i potvrđuju ulogu BK_{Ca} kanala u inhibiciji ES- i NA-kontrakcija do kojih dovodi rezveratrol.

Različiti efekti rezveratrola na ES- i NA-kontrakcije izolovane portne vene pacova mogli bi se objasniti različitim elektrofiziološkim mehanizmima koji leže u osnovi tih kontrakcija. Kod ES-kontrakcija rezveratrol se vezuje za BK_{Ca} kanal kada je on otvoren usled depolarizacije koju izaziva ES. Suprotno tome, u modelu NA kontrakcija, rezveratrol se dodaje u vodeno kupatilo 10 minuta pre NA, odnosno kada je glatka muskulatura neaktivna (BK_{Ca} kanali su zatvoreni). To bi nas navelo na pretpostavku da se rezveratrol i blokatori kalijumovih kanala vezuju različitim afinitetom za otvoreni i zatvoreni BK_{Ca} kanal. U stvari, afinitet modulatora jonskih kanala varira u zavisnosti od konformacionog stanja kanala (Aschroft, 2000). S druge strane, još uvek ne postoje publikovani dokazi o tome da rezveratrol inhibira oslobađanje neurotransmitera iz perivaskularnih nerava. Prema tome, možemo pretpostaviti da rezveratrol ipak deluje prevashodno na BK_{Ca} kanale glatke mišićne ćelije vaskularnog tkiva mada za takvu tvrdnu su neophodna dalja istraživanja.

Glibenklamid, 4-AP i margatoksin ne utiču na antivazokonstriktorni efekat rezveratrola. Ovi rezultati mogli bi nam ukazati da glibenklamid-, 4-AP- i margatoksin-senzitivni K-kanali nemaju ulogu u opisanom efektu rezveratrola na ES- i NA-kontrakcije. Glibenklamid je jedan od najspektivnijih blokatora K_{ATP} kanala. Ranija istraživanja su u skladu sa sadašnjim, tj. glibenklamid nije antagonizovao vazorelaksantni efekat rezveratrola (Novakovic i sar., 2006; Gojkovic-Bukarica i sar., 2008). U manjim koncentracijama (300 µM), 4-AP pokazuje selektivnost za Kv kanale. Suprotno sadašnjim rezultatima, ranije je pokazano da 4-AP blokira rezveratrolom izazvanu relaksaciju mezenterične

arterije i aorte pacova, kao i humane a. mamaria-e (Novakovic i sar. 2006a; 2006b; Gojković-Bukarica i sar., 2008). Međutim, u ovoj studiji koristili smo različiti eksperimentalni model (arterije su bile prethodno kontrahovane fenilefrinom i ispitivana je vazodilatacija rezveratrolom. Ova značajna razlika u rezultatima može da proistekne iz različite selektivnosti rezveratrola prema različitim tkivima. Margatoksin, selektivni inhibitor Kv1.1, 1.2 i 1.3, takođe nije uticao na efekat rezveratrola u ovoj studiji. Nasuprot tome, u ranijim istraživanjima pokazali smo da margatoksin antagonizuje vazodilatatorni efekat rezveratrola na humanoj a. mamaria-i (Novakovic i sar., 2006). S druge strane, slično rezultatima iznetim u ovoj tezi, margatoksin nije inhibirao vazorelaksaciju mezenterične arterije pacova do koje je doveo rezveratrol (Gojkovic-Bukarica i sar., 2008).

U našem istraživanju ni jedan od korišćenih antagonista K-kanala nije uticao na kontrakcije izazvane NA. Ovaj rezultat mogao bi da nam ukaže da kalijumovi kanali nemaju ulogu u inhibitornom efektu rezveratrola na NA kontrakcije. Takođe, činjenica da veće koncentracije rezveratrola ($> 30 \mu\text{M}$) kompletno inhibiraju neuralnu kontrakciju portne vene pacova u prisustvu različitih blokatora BK_{Ca} kanala, usmeravaju nas ka ideji da rezveratrol inhibira ES-kontrakcije ispitivanog krvnog suda na više različitih mesta.

Nadalje, ispitivali smo uticaj rezveratrola na transport jona kalcijuma kroz ćelijsku membranu. U posebnim serijama eksperimenata, za fazne kontrakcije vene porte koristili smo CaCl₂ (u *Ca-free* ili *high K, Ca-free* rastvoru) ili rastvor koji sadrži visoku koncentraciju jona kalijuma. Poznato je da depolarizacija ćelijske membrane glatke mišićne ćelije do koje dovodi KCl aktivira voltažno-zavisne kalcijumske kanale, izazivajući influks kalcijuma i porast intracelularne koncentracije kalcijuma. Velika mikromolarna koncentracija rezveratrola (100 μM) skoro u potpunosti (66%) inhibira KCl kontrakcije. Na osnovu ovih rezultata možemo pretpostaviti da rezveratrol inhibira kalcijum-hloridom stimulisan porast intracelularne koncentracije

kalcijuma u mišićnim ćelijama portne vene pacova. Ovo je u skladu sa publikovanim rezultatima koji ukazuju na inhibitorni efekat rezveratrola na KCl izazvane kontrakcije na izolovanoj koronarnoj arteriji svinje i torakalnoj arteriji pacova (Li i sar., 2006.; Buluc i sar. 2006).

Poznato je da portna vena nije bogata depovima intracelularnog kalcijuma. Međutim, treba uzeti u obzir i takve depoe u farmakološkim studijama na portnoj veni. Nemoguće je izazvati fazne kontrakcije portne vene pomoću NA ukoliko se preparat vene porte nalazi duže od 10 min u vodenom kupatilu koje sadrži rastvor bez jona kalcijuma. Intracelularni depoi kalcijuma u venskom preparatu se vrlo brzo isprazne ukoliko ne postoji ekstracelularni kalcijum (Burt, 2003). Pokazali smo da rezveratrol dovodi do koncentracijskizavisne inhibicije kontrakcija portne vene pacova koje prouzrokuje kalcijum-hlorid. Ove eksperimente izvodili smo nakon četrdesetpetominutnog perioda ekvilibrijuma tokom kojeg se vena porta nalazila u rastvoru bez jona kalcijuma. Ovim smo postigli potpuno pražnjenje intracelularnih depoa mišićnih ćelija, a kontrakciju smo izazivali isključivo kalcijumom koji smo dodavali u rastvor (Burt, 2003). Prema našim rezultatima, rezveratrol verovatno blokira kalcijumske kanale i influks ekstracelularnog kalcijuma u glatke mišićne ćelije. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa rezultatima istraživanja na kardiomiocitima pacova i mišićnim ćelijama koronarne arterije svinje (Campos-Toimil i sar., 2007; Li i sar., 2006).

Za dalje istraživanje uticaja rezveratrola na modulaciju kalcijumskih kanala u našem eksperimentalnom modelu koristili smo *high K*, *Ca-free* rastvor u kojem smo izazivali kontrakcije izolovane portne vene pacova pomoću kalcijum-hlorida. U ovakvom rastvoru dolazi ponovo do potpunog pražnjenja intracelularnih depoa kalcijuma, ali rastvor koji sadrži i visoki kalijum dovodi i do inhibicije kalijumovih kanala (Burt, 2005). Međutim, da bismo mogli sa sigurnošću da utvrdimo da li rezveratrol dovodi do blokade L-tipa voltažnosenzitivnih kalcijumskih kanala, neophodna su nam dalja istraživanja.

Na osnovu prethodno rečenog možemo smatrati da rezveratrol inhibira i ES- i NA-kontraksije izolovane portne vene pacova. Na osnovu farmakoloških i Western blot rezultata verovatno da se ovaj efekat zasniva na aktivaciji (otvaranju) BK_{Ca} kanala koji se nalaze u perivaskularnim nervima i/ili mišićnim ćelijama ispitivane vene. Ni jedan od korišćenih antagonista nije uticao na efekat rezveratrola na NA kontraksije kao ni na efekat velike koncentracije rezveratrola na ES kontraksije. Ovo nam ukazuje da pored toga što verovatno kalijumovi kanali imaju značajnu ulogu u antivazokonstriktornom dejstvu rezveratrola na izolovanoj portnoj veni pacova, postoje i neki drugi mehanizmi dejstva. Pretpostavljamo da rezveratrol dovodi do modulacije kalcijumskih kanala i/ili transporta jona kalcijuma kroz ćelijsku membranu.

Kao što je ranije rečeno, naringenin kao antivazokonstriktor je znatno slabije ispitivana supstanca od rezveratrola. Fazne kontraksije izolovane portne vene pacova izazivali smo dodavanjem NA, KCl i CaCl₂ u vodeno kupatilo. Kontraksije koje smo proizvodili nabrojanim vazokonstriktorima uključuju aktivaciju različitih receptora (npr. alfa 1 i alfa 2 receptora) i jonskih kanala glatke muskulature krvnog suda, bez učešća perivaskularnih nervnih završetaka. Na ovaj način ispitili smo da li naringenin direktno deluje na vaskularno mišićno tkivo.

Tokom našeg istraživanja, pokazali smo da naringenin dovodi do inhibicije kontraksija izolovane, portne vene pacova koje su izazvane NA, KCl i CaCl₂. Naringenin je doveo do maksimalne inhibicije sve tri vrste kontraksija, a EC₅₀ u ove tri grupe eksperimenata kretala se 251 do 398 μM. Na osnovu ovih podataka jasno je da rezveratrol ima znatno potentnije antivazokonstriktorno dejstvo od naringenina, tj. da je potrebno primeniti rezveratrol u manjoj koncentraciji nego naringenin da bi se postigao isti efekat. O tome nam svedoči i primenjen koncentracijski raspon naringenina tokom naučno-istraživačkog rada (0,01-1 mM).

