

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Марко А. Стојановић

ФАРМАКОЛОШКА ДЕЈСТВА СЕРОТОНИНА И
АДЕНОЗИНА НА ИЗОЛОВАНОЈ ФЕМОРАЛНОЈ
АРТЕРИЈИ ПАЦОВА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ
МОДЕЛИМА ДИЈАБЕТЕСА И ВАСКУЛАРНЕ ОКЛУЗИЈЕ

Докторска дисертација

Београд, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Marko A. Stojanović

PHARMACOLOGICAL ACTION OF SEROTONIN AND
ADENOSINE ON RAT FEMORAL ARTERY IN
EXPERIMENTAL MODELS OF DIABETES AND
VASCULAR OCCLUSION

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Ментор:

Др Мирослав Раденковић, редовни професор
Универзитет у Београду, Медицински факултет

Чланови комисије:

Др Драган Обрадовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Медицински факултет

Др Соња Вучковић, редовни професор
Универзитет у Београду, Медицински факултет

Др Слободан Јанковић, редовни професор
Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука

На почетку, желим да захвалим:

Проф. др Мирославу Раденковићу, мом ментору на подршци, сарадњи и несебичној стручној помоћи током израде ове дисертације

Члановима комисије, Проф. др Драгану Обрадовићу, Проф. др Соњи Вучковић и Проф. др Слободану Јанковићу, на корисним сугестијама у писању докторске дисертације

Проф. др Милице Простран, нашем руководиоцу пројекта, на изузетном ентузијазму и стручној помоћи током израде дисертације

Госпођи Споменки Лучић, на помоћи у савладавању различитих експерименталних протокола

Члановима Института за фармакологију клиничку фармакологију и токсикологију

Породици и пријатељима, који су ме подржавали и увек бодрили приликом свих фаза израде ове дисертације

МОЈИМ РОДИТЕЉИМА

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1 Периферна артеријска болест (ПАБ).....	2
1.1.1. Епидемиолошки подаци и клинички значај.....	3
1.1.2. Фактори ризика за развој ПАБ.....	4
1.1.3. Утицај дијабетеса на развој ПАБ.....	5
1.1.3.1. Промене на нивоу зида крвног суда у току дијабетеса.....	5
1.1.3.1.1 Инфламација.....	5
1.1.3.1.2. Ендотелна дисфункција.....	5
1.1.3.1.3. Глатке мишићне ћелије.....	6
1.1.3.2. Утицај дијабетеса на хемостазу.....	7
1.1.3.3. Утицај дијабетеса на тромбоците.....	7
1.1.4. Оклузија периферних артерија као завршна фаза ПАБ.....	8
1.1.5. Тренутне терапијске могућности у ПАБ.....	9
1.2. Серотонин.....	9
1.2.1. Метаболички пут серотонина.....	9
1.2.2. Серотонински рецептори.....	10
1.2.3. Ефекти серотонина на нивоу васкуларног система.....	11
1.2.3.1. Ефекти серотонина на ендотел периферних крвних судова.....	12
1.2.3.2. Утицај јона калцијума на ефекте серотонина у периферним крвним судовима.....	13
1.2.4. Серотонин и ПАБ.....	16
1.2.5. Блокада серотонинског система у терапији ПАБ.....	16
1.3. Аденозин.....	17
1.3.1. Метаболички пут аденозина.....	17
1.3.2. Аденозински рецептори.....	19
1.3.3. Ефекат аденозина на нивоу васкуларног система.....	20
1.3.3.1. Утицај јона калијума на ефекте аденозина у периферним крвним судовима.....	21
1.3.4. Аденозин и ПАБ.....	22
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	24
3. МЕТОДЕ И МАТЕРИЈАЛ.....	29
3.1. Експерименталне животиње.....	30
3.2. Експерименталне групе.....	30
3.3. Индукција дијабетеса.....	30
3.4. Оклузија феморалних артерија.....	31
3.5. Индукција ендотелне дисфункције.....	32

3.6. Узорковање животињске крви	32
3.7. Детекција маркера ендотелне дисфункције и маркера показатеља атеросклерозе..	33
3.8. Изолација крвног суда	33
3.9. Мерење промене васкуларног тонуса.....	34
3.10. Обрада података и статистика.....	35
3.11. Супстанце.....	36
4. РЕЗУЛТАТИ.....	37
4.1. Дејство серотонина на изолованој феморалној артерији пацова.....	38
4.1.1. Улога серотонина у периферној артеријској болести, посматрано кроз одговор феморалне артерије пацова: улога ендотела	38
4.1.1.1. Утицај дијабетеса изазваног алоксаном на телесну масу и ниво глукозе у периферној крви.....	38
4.1.1.2. Дејство серотонина на изолованој феморалној артерији пацова	39
4.1.1.3. Последице одстрањивања ендотела на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином.....	39
4.1.1.4. Испитивање постојања ендотелне дисфункције и њеног потенцијалног ефекта на контракцију изазвану серотонином	41
4.1.1.5. Дејство индометацина на контрактилне ефекте серотонина.....	46
4.1.1.6. Ефекти инкубације лосартана на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином	49
4.1.2. Улога серотонина у периферној артеријској болести, посматрано кроз одговор феморалне артерије пацова: улога калцијумових јона	51
4.1.2.1. Утицај дијабетеса изазваног алоксаном на телесну масу и ниво глукозе у периферној крви.....	51
4.1.2.2. Последице одстрањивања ендотела на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином.....	51
4.1.2.3. Утицај измењеног Кребс-Рингеровог раствора на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином.....	53
4.1.2.4. Ефекат нифедипина на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином.....	56
4.1.2.5. Ефекат убаина на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином.....	59
4.1.2.6. Ефекат истовремене примене нифедипина и убаина на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином.....	62
4.2. Резултати са аденозином	65
4.2.1. Релаксанти одговор феморалне артерије према аденозину у експерименталним моделима дијабетеса и/или васкуларне оклузије	65
4.2.1.1. Утицај дијабетеса изазваног алоксаном на телесну масу и ниво глукозе у периферној крви.....	65
4.2.1.2. Дејство аденозина на изолованој феморалној артерији пацова	65
4.2.1.3. Улога ендотела у релаксатним ефектима аденозина на нивоу феморалне артерије пацова.....	66