Slična istraživanja sa naringeninom su retka. Jedno od takvih jeste opisano dejstvo naringenina na kontrakcije izolovane aorte i repne vene pacova. U pomenutom istraživanju kontrakcije krvnog suda izazivane su NA i KCl. Međutim, razlika je što su pomenuti vazokonstriktori korišćeni za postizanje toničke kontrakcije aorte i repne vene pacova (Saponara i sar., 2006). Otuda i razlika u srednjim efektivnim koncentracijama naringenina tokom našeg istraživanja na izolovanoj portnoj veni pacova i istraživanja na aorti i repnoj veni pacova (EC_{50} od 251 do 398 μ M u poređenju sa 200 μ M).

Primena KCl kao vazokonstritora (finalna koncentracija K^+ jona u vodenom kupatilu bila je 100 mM) imala je za cilj da ispitamo da li su kalijumovi kanali uključeni u antivazokonstriktorni efekat naringenina. Naringenin je na koncentracijski-zavisan način blokirao kontrakcije izazvane pomoću. Da bismo opisali ulogu kalijumovih kanala u antivazokonstriktornom delovanju naringenina, koristili smo specifične blokatore pojedinih podvrsta kalijumovih kanala (glibenklamid za ispitivanje uloge K_{ATP} kanala, TEA za ispitivanje uloge K_{Ca} kanala, 4-AP i margatoksin za ispitivanje uloge K_V kanala). Glibenklamid, kao ni TEA nisu antagonizovali dejstvo naringenina, što bi moglo da nam ukaže da K_{ATP} i K_{Ca} kanali nisu uključeni u antivazokonstriktorni efekat naringenina.

Sa druge strane, u prisustvu 4-AP naringenin ne uspeva da inhibiše kontrakciju izazvanu NA (odnosno, u prisustvu 4-AP i naringenina kontrakcija koje se proizvodi jednaka je 90% od kontrolne kontrakcije). Ovakav rezultat nam ukazuje da 4-AP antagonizuje dejstvo naringenina, odnosno upućuje nas da dalje ispitamo ulogu K_V kanala u antivazokonstriktornom dejstvu naringenina. Visoko-specifični blokator K_V kanala, margatoksin, primenjen u koncentraciji u kojoj selektivno blokira ovu podvrstu kalijumovih kanala, dovodi do potpunog antagonizma, odnosno u njegovom prisustvu naringenin ne ostvaruje svoje antivazokonstriktorno dejstvo. Ovakav rezultat nam ukazuje na značaj K_V kanala u delovanju naringenina. Naši rezultati nisu u skladu sa

istraživanjima koja su sprovedena na ćelijskim kulturama *Xenopus oocita* i *HEK* ćelijama. Tokom tih istraživanja pokazano je da je naringenin najpotentniji blokator $K_v11.1$ kanala od svih ispitivanih flavonoida. Pokazano je da blokira ove kanale sa EC_{50} 102,3 mL/1 (u kulturi ćelija *Xenopus oocita*), tj sa EC_{50} 36,5 mol/1 u *HEK* ćelijama (Zitron i sar., 2005). Upravo delovanje na ove kanale može da ima značaj u nastanku više različitih željenih i neželjenih efekata naringenina. Kao što je u uvodu detaljno opisano uloga K_v kanala u kardiovaskularnom sistemu je višestruka. Pored značajne uloge u regulaciji tonusa glatke muskulature krvnog suda, ovi kanali imaju značaj u srčanoj aktivnosti. Blokada $K_v11.1$ (HERG) kanala srca dovodi do produženja QT intervala i razvoja aritmija. U prilog ovome ide i studija sprovedena na zdravim dobrovoljcima upravo ukazuje da sok od grejfruta dovodi do pojave srčanih aritmija (Zitron i sar., 2005).

Pored opisanog, pokazali smo da naringenin dovodi do inhibicije $CaCl_2$ kontrakcija izolovane vene porte pacova u *Ca-free* rastvoru. Na ovaj način smo pokazali da značajnu ulogu u efektima naringenina ima u L-tip voltažno-zavisnih kanala ćelijske membrane. Na osnovu dobijenih rezultata možemo smatrati da naringenin, slično rezveratrolu, dovodi do blokade ovih kanala, onemogućava ulazak jona Ca^{2+} u ćeliju i na taj način sprečava kontrakciju krvnog suda. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima *patch clamp* eksperimenata koji su sprovedeli na mišićnim ćelijama repne arterije pacova. Naime, pokazano je da naringenin (EC_{50} od 100 μ M) blokira $Ca_v1.2$ kanale (Saponara i sar., 2011)

VAZODILATORNO DEJSTVO REZVERATROLA I NARINGENINA

Vazodilatatorno dejstvo rezveratrola i naringenina ispitivali smo na razvijenom tonusu izolovane, humane pupčane vene. Kao što je rečeno,

nasuprot našim očekivanjima rezveratrol i naringenin nisu pokazali istu vazodilatatornu potentnost na našem eksperimentalnom modelu. Rezveratrol je znatno snažniji vazodilatator, mada je maksimalna efikasnost oba polifenola bila 100%.

Mnoge studije su pre nas opisale vazodilatatorni efekat rezveratrola na izolovanim krvnim sudovima eksperimentalnih životinja. Međutim, vazorelaksantni efekat rezveratrola na humanim izolovanim krvnim sudovima nije jasno definisana. Rezveratrol inhibira kontrakcije izolovane aorte, mezenterične arterije i arterije uterine pacova i zamorca, koronarne arterije svinje, itd. U studijama koje su se izvodile na nabrojanim krvnim sudovima, krvni sudovi su prethodno bili kontrahovani pomoću NA, fenilefrina, ili KCl (Novaković i sar., 2006.; Naderali i sar., 2000; Gojković-Bukarica i sar., 2008; Jager i Nguyen-Duong, 1999). Ranije je u našoj laboratoriji pokazano da rezveratrol dovodi do endotel-nezavisne relaksacije humane mamarne arterije (Novaković i sar., 2006). U većini publikacija koncentracijski raspon u kojem rezveratrol dovodi do vazodilatacije je sličan, a EC_{50} vrednosti rezveratrola prema podacima iz literature kreću se između 30 i 50 μ M. Eksperimentalni model kojeg smo koristili za opis vazodilatatornog dejstva rezveratrola i naringenina, tj. humana umbilikalna vena pokazao se kao jedan od najosetljivijih krvnih sudova na opisano dejstvo rezveratrola. Tako smo pokazali da se EC_{50} vrednost rezveratrola u našem istraživanju kreće oko 16 μ M. Rezveratrol je, primenjen u sličnoj koncentraciji (EC_{50} vrednost oko 10 μ M), doveo do vazodilatacije mezenterične arterije pacova (Gojković-Bukarica i sar., 2008). Ovi rezultati nam ukazuju da strukturne osobine krvnih sudova utiču na vazodilatatorno dejstvo rezveratrola. Poznato je da je struktura umbilikalnih krvnih sudova drugačija u odnosu na ostale krvne sudove u našem organizmu. Zid ovih krvnih sudova je znatno tanji, pri čemu je muskulatura dobro razvijena; umbilikalna vena ima dobro razvijenu laminu elasticu internu, dok medijalni sloj krvnog suda sadrži helikoidna mišićna

vlakna (Skulstad i sar., 2004). Pretpostavljamo da upravo ove razlike u strukturi humane umbilikalne vene u odnosu na ostale krvne sudove našeg organizma utiču na veću senzitivnost humane umbilikalne vene prema rezveratrolu.

Vazodilatatorni efekat naringenina ispitivan je na svega nekoliko izolovanih krvnih sudova eksperimentalnih životinja. Pokazano je da naringenin dovodi do vazorelaksacije izolovane aorte pacova, kao i repne arterije koje su prethodno bile kontrahovane pomoću KCl ili NA (Saponara i sar., 2006). Poredeći EC_{50} vrednosti naringenina u publikovanim studijama (od 180 do 200 μ M) sa EC_{50} vrednošću koja je dobijena u našem istraživanju (176 μ M) možemo zaključiti da izolovana humana umbilikalna vena nije osetljivija na vazorelaksantnu aktivnost naringenina u poređenju sa ostalim ispitivanim krvnim sudovima. Za razliku od rezveratrola izgleda da vazodilatatorni efekat naringenina ne zavisi od strukture ispitivanog krvnog suda. Međutim, moramo uzeti u obzir da ispitivani polifenoli možda imaju različit mehanizam dejstva. Svakako, možemo zaključiti da je rezveratrol znatno potentniji vazodilatator izolovane humane umbilikalne vene bez endotela nego naringenin.

U cilju ispitivanja uloge kalijumovih kanala u vazodilataciji, do koje dovode rezveratrol i naringenin, segmenti izolovane humane umbilikalne vene kontrahovani su pomoću 100 mM K^+ . Visoka ekstracelularna koncentracija jona K^+ smanjuje hemijski gradijent jona K^+ i inhibira njihov efluks. Na ovaj način smanjuje se efekat supstanci koje aktiviraju kalijumove kanale (Cairrao i sar., 2008). Rezveratrol i naringenin dovode do koncentracijski zavisne relaksacije humane umbilikalne vene bez endotela koja je prethodno bila kontrahovana sa 100 mM K^+ . Ovi rezultati ukazuju nam na značaj kalijumovih kanala u mehanizmu dejstva putem kojeg ispitivani polifenoli dovode do relaksacije umbilikalne vene. Međutim, rastvor koji sadrži visoku koncentraciju K^+ u potpunosti inhibira dejstvo rezveratrola kada se ovaj polifenol primeni u koncentracijama od 1 do 30 μ M. Veće koncentracije rezveratrola relaksiraju izolovanu humanu umbilikalnu venu u ovoj seriji eksperimenata. Ovo nas

upućuje na pretpostavku da rezveratrol primenjen u koncentraciji većoj od 30 μM verovatno uključuje još neki mehanizam vazodilatatornog dejstva, koji je nezavisan od kalijumovih kanala. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim koji opisuju efekat rezveratrola na drugim krvnim sudovima. Naringenin je izazvao slične efekte na izolovanoj aorti pacova koja je prethodno kontrahovana pomoću 60 mM KCl (Saponara i sar., 2006). Zahvaljujući navedenim podacima iz literature, kao i podacima koje smo dobili tokom naše studije, možemo pretpostaviti da kalijumovi kanali imaju značajnu ulogu u vazodilataciji humane umbilikalne vene do koje dovodi naringenin. Vazorelaksantna aktivnost rezveratrola i naringenina je smanjena u prisustvu visoke koncentracije K^+ jona. Upravo ovakvi rezultati su u skladu sa farmakodinamskim osobinama tipičnih otvarača kalijumovih kanala (Magnon i sar., 1998).

Kao što smo prethodno opisali kalijumovi kanali igraju značajnu ulogu u kontroli fetoplacentalnog protoka krvi. Wareing i sar. pokazali su značaj kalijumovih kanala u funkciji placentalnih krvnih sudova. Tokom istraživanja, determinisali su mRNK, kao i proteine koji ulaze u sastav Kv2.1 i Kv9.3 kanala, TWIK kanala, BK_{Ca} i K_{ATP} kanala placente. Eksperimenti su rađeni u prisustvu različitih koncentracija kiseonika (20, 7 i 2%) kako bi pokazali uticaj oksigenacije na aktivnost ovih kanala. Zaključili su da najveći uticaj u regulaciji tonusa krvnih sudova placente imaju Kv i K_{ATP} kanali. (Wareing i sar., 2006). Pored toga, Dong i sar. su pokazali da calcitonin-gene-related peptid može da ima značajnu ulogu u kontroli tonusa fetoplacentalnih krvnih sudova aktivirajući K_{ATP} kanale. Sa druge strane, prema našem saznanju kalijumovi kanali za sada nisu identifikovani u mišićnim ćelijama humane umbilikalne vene.

U cilju ispitivanja uloge različitih K-kanala u vazodilatatornom efektu naringenina i rezveratrola koristili smo blokatore ovih kanala (glibenklamid, 4-AP, TEA i BaCl_2). Na ovaj način analizirali smo ulogu K_{ATP} , Kv, K_{Ca} i Kir kanala u vazodilatatornom efektu ispitivanih polifenola. Kao što je poznato,

glibenklamid je jedan od najselektivnijih blokatora K_{ATP} kanala. Međutim, kada se primeni u većoj koncentraciji glibenklamid gubi selektivnost (Teramoto i sar., 2006). Za ispitivanje uloge K_v kanala koristili smo 4-AP u koncentraciji 1 mM. TEA pokazuje selektivnost za BK_{Ca} kanale. Barijum primenjen u koncentraciji od 1 do 10 μ M inhibira K_{ir} kanale glatke mišićne ćelije (Quayle i sar., 1993). Svi upotrebljeni blokatori kalijumovih kanala antagonizuju efekat rezveratrola. Ovi rezultati ukazuju da svi ispitivani (pod)tipovi kalijumovih kanala mogu imati značajnu ulogu u vazodilataciji humane umbilikalne vene bez endotela do koje dovodi rezveratrol. Ova pretpostavka je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Li i Forstermann, 2009).

Ovo je jedna od retkih studija koja opisuje značaj K_{ATP} kanala u vazodilatatornom dejstvu rezveratrola. Poznato je da je glibenklamid jedan od najselektivnijih i najčešće korišćenih blokatora K_{ATP} kanala. Koncentracija glibenklamida potrebna da se blokiraju K_{ATP} kanali kreće se između 20 i 200 nM (Beech i sar., 1993). Glibenklamid u koncentraciji manjoj od 10 μ M je visoko selektivan za vaskularne K_{ATP} kanale. Poznato je da su K_{ATP} kanali senzori ćelijskog metabolizma i da imaju značajnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa: blokada K_{ATP} kanala dovodi do vazokonstrukcije i depolarizacije ćelijske membrane mišićne ćelije krvnog suda, dok je aktivacija povezana sa nekoliko patofizioloških procesa. Na primer, vazodilatacija koja nastaje kao posledica aktivacije K_{ATP} kanala javlja se tokom hipoksije, reaktivne hiperemije, acidoze i endotoksičnog šoka. Poznato je da je aktivacija K_{ATP} kanala prisutna u ishemiji, diabetesu i hipertenziji (Ko i sar., 2008).

U našoj studiji glibenklamid (10 μ M) antagonizuje dejstvo rezveratrola na HUV. Ovaj rezultat može da ukaže da rezveratrol aktivira K_{ATP} kanale na HUV i dovodi do vazodilatacije. Naši rezultati su u korelaciji sa rezultatima koji su dobijeni tokom elektrofizioloških ispitivanja koji su ukazali da rezveratrol pojačava aktivnost K_{ATP} kanala (Chen i sar., 2008). Sa druge strane, Hambrock i sar. su pokazali da rezveratrol blokira K_{ATP} kanal, vezujući se za regulatornu

SUR subjedinicu u beta ćelijama pankreasa (Hambrock i sar., 2007). Takođe, rezveratrol je blokirao jonsku struju K_{ATP} kanala u insulinoma ćelijama (Jakab i sar., 2008). Kontroverzni rezultati koji govore o aktivaciji K_{ATP} kanala rezveratrolom koje smo opisali tokom ovog istraživanja možemo da objasnimo različitim eksperimentalnim modelom koji smo ovde koristili, kao i selektivnošću rezveratrola za različite vrste tkiva. U svakom slučaju, možemo da zaključimo da bi aktivacijom K_{ATP} kanala, rezveratrol mogao da ima protektivnu ulogu u kontroli tonusa humane umbilikalne vene u uslovima hipoksije, hipertenzije, kao i stanjima koja su povezana sa njima kao što su preeklampsija i eklampsija.

Western blot rezultati dobijeni tokom naše studije ukazuju na postojanje Kir6.1 proteina u uzorcima izolovane humane umbilikalne vene. S obzirom da ispitivani uzorci u našoj studiji nisu sadržali endotel, možemo pretpostaviti da su Kir kanali u mišićnim ćelijama venskog krvnog suda. Međutim, farmakološka analiza prezentovana u ovoj studiji ukazuje na postojanje i drugih vrsta kalijumovih kanala u mišićnim ćelijama humane umbilikalne vene.

Za razliku od jasno opisane uloge K_{ATP} kanala, tačna uloga Kir kanala u vaskularnim glatkim mišićima je još uvek nepoznata. Porast ekstracelularne koncentracije jona K^+ može da aktivira Kir kanale i dovede do vazodilatacije. Takođe, postoje podaci koji ukazuju da se Kir kanali aktiviraju tokom hipertenzije, ishemije, hipertrofije i dijabetesa (Ko i sar., 2008). Joni barijuma u koncentracijskom opsegu od 1 do 10 μ M inhibiraju Kir kanale u glatkim mišićnim ćelijama (Quayle i sar., 1993). U našem istraživanju $BaCl_2$ primenjen je u koncentraciji od 1 i 3 mM, što je dovoljno za blokadu Kir kanala. S obzirom, da je $BaCl_2$ antagonizovao dejstvo rezveratrola na izolovanu humanu umbilikalnu venu, možemo pretpostaviti da rezveratrol uključuje aktivaciju Kir kanala u vazodilatatorno dejstvo.

Istovremena inkubacija izolovanog venskog krvnog suda sa glibenklabidom 4-AP, TEA i $BaCl_2$ u potpunosti inhibira efekat rezveratrola u

koncentraciji od 1 do 30 μM , dok redukuje efekat rezveratrola primenjenog u većim koncentracijama (od 30 do 100 μM). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koji opisuju efekat rezveratrola na humanu umbilikalnu venu bez endotela prethodno kontrahovanu pomoću 100 mM K^+ . Ovo bi moglo da ukaže da veće doze rezveratrola uključuju neki drugi vazodilatatorni mehanizam koji je nezavisan od kalijumovih kanala. Poznato je da rezveratrol utiče na aktivnost i drugih jonskih kanala, kao i da proizvodi različite intracelularne efekte. Na primer, rezveratrol utiče na intracelularnu koncentraciju jona kalcijuma, aktivira estrogenske receptore u jedru i van njega (Li i Forstermann, 2009), povećava cGMP (El-Mowafy, 2002) i smanjuje senzitivnost mišićnih vlakana na jona kalcijuma (Buluc i Demirel-Yilmaz, 2006). Međutim, da bismo identifikovali ciljni molekul(e) u vaskularnom mišiću preko kojeg rezveratrol primenjen u koncentraciji preko 30 μM ostvaruje vazodilatatorno dejstvo neophodna su dalja istraživanja.