4.2.1.4. Улога трансмембранског протока јона калијума у релаксатним ефектима аденозина на нивоу феморалне артерије пацова)	67
5. ДИСКУСИЈА.....	72
6. ЗАКЉУЧАК.....	87
7. ЛИТЕРАТУРА	91

Фармаколошка дејства серотонина и аденозина на изолованој феморалној артерији пацова у експерименталним моделима дијабетеса и васкуларне оклузије

Резиме

Увод: Периферна артеријска болест (ПАБ) је хронично обољење, које настаје као последица развоја ендотелне дисфункције и последичне прогресије овог патолошког процеса према атеросклерози. Серотонин има значајну улогу у настанку и прогресији ПАБ. Са друге стране, аденозин се у циркулацију ослобађа током хипоксије како би се побољшао проток крви, што га чини и потенцијалним кандидатом за терапију ПАБ. Узимајућу у обзир ове чињенице, циљ ове дисертације је био да се испита утицај серотонина и аденозина на изолованој феморалној артерији (ФА) пацова соја Wistar, и то код здравих животиња, као и код дијабетичних животиња и/или животиња којима је додатно извршена оклузија ФА.

Материјал и методе: Експерименти су извођени на мужјацима пацова соја Wistar (250 – 320 гр). Животиње су чуване у поликарбонским кавезима (максимално 4 животиње). Услови живота су одржавани константним, тако да је температура износила 24 ± 1 °C, влажност ваздуха је била $55 \pm 10\%$, а дневни циклус је одржаван тако да је 12 сати био дан и 12 сати ноћ. Животиње су имале слободан приступ води и стандардној пелетираној храни. Насумично, одабраним животињама изазиван је дијабетес помоћу алоксана (175 мг/кг). Неким здравим и дијабетичним животињама ФА је оклудирана током периода од 45 минута. Пре оклузије животиње су увођене у анестезију помоћу уретана (125 мг/ 100гр). У одвојеној групи животиња ендотелна дисфункција је изазивана помоћу никотина. Промене у васкуларном тону крвних судова су мерене након препаратације прстенова крвних судова и урањања ових прстенова у органско купатило. Код неких насумично одабраних експерименталних животиња крв је узоркована из репне вене како би се квантификовали маркери показатељи ендотелне дисфункције.

Резултати: Серотонин је изазвао контракцију ФА која је зависила од концентрације серотонина, а која је у групи здравих животиња, такође зависила и од присуства интактног слоја ендотелних ћелија. Ендотелни део контракције коју

је изазвао серотонин је био блокиран након инкубације лосартана. Додатно је показано да ендотелни део серотонином-изазване контракције зависи и од екстрацелуларног калцијума. Део контракције зависан од глатких мишића је зависио од унатарћелијског калцијума. Код дијабетичних животиња, и нифедипин и убаин, појединачно али не и у комбинацији, блокирали су интрацелуларни проток јона калцијума. Аденозин изазива релаксацију ФА, која је зависила од концентрације ове супстанце, а код здравих, као и животиња са оклузијом ФА, ова релаксација је зависила и од ендотела. Релаксација изазвана аденозином је у великој мери зависила од протока калијумових јона.

Закључак: Серотонин и аденозин изазивају ефекте зависне од концентрације на нивоу ФА. Такође, у групи здравих животиња ови ефекти су зависни и од присуства ендотелног слоја ћелија. Додатно је после оклузије ФА, релаксација аденозином такође била зависна од присуства ендотела. Ефекти серотонина су посредовани протоком јона калцијума и то преодминантно интрацелуларно, а код здравих животиња и протокм екстрацелуларног калцијума. Ефекти аденозина су посредовани протоком јона калијума. Краткотрајни дијабетес мења интрацелуларни проток јона калцијума. Допринос протока калијумових јона на дејства аденозина се повећава током дијабетеса. Модел дијабетеса коришћен у овој тези се може користити и као модел ендотелне дисфункције настале услед дејства високих концентрација глукозе.

Кључне речи: Серотонин, аденозин, феморална артерија, дијабетес, оклузија

Научна област: Медицинска фармакологија

Ужа научна област: Фармакологија васкуларног система

Pharmacological action of serotonin and adenosine on rat femoral artery in experimental models of diabetes and vascular occlusion

Abstract

Background: Peripheral artery disease (PAD) of lower limbs is a chronic disease that is associated with the occurrence of endothelial dysfunction (ED) and further progression of atherosclerosis in the affected arteries. Recent findings have demonstrated that serotonin is an important participant in the development and progression of PAD. On the other hand, adenosine, a purine nucleoside, is released during hypoxia and improves local blood flow, which is why it could be used as a potential therapeutic option in treatment of PAD. Considering these facts, the aim of this thesis was to investigate the effects of serotonin and adenosine on isolated Wistar rat femoral artery in both healthy and diabetic animals, with and without artery occlusion.

Material and Methods: Experiments were performed on male Wistar rats (250 - 320 g). The rats were kept in polycarbonate cages (up to 4 per cage). During experimental process living conditions were maintained constant, with a half-half light/day cycle, temperature 24 ± 1 °C, and humidity of $55\pm 10\%$. Experimental animals had free access to bottles filled with tap water and pallets of standard rodent diet. In randomly selected rats, diabetes was induced with alloxan (175 mg/kg). In some healthy and diabetic animals, occlusion of femoral artery was performed for 45 minutes. Prior the occlusion, animals were anesthetized with urethane (125 mg/100g). In a separate group of animals ED was induced with nicotine. Vascular tone change was measured after artery rings were prepared and immersed in an organ bath. In some healthy, diabetic and nicotine-treated animals, blood was taken from rat tail vein and used for quantification of ED markers.

Results: Serotonin induced concentration-dependent contraction of femoral artery, which was also endothelium-dependent, but only in a group of healthy animals. Endothelium-related part of serotonin contraction was reduced after incubation of losartan, and also it was dependant on extracellular calcium, while smooth muscle-reliant part was dependent on intracellular calcium. In diabetic animals nifedipine and ouabain, independently but not in combination, influenced serotonin-induced vascular

effects by blocking intracellular calcium pathways. Adenosine induced concentration-dependent, and in healthy animals, as well as in animals with femoral artery occlusion, endothelium-dependent relaxation. Adenosine relaxation of femoral artery is dependent on potassium ion flow.

Conclusion: To conclude, both serotonin and adenosine induce concentration-dependent, and in healthy animals endothelial-dependent effects. Additionally, adenosine also produces endothelium-dependent effects after femoral artery occlusion. Serotonin effects are dependent upon calcium, both extracellular (in healthy animals) and intracellular, while adenosine action was dependent on potassium ions. Short term diabetes significantly influences intracellular calcium pathway. Also, in diabetes the potassium contribution in adenosine effects is increased. Short term diabetes, as used in this thesis, can be considered as a valid experimental model of high glucose-induced ED.

Keywords: Serotonin, adenosine, femoral artery, diabetes, occlusion

Research area: Medical pharmacology

Special topics: Pharmacology of vascular system

1.УВОД

1.1 ПЕРИФЕРНА АРТЕРИЈСКА БОЛЕСТ

1.1.1. Епидемиолошки податци и клинички значај

Периферна артеријска болест (ПАБ) је хронично обољење, које настаје као последица развоја ендотелне дисфункције и последичне прогресије овог патолошког процеса према атеросклерози. Овим обољењем могу бити захваћени доњи део аорте, илијачне артерије, феморалне артерије, као и други крвни судови доњих екстремитета (Patel et al., 2015; Rooke et al., 2013). Даљом прогресијом атеросклерозе долази до погоршања симптома ПАБ. Погоршање је праћено различитим степеном исхемије доњих екстремитета и смањењем раздаљине коју особа може да препешачи без појаве болова у ногама. Као крајњи степен прогресије болести може настати потпуна оклузија феморалних крвних судова. Најзначајнији симптом ове болести, клаудикације, огледа се у појави грчева, бола или свраба у пределу листова, бутина или глутеуса, а у највећем броју случајева клаудикације се повлаче након одмора (American Diabetes Association, 2003). На основу симптоматологије, највећи број пацијената се може поделити у три групе: пацијенти са класичним клаудикацијама (10% до 30%), пацијенти са атипичним болом у ногама (20% до 40%) и асимптоматски пацијенти (око 50%).

Клинички значај ПАБ превазилази саму симптоматологију болести и поремећаје кретања које изазива код пацијената (Davies et al., 2017). Наиме, ПАБ се такође сматра значајним предиктором потенцијалних кардиоваскуларних (КВ) догађаја. Ово обољење представља јасан маркер системске атеросклерозе, неvezано за присуство других симптома или манифестација болести. Сматра се да је код пацијената са овим обољењем ризик од смрти због КВ узрока повећан за чак три до шест пута (Ankle Brachial Index Collaboration, 2008). У току петогодишњег периода један од пет пацијената са ПАБ ће искусити неки од КВ проблема без смртног исхода, док ће 15% до 20% пацијената у овом периоду умрети због КВ последица (Olin et al., 2016). Због ових чињеница интернационални водичи препоручују исте стратегије за смањивања КВ ризика код пацијената са ПАБ, као и за пацијенте са коронарном болешћу (Anderson et al., 2013; European Stroke Organisation, 2011; Davies et al., 2017). Међутим, упркос

овим напорима, број пацијената који болује од ПАБ је и даље у порасту. Процењује се да од 2010. године више од 200 милиона људи широм света болује од ПАБ, као и да 30% пацијената у високо ризичној популацији има и ово обољење (Olin et al., 2016).