Za razliku od vazodilatatornog dejstva rezveratrola kod kojeg smo pokazali da značajnu ulogu imaju svi ispitivani K-kanali, naringenin do vazodilatacije dovodi aktivirajući samo K_v kanale. Blokator K_v kanala, 4-AP antagonizuje efekat naringenina. Na osnovu dobijenog rezultata pretpostavljamo da vazodilatatorni efekat naringenina na izolovanoj, humanoj umbilikalnoj veni bez endotela uključuje aktivaciju 4-AP-senzitivnih kalijumovih kanala. Nasuprot tome, rezultati *patch-clamp* eksperimenata pokazali su da naringenin (30 μM) ne moduliše K_v 1.3 kanale u humanim T limfocitima (Teisseyre i sar., 2009). Međutim, naringenin blokira ether-a-go-go-related gen (HERG) kanale (K_v 11.1). Ovaj rezultat objašnjava značajno produženje QT intervala kod zdravih dobrovoljaca nakon konzumiranja soka od grejpfruta (Lin i sar., 2008). Različitost opisanih rezultata ukazuje na činjenicu da različiti eksperimentalni modeli pokazuju različitu osetljivost na dejstvo naringenina.

Prema našim saznanjima do sada nijedna studija nije opisala naringenin kao otvarača K_{ATP} kanala. Međutim, tokom naše studije glibenklamid primenjen u koncentraciji od 30 μM antagonizuje efekat naringenina na izolovanu humanu umbilikalnu venu. Na osnovu ovog rezultata mogli bi da pretpostavimo da vazodilatatorno dejstvo naringenina uključuje i aktivaciju K_{ATP} kanala. Treba imati u vidu da glibenklamid primenjen u dozi od 30 μM pored toga što blokira K_{ATP} kanale ćelijske membrane dovodi i do blokade ovog tipa kalijumovih kanala koji su lokalizovani u membrani mitohondrija.

U visokoj koncentraciji ($> 10 \mu M$) glibenklamid ima intracelularna dejstva (modulira promet intracelularnog Ca^{2+} , njegovo oslobađanje iz sarkoplazmatskog retikuluma i blokira intracelularne K_{ATP} kanale). Pored toga, primenjen u visokoj koncentraciji, glibenklamid može da blokira i ostale jonske kanale (Teramoto i sar., 2006; Russ i sar., 1996). Samo u visokoj koncentraciji (30 μM), glibenklamid je antagonizovao vazodilatatorno dejstvo naringenina. Poznato je da su K_{ATP} kanali prisutni na membranama različitih organela (sarkolema, nukleus, mitohondrije), a da svojom aktivacijom povezuju aktivnost organela na kojima se nalaze. Takođe, poznato je da intracelularni K_{ATP} kanali imaju protektivnu ulogu (Zhuo i sar., 2005). Na osnovu rezultata koji su dobijeni tokom našeg istraživanja, možemo reći da naringenin ne dovodi do aktivacije K_{ATP} kanala koji se nalaze na membrani mišićnih ćelija HUV. Takođe, ne možemo isključiti delovanje naringenina na neki drugi jonski kanal.

Na kraju, sa sigurnošću tvrdimo da je ovo jedna od prvih studija koja opisuje delovanje rezveratrola i naringenina na izolovane venske krvne sudove, tj. na glatke mišiće ispitivanih vena. Možemo zaključiti da ispitivani polifenoli, rezveratrol i naringenin, imaju antivazokonstriktorno i vazodilatatorno dejstvo na ispitivanim, izolovanim venskim krvnim sudovima. Istraživanje može da ima značaj u razvoju polifenola kao lekova i njihovoj primeni u različitim patološkim stanjima tokom trudnoće, kao i u terapiji oboljenja koja su praćena poremećajem portne cirkulacije (npr. portna hipertenzija). Kao što je prethodno

opisano, tokom trudnoće hipoksija predstavlja stanje koje najčešće dovodi do poremećaja rasta i razvoja ili untrauterine smrti ploda. Upravo bi primena ovih supstanci mogla da ima značaj u takvim stanjima. Vazodilatacijom humane pupčane vene, kao jedinog krvnog suda koji dovodi krv do fetusa, poboljšalo bi se dopremanje krvi od majke do ploda i smanjio bi se negativan uticaj hipoksije. Sa druge strane, terapija portne hipertenzije predstavlja izazov za lekare. Još uvek možemo govoriti da nedostaju lekovi koji bi imali povoljan efekat na pritisak u portnoj veni, a da pri tome ne dođe do neželjenih efekata od strane drugih organa ili krvnih sudova. Upravo polifenoli mogu da nađu mesto u terapiji oboljenja koja su praćena poremećajem portne cirkulacije.

VI ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u toku farmakološke analize efekata rezveratrola i naringenina, kao i rezultata *Western blot* analize, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Rezveratrol i naringenin pokazuju antivazokonstriktorne i vazodilatatorne efekte na portnoj veni pacova i humanoj pupčanoj veni koje su prethodno kontrahovane na različite načine.
2. Ispitivani krvni sudovi sadrže K-kanale u glatkim mišićnim ćelijama. Ovi kanali imaju značajnu ulogu u vazorelaksantnim efektima rezveratrola i naringenina.
3. U okviru analize mehanizma dejstva rezveratrola i naringenina na izolovanim venskim krvnim sudovima možemo zaključiti da je njihovo dejstvo endotel-nezavisno, kao i da postoje dodatni mehanizmi dejstva koji nisu vezani za otvaranje K-kanala. Takođe, možemo zaključiti da rezveratrol poseduje i presinaptički efekat.

VII LITERATURA

- Adams RH. Molecular control of arterial-venous blood vessel identity. *J Anat* 2003;202:105-112.
- Adaramoye OA, Medeiros IA. Endothelium-independent vasodilation induced by kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, in rat superior mesenteric arteries. *J Smooth Muscle Res* 2009;45:39-53.
- Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M, Sharpe N. Does a glass of red wine improve endothelial function? *Eur Heart J* 2000;21:74-78.
- Amberg GC, Bonev AD, Rossow CF, Nelson MT, Santana LF. Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca^{2+} activated K^{+} channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin Invest* 2003;112:717-724.
- Amira S, Rotondo A, Mulè F. Relaxant effects of flavonoids on the mouse isolated stomach: structure-activity relationships. *Eur J Pharmacol* 2008;599:126-30.
- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr* 201;108:1532-1549.
- Anna KJ, Lasse S. Flavonoids and the CNS. *Molecules* 2011; 16:1471-1485.
- Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MSP, Ashcroft FM. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the K_{ATP} channel Kir 6.2 subunit. *EMBO J* 2005;24:229-239.
- Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1982;30:1766-1770.

- Asano M, Nomura Y, Ito K, Uyama Y, Imaizumi Y, Watanabe M. Increased function of voltage-dependent Ca²⁺ channels and Ca²⁺-activated K⁺ channels in resting state of femoral arteries from spontaneously hypertensive rats at prehypertensive stage. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:775-783.
- Ashcroft FM. *Ion Channels and Disease*. 1st ed. San Diego (CA): Academic Press, 2000.
- Atanacković M, Posa M, Heinle H, Gojkovic-Bukarica L, Cvejic J. Solubilization of resveratrol in micellar solutions of different bile acids. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;72:148-154.
- Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 2001;158:195-198.
- Bansal T, Awasthi A, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Pre-clinical evidence for altered absorption and biliary excretion of irinotecan (CPT-11) in combination with quercetin: possible contribution of P-glycoprotein. *Life Sci* 2008;83:250-259.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006;444:337-342.
- Beech DJ, Zhang H, Nakao K, Bolton TB. K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1993;110:573-582.
- Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* 2008;56:6185-6205.
- Bertelli A, Falchi M, Dib B, Pini E, Mukherjee S, Das DK. Analgesic resveratrol? *Antioxid Redox Signal* 2008;10:403-404.

- Bienengraeber M, Timothy MO, Vitaliy AS, Kathmann EC, O'Coilain F, Gao F, et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat Genet* 2004;4:382-387.
- Bolotina V, Gericke M, Bregestovski P. Kinetic differences between Ca²⁺-dependent K⁺ channels in smooth muscle cells isolated from normal and atherosclerotic human aorta. *Proc Biol Sci* 1991;244:51-55.
- Booth AN, Jones FT, De Eds F. Metabolic and glucosuria studies on naringin and phloridzin. *J Biol Chem* 1958;233:280-282.
- Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 2005;280:17187-17195.
- Bredsdorff L, Nielsen IL, Rasmussen SE, Cornett C, Barron D, Bouisset F, et al. Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from alpha-rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *Br J Nutr* 2010;103:1602-1609.
- Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckmann DM, Kosek JC, Wiler SW, et al. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 2000;407:870-876.
- Bronstein-Sitton N. The ether-a-go-go related gene (erg) voltage-gated K⁺ channels: a common structure with uncommon characteristics. *Modulator* 2006;21:13-15.
- Buluc M., Demirel-Yilmaz E. Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium. *Vascular Pharmacol* 2006;44:231-237.
- Burt RP. Depletion of Ca²⁺ from intracellular stores of the rat portal vein stimulates a tonic contraction. *Eur Jof Pharmacol* 2005;510: 97-105.

- Burt RP. Phasic contractions of the rat portal vein depend on intracellular Ca²⁺ release stimulated by depolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1808-H1817.
- Cadenas S, Barja G. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1531-1537.
- Cairrão E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008;376:375-383.
- Caliskan E, Kayhan Z, Tufan H. Propofol inhibits potassium chloride induced contractions of isolated human umbilical vessels. *Eur J Anaesthesiol* 2006;23:411-417.
- Campbell JD, Sansom MSP, Ashcroft FM. Potassium channel regulation. *EMBO Rep* 2003;4:1038-1042.
- Campos-Toimil M, Elías J, Alvarez E, Verde I, Orallo F. Effects of trans- and cis-resveratrol on Ca²⁺ handling in A7r5 vascular myocytes. *Eur J Pharmacol* 2007;577:91-99.
- Candelario-Jalil E, de Oliveira AC, Gräf S, Bhatia HS, Hüll M, Muñoz E, et al. Resveratrol potently reduces prostaglandin E₂ production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation* 2007;4:25.
- Castelli WP. The new pathophysiology of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998;82:60T-65T.
- Chang T, Wu L, Wang R. Altered expression of BK channel beta1 subunit in vascular tissues from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2006;19:678-685

- Chen YR, Yi FF, Li XY, Wang CY, Chen L, Yang XC, et al. Resveratrol attenuates ventricular arrhythmias and improves the long-term survival in rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 2008;22:479-485.
- Choudhury R, Chowrimootoo G, Srail K, Debnam E, Rice-Evans CA. Interactions of the flavonoid naringenin in the gastrointestinal tract and the influence of glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:410-415.
- Chuang CC, McIntosh MK. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu Rev Nutr* 2011;31:155-176.
- Cogolludo A, Frazziano G, Briones AM, Cobeño L, Moreno L, Lodi F, et al. The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H₂O₂. Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res* 2007;73:424-431.
- Čokić VP, Beleslin-Cokic BB, Tomic M, Stojilkovic SS, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. *Blood* 2006;108:184-191.
- Côrtés SF, Rezende BA, Corriu C, Medeiros IA, Teixeira MM, Lopes MJ, et al. Pharmacological evidence for the activation of potassium channels as the mechanism involved in the hypotensive and vasorelaxant effect of dioclein in rat small resistance arteries. *Br J Pharmacol* 2001;133:849-858.
- Counet C, Callemien D, Collin S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry* 2006;98:649-657.
- Cox RH, Lozinskaya I, Dietz NJ. Differences in K⁺ current components in mesenteric artery myocytes from WKY and SHR. *Am J Hypertens* 2001;14:897-907.
- Cui J, Yang H, Lee US. Molecular Mechanisms of BK Channel Activation. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:852-875.

- Dal BS, Moreira EG, Brandão FC, Horst H, Pizzolatti MG, Micke GA, et al. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries. *J Pharmacol Sci* 2008;106:234-241.
- Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* 2006;6:36-47.
- Das S, Alagappan VK, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK. Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascul Pharmacol* 2005;42:281-289.
- de Moura RS, Miranda DZ, Pinto AC, Pinto AC, Sicca RF, Souza MA, et al. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:302-309.
- Devine CE, Somlyo AV, Somlyo AP. Sarcoplasmic Reticulum And Excitation-Contraction Coupling in Mammalian Smooth Muscle. *J Cell Biol* 1972;52:690-718.
- Doré S. Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1276-1282.
- Duffy SJ, Vita JA, Holbrook M, Swerdloff PL, Keaney Jf. Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2001;21:1084-1089.
- Eguchi D, Katusic ZS. Inhibitory effect of valves on endothelium-dependent relaxations to calcium ionophore in canine saphenous vein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H892-H898.

- El-Mowafy AM. 2002. Resveratrol activates membrane-bound guanylyl cyclase in coronary arterial smooth muscle: a novel signaling mechanism in support of coronary protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:1218-1224.
- England SK, Wooldridge TA, Stekiel WJ, Rusch NJ. Enhanced single-channel K⁺ current in arterial membranes from genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 1993;264:1337-1345.
- Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, et al. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 2004;23:197-204.
- Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr* 2001;131:235-241.
- Felgines C, Texier O, Morand C, Manach C, Scalbert A, Régerat F, et al. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1148-G1154.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. 1993. Endothelium dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 1993; 265:H774-H778.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen P, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:90-95.
- Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993;341:1103-1104.
- Freedman JE, Parker C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001;103: 2792-2798.

- Friedman LA, Kimball AW. Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham. *Am J Epidemiol* 1986;124:481- 489.
- Fröjdö S, Durand C, Pirola L. Metabolic effects of resveratrol in mammals--a link between improved insulin action and aging. *Curr Aging Sci* 2008;1:145-51.
- Fusi F, Cavalli M, Mulholland D, Crouch N, Coombes P, Dawson G, et al. Cardamonin is a bifunctional vasodilator that inhibits Ca(v)1.2 current and stimulates K(Ca)1.1 current in rat tail artery myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;332:531-540.
- Gao Q, Yang B, Ye Z, Wang J, Bruce IC, Xia Q. Opening the calcium-activated potassium channel participates in the cardioprotective effect of puerarin. *Eur J Pharmacol* 2007;574:179-184.
- Gargouil YM, Perdrix L, Chapelain B, Gaborieau R. 1989. Effects of Daflon 500 mg on bovine vessels contractility. *Int Angiol* 1989;8:19-22.
- Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 2006;110:103-116.
- Giudicessi JR, Ackerman MJ. Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias--diagnosis and therapy. *Nat Rev Cardiol* 2012;9:319-332.
- Gojković Bukarica Lj, Kažić T. Jonski kanali i kanalopatije. U: Kažić T, Ostojić M. *Klinička kardiovaskularna farmakologija*. 4. izd. Beograd: Inegra, 2004: 37-58.
- Gojković-Bukarica L, Hambrock A, Löffler-Walz C, Quast U, Russ U. Mg²⁺ sensitizes KATP channels to inhibition by DIDS: dependence on the sulphonylurea receptor subunit. *Br J Pharm* 2002;137:429-440.
- Gojković-Bukarica L, Kazic T. Differential effects of pinacidil and levcromakalim on the contractions elicited electrically or by

- noradrenaline in the portal vein of rabbit. *Fundam Clin Pharmacol* 1999;13: 527-534.
- Gojković-Bukarica L, Novakovic A, Kanjuh V, Bumbasirevic M, Lesic A, Heinle H. A role of ion channels in the endothelium-independent relaxation of rat mesenteric artery induced by resveratrol. *J Pharmacol Sci* 2008; 108: 124-130.
- Gojkovic-Bukarica L, Savic N, Peric M, Markovic-Lipkovski J, Cirovic S, Kanjuh V, et al. Effect of potassium channel opener pinacidil on the contractions elicited electrically or by noradrenaline in the human radial artery. *Eur J Pharmacol* 2011;654:266-273.
- Gojković-Bukarica Lj, Kanjuh V. Kalijumovi kanali u kardiovaskularnom sistemu: struktura, funkcija i farmakološka modulacija. U: Ostojić M, Kanjuh V, Beleslin B. *Kardiologija*. 1. izd. Beograd: Zavod za udžbenike, 2011: 1236-1242.
- Gojković-Bukarica Lj, Protić D, Kanjuh V, Heinle H, Novaković R, Šćepanović R. Cardiovascular effects of resveratrol. *Vojnosanitetski pregled*, 2013 (u štampi) DOI: 10.2298/VSP120613012G.
- Goldstein SA, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:527-540.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 2003B;108:2034-2040.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivomonitoring of ROS. *Circulation* 2003A;108:1912-1916.
- Griffiths LA, Barrow A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J* 1972;130:1161-1162.

- Griffiths LA, Smith GE. Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J* 1972;128:901-911.
- Gruber J, Tang SY, Halliwell B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:530-542.
- Guagliardo NA, Yao J, Hu C, Schertz EM, Tyson DA, Carey RM, et al. TASK-3 channel deletion in mice recapitulates low-renin essential hypertension. *Hypertension* 2012;59:999-1005.
- Guarente L. Sirtuins in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007;72:483-488.
- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, et al. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 2003;55(4):583-586.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:473-508.
- Haider S, Grotessi A, Hall BA, Ashcroft FM, Sansom MSP. Conformational dynamics of the ligand-binding domain of inward rectifier K channels as revealed by molecular dynamics simulations: toward an understanding of Kir channel gating. *Biophys J* 2005;88:3310-3320.
- Hambrock A, de Oliveira Franz CB, Hiller S, Grenz A, Ackermann S, Schulze DU, et al. Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. *J Biol Chem*. 2007;282:3347-3356.

- Hambrock A, Löffler-Walz C, Kurachi Y, Quast U. Mg²⁺ and ATP dependence of K(ATP) channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* 1998; 125:577-583.
- Hardman JG, Limbird LE. Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2011.
- Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griending KK.. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003;4, 51-61.
- Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1988-H1995.
- Hebbar V, Shen G, Hu R, Kim BR, Chen C, Korytko PJ, et al. Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. *Life Sci* 2005;76:2299-2314.
- Hodgson DM, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Bienengraeber M, Ozcan C. Cellular remodeling in heart failure disrupts KATP channel-dependent stress tolerance. *EMBO J* 2003;8:1732-1742.
- Holmuhamedov EL, Jovanović S, Dzeja PP, Jovanović A, Terzić A. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol* 1998;275:H1567-1576.
- Hughes J, Vane JR. An analysis of the responses of the isolated portal vein of the rabbit to electrical stimulation and to drugs. *Br J Chemother* 1967;30:46-66.
- Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1996-H2003.
- Iwasaki-Kurashige K, Loyaga-Rendon RY, Matsumoto H, Tokunaga T, Azuma H. Possible mediators involved in decreasing peripheral vascular

resistance with blackcurrant concentrate (BC) in hind-limb perfusion model of the rat. *Vascul Pharmacol* 2006;44:215-223.

Jahangir A, Terzic A. KATP channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:99-112.

Jakab M, Lach S, Bacová Z, Langelüddecke C, Strbák V, Schmidt S, et al. Resveratrol inhibits electrical activity and insulin release from insulinoma cells by block of voltage-gated Ca⁺ channels and swelling-dependent Cl⁻ currents. *Cell Physiol Biochem* 2008;22:567-578.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218-220.

Jiang H, Xia Q, Wang X, Song J, Bruce IC. Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. *Pharmazie* 2005;60:444-447.

Jimenez R, Lopez-Sepulveda R, Kadmiri M, Romero M, Vera R, Sánchez M, et al. Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med* 2007;43:462-473.