1.1.2. Фактори ризика за развој ПАБ

Фактори ризика за развој ПАБ су у суштини исти као и фактори ризика који доводе до настанка атеросклерозе церебралних и срчаних крвних судова (Olin et al., 2016). Чињеница да исти фактора ризика доводе до појаве ПАБ и атеросклерозе крвних судова, донекле објашњава претходно поменути улогу ПАБ као маркера системске атеросклерозе. У најважније факторе ризика за настанак ПАБ убрајају се породична историја ПАБ, дијабетес мелитус (ДМ), пушење, хронично обољење бубрега, хипертензија, као и хиперлипидемија (TASC Steering Committee, 2005; Hirsch et al., 2001; Selvin et al., 2004; Armstrong et al., 2014; Criqui и Aboyans, 2015). Пушење и ДМ су посебно значајни, пошто су они код особа са ПАБ повезани са лошијом прогнозом, независно од осталих фактора ризика (Joosten et al., 2012). Иако је и пушење битан фактор ризика за развој ПАБ, ипак се дијабетес мелитус сматра примарним фактором ризика за развој овог обољења. Предвиђа се да ће дијабетес мелитус у будућности превазићи, по значају, остале факторе ризика и да ће постати главни узрочник развоја овог обољења (Thiruvoipati et al., 2015). Ово предвиђање је изведено на основу процене да ће се број пацијената оболелих од ДМ повећати са 170 милиона на 366 милиона особа до 2030. године (Armstrong et al., 2014Б; Wild et al.; 2004), али и на основу чињенице да се у западним земљама број пушача значајно смањује (Thiruvoipati et al., 2015). Тренутно је процењено да између 20 % и 30 % пацијената са дијагнозом ПАБ истовремено има и ДМ (Marso и Hiatt, 2006). Код пацијената са ДМ старијих од 40 година преваленца ПАБ износи 20 %, док се овај број повећава на 29 % код пацијената старијих од 50 година (Thiruvoipati et al., 2015). Овај проценат је вероватно и већи уколико се узме у обзир да је код пацијената са ДМ теже дијагностиковати блаже форме ПАБ услед постојања периферне неуропатије. Такође, озбиљност и трајање ДМ значајно утичу на преваленцу ПАБ. Тако се нпр.

са повећањем гликозилизирајућег хемоглобина за 1%, преваленца ПАБ повећава за 28% (Thiruvoipati et al., 2015). Код пацијената са ПАБ код којих је дијагностикована озбиљна исхемија доњих екстремитета преваленца ДМ износи чак 76% (Dick et al., 2007). Значај дијабетеса у развоју ових унапредовалих форми ПАБ се огледа у чињеници да дијабетес утиче на прогресију атеросклерозе, а тромбоза која је повезана са развијеном формом атеросклерозе чини 85% тзв. нетрауматских оклузија периферних артерија. Такође, клаудикације које се повезују са озбиљнијом формом ПАБ чешће настају код пацијената са ДМ. Могућности за развој клаудикација су 3.5 пута веће код мушкараца са дијабетесом и чак 8.6 пута код жена (Kannel и McGee, 1985). Додатно, пацијенти који имају ДМ имају и до 15 пута већу могућност да се болест развије у правцу где је једино решење ампутација доњих екстремитета (Jude et al., 2001). Можда и највећи проблем код пацијената са дијабетесом и ПАБ је већа вероватноћа за развој изненадне исхемије услед тромбозе артерија, као и појаву исхемијских улцерација доњих екстремитета (American Diabetes Association, 2003).

1.1.3. Утицај дијабетеса на развој ПАБ

Патофизиолошки механизми који доводе до настанка ПАБ током дијабетеса су комплексни и зависе од већег броја фактора. У суштини, ови механизми су слични механизмима који доводе до настанка ПАБ код пацијената без дијабетеса, али су сложенији због метаболичких поремећаја у организму који настају услед дијабетеса (Yang et al., 2017).

Дијабетес доприноси развоју ПАБ делујући директно на зид крвног суда, као и на факторе који регулишу хемостазу и ћелије крви, поготовоу тромбоците (Thiruvoipati et al., 2015). Дејством на зид крвног суда дијабетес може да проузрокује инфламацију (Ridker et al., 1998), ендотелну дисфункцију (ЕД) (Kawashima et al., 2004), али исто тако може довести и до поремећаја структуре и функције глатких мишића крвног суда (Fukumoto et al., 1998).

1.1.3.1. Промене на нивоу зида крвног суда у току дијабетеса

1.1.3.1.1 Инфламација

Атеросклероза се сматра хроничном инфламаторном болешћу (Bessueille и Magne, 2015), стога се утицај дијабетеса на процес инфламације може посматрати и узрочником развоја и прогресије ПАБ (Thiruvoipati et al., 2015). Сам дијабетес је праћен скоком неколико фактора инфламације, између осталих то су Ц-реактивни протеин (CRP), фактор некрозе тумора алфа (TNF- α) и интерлеукин-6 (IL-6). Поремећај у регулацији нивоа глукозе доводи до пораста вредности CRP (Ridker et al., 1998). Пораст CRP последично утиче на концентрације прокоагулантних ткивних фактора, адхезионих молекула, леукоцита и хематотаксичних супстанци (Ridker et al., 1998; Thiruvoipati et al., 2015). Исто тако, CRP може да инхибира ендотелну синтазу азот оксида (American Diabetes Association, 2003), али и да повећава продукцију инхибитора активације плазминогена (Vinik et al., 2001). Све ово повећава осетљивост зида крвног суда и омогућава развој атеросклерозе (Thiruvoipati et al., 2015). Друга два фактора инфламације, TNF- α и IL-6, чије вредности расту у дијабетесу, утичу на ендотелне ћелије и повећавају продукцију нуклеарног фактора β , који затим стимулише производњу ендотелних адхезивних молекула. Помоћу ових молекула се леукоцити и тромбоцити везују за површину ендотелних ћелија, што олакшава даљи развој атеросклерозе (Thiruvoipati et al., 2015).

1.1.3.1.2. Ендотелна дисфункција

Дијабетес може проузроковати развој ЕД, првог, а уједно и јединог реверзибилног процеса у развоју атеросклерозе. Међутим, дијабетес може и погоршати већ постојећу ЕД, убрзањем развоја атеросклерозе. Сама ендотелна дисфункција је поремећај у којем се нарушава равнотежа у продукцији релаксантних и контрактилних фактора ендотелних и/или глатких мишићних ћелија крвног суда, у корист контрактилних фактора (Radenković et al., 2013 б). Најважнији продукти ендотелног слоја ћелија, чијим се поремећајем у равнотежи нарушава функционална али и структурна хомеостаза крвних судова, су азот

оксид и ендотелин-1 (Beckman et al., 2002; De Vriese et al., 2000). Дијабетес је на неколико начина укључен у процес развоја и прогресије ЕД. Између осталог, смањена продукција инсулина значајно утиче и на продукцију азот оксида. Наиме, инсулин је од кључног значаја за индукцију фосфоинозитол-3 киназног сигналног пута, који је укључен у даљу продукцију овог аутооксида (Kawashima et al., 2004; Troidl et al., 2012). На овај начин се смањује релаксанти капацитет ендотелног слоја крвних судова, али исто тако изостају и други позитивни ефекти азот оксида, попут инхибиције активације тромбоцита, као и ограничавање миграције и пролиферације суседних глатких мишићних ћелија (Thiruvoipati et al., 2015). Поред овога, последице дијабетеса попут хипергликемије, инсулинске резистенције и повећане продукције слободних масних киселина могу утицати на смањење продукције азот оксида директним утицајем на ендотелну азот оксид синтазу (Thiruvoipati et al., 2015). Повећан ниво глукозе у току дијабетеса такође може узроковати промену на нивоу синтезе протеина, тако што ће се глукоза везивати за слободне аминокиселине групе. Овако измењени протеински производи могу довести до повећане продукције проинфламаторних фактора попут нуклеарног фактора κB и активатора протеина 1 (Bierhaus et al., 2009). Ови фактори ће поред смањене продукције азот оксида, утицати и на повећање хемотаксе, адхезије, миграције и трансформације леукоцита, што на крају доводи до формирања пенестих ћелија. Ово је уједно и први корак у процесу стварања атероматозног плака (American Diabetes Association, 2003).

1.1.3.1.3. Глатке мишићне ћелије

На нивоу глатких мишићних ћелија дијабетес такође проузрокује штетна дејства, између осталог путем стимулације синтезе ендотелина-1 у ендотелним ћелијама. Овај ендотелни контрактилни фактор проузрокује повећање тонуса крвних судова (Nugent et al., 1996), ретенцију воде и соли, али и развој хипертрофије глатких мишићних ћелија крвних судова (Thiruvoipati et al., 2015). Поред овога, дијабетес се повезује са настанком нестабилности атероматозног плака, његовом руптуром и последичном тромбозом (Thiruvoipati et al., 2015). Овај проблем у дијабетесу настаје због смањења броја глатких мишићних ћелија,

које потенцијалном миграцијом из медијалног у интимални слој крвног суда могу да стабилизују атероматозну плочицу. Већи степен апоптозе глатких мишићних ћелија у дијабетесу настаје због повећања концентрације гликолизованог оксидисаног липопротеина ниске густине, који у даљем процесу поспешује апоптозу глатких мишићних ћелија (Beckman et al., 2002; Suzuki et al., 2001). Додатно, нестабилност плака услед дијабетеса може настати и због повећања матриксних металопротеиназа, што даље доводи до деструкције колагена и руптуре плака (Uemura et al., 2001).

1.1.3.2. Утицај дијабетеса на хемостазу

Дијабетес мелитус утиче на процес хемостазе тако што стимулише ендотелне и глатке мишићне ћелије да повећано продукују ткивни фактор (Kario et al., 1995; Carr, 2001). Овај фактор се повећано ствара услед оштећења крвног суда. Поред ткивног фактора, дијабетес ће стимулирати и стварање фактора VIIa, а истовремено долази и до смањења расположивости антикоагулантних фактора попут антитромбина и протеина Ц (Kario et al., 1995, Carr, 2001). Заједно, ткивни фактор и фактор VIIa утичу на активацију фактора X и наставак коагулационе каскаде.

1.1.3.3. Утицај дијабетеса на тромбоците

Проблем са тромбоцитима и дијабетесом настаје због способности тромбоцита да без помоћи инсулина преузимају глукозу. Како у току дијабетеса ниво глукозе у крви расте, повећана је и концентрација глукозе у тромбоцитима (Thiruvoipati et al., 2015). Глукоза у тромбоцитима доводи до активације протеин киназе Ц и смањује продукцију азот оксида. Исто тако, долази до пораста оксидативног стреса у тромбоцитима, што све заједно поспешује агрегацију тромбоцита и компликује ПАБ у ДМ. Додатно, током дијабетеса долази до повећане експресије гликопротеинских рецептора Iб и IIb/IIIa, чиме се олакшава адхезија и агрегација тромбоцита (Vinik et al., 2001).

1.1.4. Оклузија периферних артерија као завршна фаза ПАБ

У свом току, ПАБ може прогредирати до критичне исхемије доњих екстремитета. Ово стање представља уједно и најозбиљнији степен ПАБ, а карактерише се појавом болова у ногама током мировања, као и оштећењем ткива доњих екстремитета. Ово даље доводи до појаве улцерација које не зарастају, а у неким случајевима и до настанка гангрене (Conde и Erwin, 2014). Критична исхемија доњих екстремитета је генерално посматрано хронично обољење, које постаје акутна исхемија доњих екстремитета у случају појаве емболизма или тромбозе (Lambert и Belch, 2013). Овако настала акутна исхемија доводи до појаве нових симптома или погоршања већ постојећих. Појава критичне исхемије доњих екстремитета није тако честа и само 1% - 3% пацијената са ПАБ улазе у ову фазу болести (Lambert и Belch, 2013). Нажалост, прогноза се овиме погоршава, јер се повећава ризик од смртности КВ порекла, као и ризик од губитка екстремитета и инвалидитета (Conde и Erwin, 2014).