Jin J, Park S, Bae J, Cho HC, Lim JG, Park WS, et al. Uncoupling by (-)-epigallocatechin-3-gallate of ATP-sensitive potassium channels from phosphatidylinositol polyphosphates and ATP. *Pharmacol Res* 2007;56:237-247.

Johnson JJ, Nihal M, Siddiqui IA, et al. Scarlett CO, Bailey HH, Mukhtar H, et al. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Mol Nutr Food Res* 2011;55: 1169-1176.

Juan SH, Cheng TH, Lin HC, Chu YT, Lee WS. Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:41-48.

- Juana ME, Buenafuentea J, Casalsb I, Planasa JM. Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats *Food Research International* 2002;35:195–199.
- Kane MO, Etienne-Selloum N, Madeira SV, Sarr M, Walter A, Dal-Ros S, et al. Endothelium-derived contracting factors mediate the Ang II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. *Pflugers Arch* 2010;459:671–679.
- Kang D, Choe C, Kim D. Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and Traak. *J Phzsiol* 2005;564.1:103-116.
- Kang DG, Yin MH, Oh H, Lee DH, Lee HS. Vasorelaxation by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Med* 2004;70:718–722.
- Karlsson J, Emgard M, Brundin P, Burkitt MJ. trans-resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tert-butyl hydroperoxide: electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. *J Neurochem* 2000;75:141-150.
- Katz AM. *Physiology of the Heart*. 2 nd ed. New York (NY): Raven Press, 1992.
- Kazić T, Gojković-Bukarica L. Potassium channels and the development of new drugs. *Med Pregl* 1998;51:481-488.
- Kazić T, Gojković-Bukarica Lj. Ion channels and drug development focus on potassium channels and their modulators. *Medicine and Biology* 1999;1:23–30.
- Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* 2000;130:53-56.
- Keshari MT, Sujay VK, Swapnil KS, Sung WR, Joseph RS, Nancy JR. Intracellular Ca²⁺ Silences L-Type Ca²⁺ Channels in Mesenteric Veins: Mechanism of Venous Smooth Muscle Resistance to Calcium Channel Blockers. *Circ Res* 2010;106:739-747.

- Kiechl S, Willeit J, Rungger G, Egger G, Oberhollenzer F, Bonora E. Alcohol consumption and atherosclerosis: what is the relation? Prospective results from the Bruneck Study. *Stroke* 1998;29:900-907.
- Kim JM, Lee JY, Yoon YM, Oh YK, Youn J, Kim YJ. NF-kappa B activation pathway is essential for the chemokine expression in intestinal epithelial cells stimulated with *Clostridium difficile* toxin A. *Scand J Immunol* 2006;63:453-460.
- Kim SH, Kang KW, Kim KW, Kim ND. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci* 2000;67:121-131.
- Kim Y, Bang H, Kim D. TASK-3, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *J Biol Chem* 2000;275:9340-9347.
- Kim YA, Kim GY, Park KY, Choi YH. Resveratrol inhibits nitric oxide and prostaglandin E₂ production by lipopolysaccharide-activated C6 microglia. *J Med Food* 2007;10:218-224.
- Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Alcohol and mortality. *Ann Intern Med* 1992;117:646-654.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 2008;44:65-81.
- Ko EA, Park WS, Son YK, Kim do H, Kim N, Kim HK, et al. The effect of tyrosine kinase inhibitor genistein on voltage-dependent K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol* 2009;50:51-56.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, et al. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:509-526.
- Kuhlmann CR, Schaefer CA, Kosok C, Abdallah Y, Walther S, Lüdders DW, et al. Quercetin-induced induction of the NO/cGMP pathway depends on

- Ca²⁺-activated K⁺ channel-induced hyperpolarization-mediated Ca²⁺-entry into cultured human endothelial cells. *Planta Med* 2005;71:520–524.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976;24:117–191.
- Kundu JK, Shin YK, Surh YJ. Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin in vivo: NF-kappaB and AP-1 as prime targets. *Biochem Pharmacol* 2006;30:1506-1515.
- Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen S, et al. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 2000;355:675– 687.
- Laleman W, Nevens F. Cirrhotic Portal Hypertension: Current and Future Medical Therapy for Primary and Secondary Prevention of Variceal Bleeding. *Minerva Med* 2006;97:325-345.
- Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P, et al. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005;12: 596–60
- Lekli I, Szabo G, Juhasz B, Das S, Das M, Varga E, et al. Protective mechanisms of resveratrol against ischemia-reperfusion-induced damage in hearts obtained from Zucker obese rats: the role of GLUT-4 and endothelin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H859-H866.
- Lewis DH, Mellander S. Competitive effects of sympathetic control and tissue metabolites on resistance and capacitance vessels and capillary filtration in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 1962;56:162–188.
- Li H, Forstermann U. Resveratrol: a multifunctional compound improving endothelial function. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23: 425-429.

- Li H, Förstermann U. Resveratrol: a multifunctional compound improving endothelial function. Editorial to: "Resveratrol supplementation gender independently improves endothelial reactivity and suppresses superoxide production in healthy rats" by S. Soylemez et al. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:425-459.
- Liang L, Liu X, Wang Q, Cheng S, Zhang S, Zhang M. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of resveratrol and its prodrug 3,5,4'-tri-O-acetylresveratrol in rats. *Phytomedicine* 2013;20:558-563.
- Liang L, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Rimm EB, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of resveratrol and its prodrug
- Lin C, Ke X, Ranade V, Somberg J. The additive effects of the active component of grapefruit juice (naringenin) and antiarrhythmic drugs on HERG inhibition. *Cardiology* 2008;110:145-152.
- Lin J, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Rimm EB, et al. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am J Epidemiol* 2007;165:1305-1313.
- Liu Y, Pleyte K, Knaus HG, Rusch NJ. Increased expression of Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30:1403-1409.
- Lyseng-Williamson KA, Perry CM. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs* 2003;63:71-100.
- Machha A, Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46:36-40.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79: 727-747.

- Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 2005;280:37377-37382.
- Marmot MG, Rose G, Shipley MJ, Thomas BJ. 1981. Alcohol and mortality: a U-shaped curve. *Lancet* 1981;1:580- 583.
- Martens JR, Gelband CH. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K⁺ channels In genetic and nongenetic hypertension. *Circ Res* 1996;79:295-301.
- Martinez AK, Pagán RM, Prieto D, Recio P, García-Sacristán A, Hernández M, et al. Modulation of noradrenergic neurotransmission in isolated rat radial artery. *J Pharmacol Sci* 2009;111:299-311.
- Maser P, Hosoo Y, Goshima S, Horie T, Eckelman B, Yamada K, et al. Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-pore-subunit HKT transporters from plants. *PNAS* 2002; 99: 6428-6433.
- Matsui T, Korematsu S, Byun E, Nishizuka T, Ohshima S, Kanda T. Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K⁺ channel activations. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:2246-2251.
- McGahon MK, Dash DP, Arora A, Wall N, Dawicki J, Simpson DA, et al. Diabetes downregulates large-conductance Ca²⁺-activated potassium beta1 channel subunit in retinal arteriolar smooth muscle. *Circ Res* 2007;100:703-711.
- Mellander S, Lewis DH. Effect of hemorrhagic shock on the reactivity of resistance and capacitance vessels and on capillary filtration transfer in cat skeletal muscle. *Circ Res* 1963;13:105-118.
- Mey JD, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res* 1982;51:439-44.

- Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673–751.
- Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, et al. SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1263-1269.
- Morrow JP, Zakharov SI, Liu G, Yang L, Sok AJ, Marx SO. Defining the BK channel domains required for β -1 subunit modulation. *PNAS* 2006;103:5096-5101.
- Mukerji MS, Leathard HL, Huddart H. The effects of potassium channel blockers on progesterone-induced suppression of rat portal vein contractility. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:983-90.
- Mukherjee S, Dudley JL, Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose-Response* 2010;8:478–500.
- Murray CJ, Lopez AD. Evidence-based health policy – lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 1996;274:740-743.
- Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, Kuo L. Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: Role of nitric oxide and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4232–4239.
- Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent Advances in the Study on Resveratrol. *Biol Pharm Bull* 2012;35:273 – 279.
- Naoghare PK, Kwon HT, Song JM. On-chip assay for determining the inhibitory effects and modes of action of drugs against xanthine oxidase. *J Pharm Biomed Anal* 2010;51:1-6.

- Navarro-Antolín J, Levitsky KL, Calderón E, Ordóñez A, López-Barneo J. Decreased expression of maxi-K⁺ channel beta1-subunit and altered vasoregulation in hypoxia. *Circulation* 2005;112:1309–1315.
- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;268:C799–C822.
- Nishimuta H, Ohtani H, Tsujimoto M, Ogura K, Hiratsuka A, Sawada Y. Inhibitory effects of various beverages on human recombinant sulfotransferase isoforms SULT1A1 and SULT1A3. *Biopharm Drug Dispos* 2007;28:491-500.
- Novakovic A, Bukarica LG, Kanjuh V, Heinle H. Potassium channels-mediated vasorelaxation of rat aorta induced by resveratrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;99:360-364.
- Novakovic A, Gojkovic Bukarica L, Kanjuh V, Heinle H. Potassium channels-mediated vasorelaxation of rat aorta induced by resveratrol. *Basic Clin Pharm Toxicol* 2006;99:360-364.
- Novakovic A, Gojkovic-Bukarica L, Peric M, Nezic D, Djukanovic B, Markovic-Lipkovski J, et al. The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery. *J Pharmacol Sci* 2006;101:85-90.
- Ogata R, Kitamura K, Ito Y, Nakano H. Inhibitory effects of genistein on ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit portal vein smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1997;122:1395-404.
- Olas B, Wachowicz B, Szewczuk J, Saluk-Juszczak J, Kaca W. The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin and thrombin. *Microbios* 2001;105:7-13.
- Olsen HT, Stafford GI, van Staden J, Christensen SB, Jäger AK. Isolation of the MAO-inhibitor naringenin from *Mentha aquatica* L. *J Ethnopharmacol* 2008;117:500-502.