1.1.5. Тренутне терапијске могућности у ПАБ

На основу тренутно доступних, најновијих европских и америчких водича, постоји неколико опција у терапији ПАБ (European Stroke Organisation, 2011; Gerhard-Herman et al., 2016). Поред основних препорука, које се примарно односе на промене животних навика, као што су нпр. промене режима исхране или прекид коришћења цигарета, лекарима су на располагању конзервативне мере лечења, које чине физикална и фармаколошка терапија, а у најтежим случајевима пацијенте са ПАБ можемо и хируршки збринути (European Stroke Organisation, 2011; Gerhard-Herman et al., 2016). Циљ терапије пацијената са хроничном ПАБ доњих екстремитета је повећање раздаљине, коју ови пацијенти могу да препешаче, као и смањење оштећења околног ткива. На основу европских препорука јасно је да је неколико лекова нашло своје место у терапији ПАБ. У терапији се могу користити цилостазол (инхибитор фосфодиестеразе-3), нафтидрофурил (инхибитор серотонинских рецептора типа 2), пентоксифилин (инхибитор фосфодиестеразе), карнитин (ефекти на метаболизам мишића у

исхемији), као и буфломедил (инхибитор агрегације тромбоцита), који је у последње време повучен са тржишта неких европских земаља (European Stroke Organisation, 2011). Такође, европске препоруке говоре и о потенцијално позитивном ефекту статина и антиромбоцитне терапије у повећању раздаљине коју пацијенти могу да препешаче. Са друге стране, коначни закључак о позитивним ефектима антихипертензивне терапије није још увек усаглашен. Закључци из релевантних европских водича говоре у прилог томе да тренутне фармакотерапијске опције нису најидеалније и да иако има позитивних терапијских ефеката, они су углавном благи до умерени. Такође, сматра се да објективна документација која треба да потврди ове позитивне ефекте не постоји, или је пак ограничена. За разлику од европских, амерички водичи препоручују само два лека за терапију ПАБ, цилостазол и пентоксифилин (Gerhard-Herman et al., 2016). У оба водича цилостазол се помиње као најефикаснији лек за терапију ПАБ. Ипак, треба имати на уму да чак 20% пацијената мора да прекине примену овог лека у прва три месеца терапије због појаве нежељених ефеката (Bonasa et al., 2016).

Хируршка интервенција се код пацијената са ПАБ углавном примењује у случају постојања критичне исхемије доњих екстремитета (Conde и Erwin, 2014). Наиме, у овој фази болести је од кључне важности процена да ли је пацијент у исто време и кандидат за ревакуларизацију. Уколико није, неопходно је да се установи да ли бол може да се толерише, а такође неопходно је проценити да ли је губитак ткива ограничен и да ли представља проблем за пацијента. Лечење треба наставити претходно описаним конзервативним приступом, а у супротном, када је губитак ткива велики и бол неподношљива, предлаже се ампутација екстремитета (Conde и Erwin, 2014).

1.2. СЕРОТОНИН

1.2.1 Метаболички пут серотонина

Серотонин је моноамински неуротрансмитер, примарно откривен у гастроинтестиналном тракту, тромбоцитима и централном нервном систему.

Овај неуротрансмитер настаје у метаболичком процесу који почиње од есенцијалне аминокиселине л-триптофан. Л-триптофан се кроз исхрану уноси у организам. Намирнице богате л-триптофаном су беланце, чоколада, коштуњаво воће, разне врсте меса, као и млечни производи (Watts et al., 2012). Сам процес синтезе серотонина из л-триптофана се одвија у два корака. У првом кораку, под дејством триптофан хидроксилазе (ТРН), из ове аминокиселина настаје Л-5-хидрокситриптофан. У другом кораку, Л-5-хидрокситриптофан, под дејством неспецифичних декарбоксилаза ароматичних аминокиселина прелази у серотонин. За сада су позната два типа ТРН, тип ТРН1 који је локализован у периферном ткиву и тип ТРН2 локализован унутар централног нервног система (Walther и Bader, 2003; Walther et al., 2003).

Разградња серотонина се одиграва унутар ћелија, у највећој мери у јетри. За овај процес је битан ензим моноамино оксидаза А, која серотонин каталитички преводи у ново једињење (алдехид). У даљем процесу, под дејством алдехидне дехидрогеназе настаје 5-хидрокси-индол сирћетна киселина, која је уједно и крајњи продукт метаболизма серотонина. Ово, новоформирано једињење се путем бубрега, тј. урином избацује из људског организма.

Само мали део л-триптофана (мање од 10 %) се метаболише на горе описани начин, када као један од продуката настаје и серотонин. Највећу део л-триптофана (преко 90 %) се метаболише другим ензимским системом, када из ове аминокиселине под дејством триптофан диоксигеназе настаје кинуренин (Watts et al., 2012).

1.2.2 Серотонински рецептори

Серотонин своје ефекте остварује преко истоимених, серотонинских рецептора (5-ХТ). Према петом издању водича за рецепторе и јонске канале Британског фармаколошког друштва, серотонински рецептори су подељени у седам подтипова (5-ХТ₁₋₇) (Alexander et al., 2011). Сви подтипови серотонинских рецептора припадају групи метаботропних рецептора, док је једино подтип три сврстан у групу јонотропних рецептора. Серотонински 5-ХТ₁ рецептор има

неколико подтипова: 5-ХТ_{1а}, 5-ХТ_{1б}, 5-ХТ_{1д}, 5-ХТ_{1е} и 5-ХТ_{1ф}. Сви подтипови 5-ХТ₁ рецептора су у свом трансдукционом механизму везани за инхибицију аденилатне циклазе. Три подтипа 5-ХТ₂ рецептора (5-ХТ_{2а}, 5-ХТ_{2б}, 5-ХТ_{2ц}), након активације, имају исти механизам преноса интрацелуларног сигнала. Активацијом ових рецептора активира се ензим фосфолипаза Ц, након чега настају инозитол трифосфат (IP3) и диацилглицерол. Једини јонотропни серотонински рецептори су 5-ХТ₃ рецептори, а њиховом активацијом долази до деполаризације ћелијске мембране услед брзог проласка катјона у унутрашњост ћелије. У метаботропне рецепторе убрајају се и 5-ХТ₄ рецептори, чијом активацијом долази до стимулације активације аденилатне циклазе и последичног пораста концентрације секундарног гласника цикличног аденозин монофосфата. За подтипове серотонинских рецептора 5-ХТ₅, 5-ХТ₆ и 5-ХТ₇ још увек не знамо тачну функцију или локализацију.

1.2.3 Ефекти серотонина на нивоу васкуларног система

Серотонин је познат као модулатор тонуса глатких мишића васкуларног система, на основу чега је овај неуротрансмитер и добио своје име. Наиме, само име серотонин, састоји се из два дела - серо и тонин. Први део имена потиче од речи серум (серо-), из кога је првобитно изолован, док је други део имена пореклом од речи тонус (-тонин), тј. тонус глатких мишића на који може да делује.

Код људи и животиња серотонин на нивоу крвних судова преодминантно доводи до вазоконстрикције. Испитивања на великом броју крвних судова, како људских тако и животињских, су углавном показала да серотонин испољава контрактилно дејство на нивоу глатких мишића артерија и вена (Watts et al., 2012). Тако на пример, код пацова серотонин доводи до контракције различитих крвних судова. Између осталог, утврђено је да серотонин контрахује каротидне артерије (Radenković et al., 2010), церебралне артерије великог и средњег дијаметра (Masu et al., 2008), тестикуларне артерије (Masu et al., 2008), југуларне вене (Linder et al., 2010), репне вене (Froldi et al., 2003), као и многе друге крвне судове. Такође,

серотонин доводи до контракције крвних судова и код других специјеса експерименталних животиња. Тако су контрактилни ефекти серотонина регистровани на нивоу каротидних артерија (Fujiwara et al., 1995), коронарне артерије (Ishida et al., 2001) и аорте зеца (Galzin et al., 2000), затим грудне аорте (McKune и Watts, 2001) и каротидних артерија миша (Lamping и Faraci, 2001), псеће вене сафене (Galzin et al., 2000), говеђе средње церебралне артерије (Roon et al., 1999), али и на нивоу крвних судова других животињских врста (Watts et al., 2012). Код људи је у различитим експерименталним поступцима показано да између осталих артерија серотонин контрахује и умбиликалну артерију (Radenković et al., 2009), темпоралну артерију (Verheggen et al., 2009), базиларну артерију (Silva et al., 2007) и коронарне артерије (Maassen VanDenBrink et al., 2000). Описана дејства, тачније вазоконстрикторна дејства серотонина, доминантно се остварују преко 5HT_{2A} рецептора (Watts et al., 2012). Међутим, у овај процес могу бити укључени и други рецепторски подтипови, попут 5HT_{1B} и 5HT_{1D} рецептора (Watts et al., 2012).

У мањем броју испитивања је показано да серотонин релаксира крвне судове (Watts et al., 2012). Тако нпр., активацијом 5HT_{2B} и 5HT₇ рецептора серотонин доводи до релаксације југуларне вене, као и плућних и коронарних артерија пацова (Watts et al., 2012). Код људи серотонин проузрокује релаксацију умбиликалне артерије (Haugen et al., 1997), као и релаксацију артериола у скелетним мишићима (Watts et al., 2012).

1.2.3.1 Ефекти серотонина на ендотел периферних крвних судова

Васкуларни ендотел представља један компактан слој ћелија, који има значајну улогу у одржавању хомеостазе васкуларног система. Наиме, васкуларни ендотел је укључен у контролу тонуса крвних судова, раста и диференцијације глатких мишићних ћелија, коагулације крви, адхезије циркулишућих леукоцита и тромбоцита, као и неоангиогенезе (Radenković et al., 2013). Такође, након његове активације неком ендегеном или егзогеном вазоактивном супстанцом, ендотелне ћелије могу продуковати вазодилаторне (азот оксид, простациклин и ендотелни

хиперполаришући фактор) и вазоконстрикторне факторе (ендотелин-1, супероксидни анјон, простагландине и тромбоксан A_2), и на тај начин утицати на укупни ефекат, које ове супстанце имају на нивоу крвног суда.

Као што је већ поменуто, серотонин преобладајно проузрокује контракцију крвних судова. Ова контракција може зависити од ендотелног слоја ћелија. Наиме, неоштећен и функционалан ендотелни слој крвних судова служи као заштита од прекомерне серотонинске контракције (Datté et al., 2005; Ibarra et al., 2006). Тачније, уклањањем ендотелног слоја или услед развоја ендотелне дисфункције, контрактилни ефекти серотонина се појачавају. Овакав протективни ефекат ендотела према контрактилним ефектима серотонина представља један од важних физиолошких механизма одржавања хомеостазе васкуларног система. Супротно претходном разматрању, ендотел на одређеним крвним судовима није укључен у васкуларне ефекте серотонина (Radenković et al., 2010); а парадоксално, на неким крвним судовима може додатно допринети појачању вазоконстрикције индуковане серотонином (Lin et al., 1991; Zhang et al., 1998).