- Olson TM, Terzic A. Human K(ATP) channelopathies: diseases of metabolic homeostasis. *Pflugers Arch* 2010;460:295-306.
- Orsini F, Pelizzoni F, Verotta L, Aburjai T, Rogers CB. Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O-beta-D-glucopyranoside and related compounds. *J Nat Prod* 1997;60:1082-1087.
- Pagán RM, Martínez AC, Martínez MP, Hernández M, García-Sacristán A, Correa C, et al. 2009. Endothelial and potassium channel dependent modulation of noradrenergic vasoconstriction in the pig radial artery. *Eur J Pharmacol* 2009;616:166-174.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:270-278.
- Pang CC. Autonomic Control of the Venous System in Health and Disease: Effects of Drugs. *Pharmacol Ther* 2001;90:179-230.
- Park YK, Kim JS, Kang MH. Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: double-blind, placebo controlled intervention trial. *Biofactors* 2004;22:145-147.
- Parker AJ, Arango M, Abderrahmane S, Lambert E, Tourette C, Catoire H, Néri C. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Med Sci (Paris)* 2005;21:556-557.
- Pataki T, Bak I, Kovacs P, Bagchi D, Das DK, Tosaki A. Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *Am J Clin Nutr* 2002;75: 894-899.
- Peng N, Clark JT, Prasain JI, Kim H, White CR, Wyss JM. Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R771-R775.

- Perrin MJ, Subbiah RN, Vandenberg JL, Hill AP. Human ether-a-go-go related gene (hERG) K⁺ channels: Function and dysfunction. *Prog Biophys Mol Biol* 2008;98:137-148.
- Poprawski G, Wender-Ozegowska E, Zawiejska A, Brazert J. Modern methods of early screening for preeclampsia and pregnancy-induced hypertension-a review. *Ginekol Pol* 2012;83:688-693.
- 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-C1370.
- Radenković M, Grbović L, Radunović N, Momcilov P. Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep* 2007;59:64-73.
- Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamaci S, Akar F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *Int J Cardiol* 2005;105:209-215.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-1526.
- Renaud SC, Gueguen R, Schenker J, d'Houtaud A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* 1998; 9:184-188.
- Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 1999;319:1523-1528.
- Romano MR, Lograno MD. Epigallocatechin-3-gallate relaxes the isolated bovine ophthalmic artery: Involvement of phosphoinositide 3-kinase-Akt-nitric oxide/cGMP signalling pathway. *Eur J Pharmacol* 2009;608:48-53.

- Rusch NJ, De Lucena RG, Wooldridge TA, England SK, Cowley AW. A Ca²⁺-dependent K⁺ current is enhanced in arterial membranes of hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:301–307
- Russ U, Englert H, Schölkens BA, Gögelein H. Simultaneous recording of ATP-sensitive K⁺ current and intracellular Ca²⁺ in anoxic rat ventricular myocytes. Effects of glibenclamide. *Pflugers Arch* 1996;432:75-80.
- Sacco RL, Elkind M, Boden-Albala B, Lin IF, Kargman DE, Hauser WA, et al. The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *JAMA* 1999;281:53– 60.
- Sandow SL, Grayson HT. Limits of isolation and culture: intact vascular endothelium and BKCa. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H1–H7.
- Sano Y, Inamura K, Miyake A Mochizuki S, Kitada C, Yokoi H, et al. A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem* 2003;278:27406-27412.
- Saponara S, Carosati E, Mugnai P, Sgaragli G, Fusi F. The flavonoid scaffold as a template for the design of modulators of the vascular Cav 1.2 channels. *Br J Pharmacol* 2011;164: 1684–1697.
- Saponara S, Testai L, Iozzi D, Martinotti E, Martelli A, Chericoni S, et al. (+/-)-Naringenin as large conductance Ca(2+)-activated K⁺ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2006;149:1013–1021.
- Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH, et al. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 2006;71:794–802.
- Sayet I, Neuilly G, Rakotoarisoa L, Mironneau C, Mironneau J. Relation between alpha 1-adrenoceptor subtypes and oradrenaline-induced

- contraction in rat portal vein smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1993;110:207-212
- Scholl UI, Nelson-Williams C, Yue P, Grekin R, Wyatt RJ, Dillon MJ, et al. Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:2533-2538.
- Scholz EP, Zitron E, Katus HA, Karle CA. Cardiovascular ion channels as a molecular target of flavonoids. *Cardiovasc Ther* 2010;28:46-52
- Schuster D, Nashev LG, Kirchmair J, Laggner C, Wolber G, Langer T, et al. Discovery of nonsteroidal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors by pharmacophore-based screening of virtual compound libraries *J Med Chem*. 2008 Jul 24;51(14):4188-99
- Shapherd JT, Vanhoutte PM. *Veins and Their Control*. Philadelphia: W B Saunders, 1975.
- Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Agrewala JN. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin Exp Immunol* 2007;147:155-163.
- Shen MY, Hsiao G, Liu CL, Fong TH, Lin KH, Chou DS, et al. Inhibitory mechanisms of resveratrol in platelet activation: pivotal roles of p38 MAPK and NO/cyclic GMP. *Br J Haematol* 2007;139:475-485.
- Singh NP, Hegde VL, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis, primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor. *Mol Pharmacol* 2007;72:1508-1521.
- Skulstad SM, Kiserud T, Rasmussen S. The effect of vascular constriction on umbilical venous pulsation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;23:126-130.

- Smyth L, Bobalova J, Ward SM, Keef KD, Mutafova-Yambolieva VN. Cotransmission from sympathetic vasoconstrictor neurons: differences in guinea-pig mesenteric artery and vein. *Auton Neurosci* 2000;86:18-29.
- Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol* 2009;60:111-116.
- St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* 1979;1:1017-1020.
- Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sles H. Mono-Omethylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2008;469:209-219.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, Bedoui JE, Chataigneau M, et al. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharm* 2004;500:299-313
- Stowasser M. Primary aldosteronism and potassium channel mutations. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013 (in press)
- Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schömig E.. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactivenitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;298:49-60.
- Teisseyre A, Duarte N, Ferreira MJ, Michalak K. Influence of the multidrug transporter inhibitors on the activity of Kv1.3 voltage-gated potassium channels. *J Physiol Pharmacol* 2009;60:69-76.
- Teramoto N, Tomoda T, Yunoki T, Ito Y. 2006. Different glibenclamide-sensitivity of ATP-sensitive K⁺ currents using different patch-clamp recording methods. *Eur J Pharmacol* 2006;531:34-40.

- Teramoto N, Zhu HL, Ito Y. Blocking actions of glibenclamide on ATP-sensitive K⁺ channels in pig urethral myocytes. *J Pharm Pharmacol* 2004;56:395-399.
- Terzibasi E, Valenzano DR, Cellerino A. The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. *Exp Gerontol* 2007;42:81-89.
- Trincheri NF, Nicotra G, Follo C, Castino R, Isidoro C. Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis*. 2007;28:922-931.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999;353:1547- 1557.
- Tunstall-Pedoe H, Vanuzzo D, Hobbs M, Mahonen M, Cepaitis Z, Kuulasmaa K, et al. Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 2000;355:688-700.
- van Ginkel PR, Sareen D, Subramanian L, Walker Q, Darjatmoko SR, Lindstrom MJ, et al. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin Cancer Res* 2007;13:5162-5169.
- Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho CT, Zhou Z, Rosen RT. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem*. 2000;48:253-256.
- Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev* 2012;91:42-73.

- Wallner M, Meera P, Toro L. 1999. Calcium-activated potassium channels in muscle and brain. In *Current Topics in Membrane*, Volume 46: Potassium Ion Channels, Molecular Structure, Function, And Diseases, Kurachi Y, Jan LY, Lazdunski M (eds). Academic Press: San Diego; 117-135.
- Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998;93:741-753.
- Wareing M, Bai X, Seghier F, Turner CM, Greenwood SL, Baker PN, et al. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2006;291:R437-R446.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:463-472.
- Wei Y, Babilonia E, Sterling H, Jin Y, Wang WH. Mineralocorticoids decrease the activity of the apical small-conductance K channel in the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F1065-F1071.
- Widlansky ME, Hamburg NM, Anter E, Holbrook M, Kahn DF, Elliott JG, et al. Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Nutr* 2007;26:95-102.
- Wiecha J, Schlager B, Voisard R, Hannekum A, Mattfeldt T, Hombach V. Ca²⁺-activated K⁺ channels in human smooth muscle cells of coronary atherosclerotic plaques and coronary media segments. *Basic Res Cardiol* 1997;92:233-239.
- Wong RH, Howe PR, Buckley JD, Coates AM, Kunz I, Berry NM. Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in

overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:851-856.

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 2006;54:4069-4075.

Wu YL, Ohsaga A, Oshiro T, Iinuma K, Kondo Y, Ebihara S, Sasaki H, Maruyama Y. Suppressive effects of red wine polyphenols on voltage-gated ion channels in dorsal root ganglionic neuronal cells. *Tohoku J Exp Med* 2005;206:141-50.

www.5elementproject.com

www.clubs.de

www.genomebiology.com

www.wikipedia.org

Xu YC, Leung GPH, Wong PYD, Vanhoutte PM, Man RYK. Kaempferol stimulates large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channels in human umbilical vein endothelial cells via a cAMP/PKA-dependent pathway. *Br J Pharmacol* 2008;154:1247-1253.

Yen GC, Duh PD, Lin CW. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res* 2003;37:509-514.

Yetik-Anacak C, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacol* 2006;45:268-276.

Zalba G, Fortuno A, San Jose G, Moreno MU, Beloqui O, Diez J. Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:24-29.

Zhu X, Fang L, Li Y, Du G. Endothelium-dependent and -independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. *Vascul Pharmacol* 2007;46:160-165.

Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Doré S. Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann N Y Acad Sci* 2003;993:276-286.

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

VIII DODATAK

LISTA PUBLIKOVANIH RADOVA IZ DOKTORATA

Protić D, Beleslin-Čokić B, Novaković R, Kanjuh V, Heinle H, Šćepanović R, Gojković-Bukarica L. 1. Effect of wine polyphenol resveratrol on the contractions elicited electrically or by norepinephrine in the rat portal vein. *Phytother Res* 2013; Jan 8. (in press; doi: 10.1002/ptr.4907)

Gojković-Bukarica Lj, Protić D, Kanjuh V, Heinle H, Novaković R, Šćepanović R. Cardiovascular effects of resveratrol. *Vojnosanitetski pregled*, 2013 (in press; doi: 10.2298/VSP120613012G)

Protić D, Todorović Z, Gojković Bukarica Lj. Kalijumovi kanali kao ciljno mesto za delovanje lekova u terapiji kardiovaskularnih oboljenja: 25 godina kasnije. *Sanamed* 2013; 2013; 8(1): 71–78.

UPITNIK

U cilju preciznog naučnog istraživanja, molim Vas, pri uzorkovanju pupčanika, popunite sledeće podatke:

1. Datum porođaja _____
2. Starost porođinje _____
3. Da li je porođilja pušač? DA NE
4. Da li je porođilja bolovala od **hipertenzije** tokom trudnoće? DA NE
5. Da li je porođilja bolovala od **diabetes mellitusa** tokom trudnoće? DA NE
6. Da li je porođaj obavljen u terminu? DA NE
(ukoliko nije u kojoj nedelji trudnoće je obavljen porođaj? _____)
7. Terapija koju je porođilja primala tokom trudnoće?
8. Terapija tokom porođaja?

HVALA NA SARADNJI !

LISTA ILUSTRACIJA

<i>Slika 1. Podela flavonoida</i>	<i>3</i>
<i>Slika 2. Sadržaj pojedinih polifenola u različitim prirodnim izvorima</i>	<i>4</i>
<i>Slika 3. Endotel-zavisna vazodilatacija izazvana polifenolima..</i>	<i>7</i>
<i>Slika 4. Uloga K-kanala u vazorelaksaciji koju izaziva rezveratrol.....</i>	<i>8</i>
<i>Slika 5. Efekti polifenola na endotelne ćelije i mišićne ćelije krvnog suda</i>	<i>9</i>
<i>Slika 6. Potencijalni mehanizmi dejstva polifenola u zaštiti organizma od razvoja kardiovaskularnih oboljenja.</i>	<i>10</i>
<i>Slika 7. Hemijska struktura rezveratrola.</i>	<i>11</i>
<i>Slika 8. Ciljni molekuli u dejstvu rezveratrola: kao farmakološki značajana supstanca, rezveratrol ima veliki broj ciljnih molekula unutar ćelije.....</i>	<i>18</i>
<i>Slika 9. Hemijska struktura naringenina.....</i>	<i>21</i>
<i>Slika 10. Aktivnost K-kanala.....</i>	<i>26</i>
<i>Slika 11. Shematski prikaz transmembranskih segmenata K_{ATP} kanala</i>	<i>28</i>
<i>Slika 12. Struktura K_v i K_{ir} kanala</i>	<i>30</i>
<i>Slika 13. Mehanizam dejstva otvarača kalijumovih kanala</i>	<i>44</i>
<i>Slika 14. Eksperimentalna laboratorija za rad sa izolovanim krvnim sudovima</i>	<i>55</i>
<i>Slika 15. Uzorkovanje pupčanika</i>	<i>57</i>
<i>Slika 16. Protokol eksperimenta u kome je ispitivan uticaj rastvarača na tonus krvnog suda.....</i>	<i>63</i>
<i>Slika 17. Protokol eksperimenata u kojem je ispitivan uticaj blokatora K-kanala na tonus izolovanih venskih krvnih sudova</i>	<i>65</i>
<i>Slika 18. Inhibitorni efekat rezveratrola na kontrakcije izolovane v. portae pacova koje nastaju pod dejstvom ES, NA i ATP.</i>	<i>69</i>
<i>Slika 19. Analiza efekata različitih blokatora K-kanala na rezveratrolom</i>	<i>70</i>
<i>Slika 20. Originalni eksperimentalni zapis delovanja NS 1619 na kontrakcije izolovane</i>	

<i>v. portae pacova</i>	74
Slika 21. Dejstva rezveratrola na izolovanu <i>v. portae pacova</i> nezavisna od K-kanala...	75
Slika 22. Inhibitorni efekat naringenina na kontrakcije izolovane <i>v. portae</i>	77
Slika 23. Uticaj različitih blokatora K-kanala na antivazokonstriktorno dejstvo naringenina na izolovanoj <i>v. portae pacova</i>	79
Slika 24. Vazodilatatorno dejstvo rezveratrola na izolovanu <i>v. umbilicalis</i>	80
Slika 25. Koncentracijske krive rezveratrola i naringenina, kao i uticaj različitih blokatora K-kanala na njihove efete na izolovanoj humanoj <i>v. umbilicalis</i>	82
Slika 26. Originalni eksperimentalni zapis dejstva naringenina na izolovanu humanu <i>v.umbilicalis</i>	83
Slika 27. Ekspresija proteina koji ulaze u sastav K-kanala..	85

LISTA TABELA

Tabela 1. Količina rezveratrola u prehrambenim namirnicama	12
Tabela 2. Efekti rezveratrola primenjenog u različitim koncentracijama	17
Tabela 3. Farmakokinetički parametri nakon per os primene trans-rezveratrola (2 mg/kg) dobijeni nekompartmentskom i kompartmentskom analizom	19
Tabela 4. Distribucija rezveratrola kod pacova nakon primene putem intragastrične sonde u različitim biološkim uzorcima	20
Tabela 5. Dejstvo naringenina na različite enzime.	23
Tabela 6. Klasifikacija kalijumovih kanala	27
Tabela 7. Ekspresija K_{ir} kanala po tkivima.	33
Tabela 8. Ekspresija K_{Ca} kanala po tkivima	34
Tabela 9. Ekspresija K_V kanala	34
Tabela 10. Ekspresija K_{2P} kanala po tkivima	36
Tabela 11. Klasifikacija srčanih aritmija na osnovu K-kanalopatija.	38
Tabela 12. Povezanost različitih mutacija $K_{ir3.4}$ kanala sa vrednostima arterijskog krvnog pritiska.....	40
Tabela 13. Oboljenja koja su povezana sa mutacijom gena koji su odgovorni za kodiranje K_{ATP} kanala	43
Tabela 14. Polifenoli kao modulatori K-kanala.....	47
Tabela 15. Karakteristike porodilja od kojih je uziman uzorak pupčanika.....	58
Tabela 16. Efekat blokatora K-kanala na rezveratrolom izazvanu inhibiciju ES- i NE-kontrakcija izolovane v. portae pacova.	71

IX BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Dragana Protić (devojačko Maksimović) rođena je 3. juna u 1978. u Somboru. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Somboru. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1997/1998. godine, a diplomirala je jula 2004. godine sa prosečnom ocenom 9,11.

Poslediplomske akademske specijalističke studije iz Kliničke farmakologije upisala je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2005/2006. godine. Završni rad odbranila je maja 2007. Doktorske studije iz Molekularne medicine upisala je 2007/2008. na istom fakultetu (mentor, prof. dr Ljiljana Gojković Bukarica). Osnovnu, zdravstvenu specijalizaciju iz Kliničke farmakologije upisala je 2008/2009. godine.

Od septembra 2006. je zaposlena na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu u zvanju asistenta. Saradnik je na nacionalnom naučno-istraživačkom projektu.

Autor je više u celini štampanih radova u međunarodnim i domaćim časopisima, više poglavlja u udžbenicima, kao i brojnih saopštenja sa naučnih skupova.

Član je Srpskog lekarskog društva, Srpskog farmakološkog društva i Evropskog društva za aterosklerozu.

X PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а DRAGANA PROTIC

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ULOGA KALIJUMOVIH KANALA U EFEKTIMA RESVERATROLA I
MARIJUGENINA NA IZOLOVANIM VENSКИМ KRVNIM SUDOVIМА ЧОВЕКА I ПАСОВА

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.04.2013.

Dragana Protic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада

Име и презиме аутора DRAGANA PROTIC

Број уписа _____

Студијски програм MOLEKULARNA MEDICINA

Наслов рада ULOGA KALIJUMOVIH KANALA I EFEKTIMA RESVERATROLA I
MARGENINA NA ISOCHALAM VENSКИМ KRVNIM SUDOVIMA ČOVEKA I PACOVA

Ментор prof. Ljiljana Gajković Bukarić

Потписани Dragana Protic

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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.

Потпис докторанда

У Београду, 10.04.2013.

Dragana Protic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

УЛОГА КАЛИЈУМОВИХ КАНАЛА И ЕФЕКТИМА РЕЗЕРВАТРОЛА И МАРИНГЕНИНА НА РОЛОВАНИМ ^{ВЕНСКИМ} КРВНИМ СУДОВИМА ЧОВЕКА И РАСОВА

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10.04.2013.

Dragana Prohic