1.2.3.2 Утицај јона калцијума на ефекте серотонина у периферним крвним судовима

Јони калцијума су неопходни за процес контракције свих мишићних ћелија. Својим присуством у унутрашњости ћелије, ови јони изазивају интеракцију између актина и миозина, што доводи до контракције ћелија. Активацијом рецептора на површини глатких мишићних ћелија различите супстанце, којима припада и серотонин, могу довести до повећања интрацелуларне концентрације калцијума, што последично узрокује контракцију ових ћелија. Калцијум у ћелију може ући из екстрацелуларне средине, али исто тако може доћи до ослобађања калцијума из унутарћелијских депоа (Hill-Eubanks et al., 2011).

Инфлукс јона калцијума из екстрацелуларне средине је у највећој мери посредован волтажно-зависним калцијумским каналима (Hill-Eubanks et al., 2011). Велики број органела у глатким мишићним ћелијама има способност да преузме и

ослободи јоне калцијума и на тај начин допринесе процесу контракције. Међутим, најбитнију улогу у овом процесу има саркоплазматски ретикулум. У одговору на различите стимулусе саркоплазматски ретикулум ослобађа јоне калцијума. Овај процес ослобађања калцијума из саркоплазматског ретикулума у цитоплазму најчешће настаје након активације припадајућих ријанодинских и инозитолтрифосфатних рецептора (Hill-Eubanks et al., 2011).

Волтажно-зависни калцијумови канали се сматрају најважнијим јонским каналима, који су укључени у процес повећања интрацелуларног калцијума. Структура ових канала обухвата неколико субјединица. Главну компоненту представља $\alpha 1$ субјединица. Преко ове субјединице регулисане су неке од главних особина волтажно-зависних калцијумских канала, као што су: волтажна сензитивност, пропустљивост за јоне калцијума, калцијум-зависна инактивација, као и сензитивност према фармаколошким блокаторима. Поред $\alpha 1$ субјединице, у грађи ових канала учествују β , $\alpha 2\delta$, и γ субјединица (Hill-Eubanks et al., 2011). Грађа $\alpha 1$ субјединице је комплексна. Она обухвата четири домена (I, II, III, IV), где се свака субјединица састоји од 6 трансмембранских сегмената (S1-6). Четврти сегмент сваког од поменута четири домена служи као сензор промене мембранског потенцијала (Catterall., 2000; Hill-Eubanks et al., 2011). Променом мембранског потенцијала долази до промене у конформацији четвртог сегмента свих субјединица, приликом чега се сегменти померају ка споља и ротирају се, а ове конформационе промене доводе до отварања поре за пролазак калцијумових јона (Catterall.,2000; Hill-Eubanks et al.,2011). На нивоу глатких мишићних ћелија васкуларног система преобладајуће се налази $\alpha 1C$ субјединица, која улази у састав такозваног L-типа волтажно-зависних калцијумских канала (Hill-Eubanks et al., 2011).

Унутарћелијски депои калцијума се празне након активације ријанодинских и инозитолтрифосфатних рецептора, који су фенотипски слични (оба јонска канала имају афинитет према калцијуму и ослобађају га из саркоплазматског ретикулума), али структурно, регулаторно и у погледу начина на који ослобађају калцијум, веома различити (Hill-Eubanks et al., 2011). Такође, оба типа ових рецептора имају по три подтипа. Ријанодински рецептори су велики

тетрамерни комплекси. Свака субјединица је изграђена из четири домена, који се простиру ка ћелијској мембрани (Zalk et al., 2007; Hill-Eubanks et al., 2011). Велики део тих домена представља аминотерминални регион усмерен према цитосолу, који садржи и место за везивање калцијума и различитих протеинских структура (Zalk et al., 2007; Hill-Eubanks et al., 2011). Краћи, карбокситерминални домен је усмерен према лумену саркоплазматског ретикулума (Zalk et al., 2007; Hill-Eubanks et al., 2011). Инозитолтрифосфатни рецептори су изграђени из четири субјединице (Foskett et al., 2007; Hill-Eubanks et al., 2011). Свака субјединица има 6 домена усмерених према ћелијској мембрани. Спољашњи (аминотерминални), уједно и већи део домена је усмерен ка ћелијској мембрани и на њему се налази место за везивање IP₃, док је унутрашњи (карбокситерминални) домен усмерен према унутрашњостет саркоплазматског ретикулума. Пети и шести домен сваке субјединице улази у састав поре овог канала (Foskett et al., 2007; Hill-Eubanks et al., 2011).

За контракције крвних судова, које настају под дејством серотонина, извор калцијума може потицати из спољашње, као и из унутрашње средине. Тако на пример за контракцију каротидне артерије пацова у присуству серотонина, неопходан је калцијум из спољашњих извора (екстрацелуларни калцијум) (Radenković et al., 2010). Приликом инкубације нифедипина у органском купатилу, пре примене серотонина, долази до скоро потпуне блокаде серотонинске контракције, што значи да у овом случају доминира улазак калцијума из спољашње средине и то преко Л-типа калцијумских канала (Radenković et al., 2010). Са друге стране, серотонин може мобилисати калцијум и из унутарћелијских депоа. Тако се контракција глатких мишићних ћелија церебралних артерија пацова одвија посредством калцијума из унутарћелијских депоа (Wang et al., 1991). Ови резултати указују да за контракцију артерија проузроковану серотонином, подједнаку улогу могу имати и унутарћелијски и екстраћелијски депои калцијума, те стога у креирању даљих терапијских стратегија треба имати у виду и који механизми могу бити укључени у овај процес.

1.2.4 Серотонин и ПАБ

Улога серотонина у ПАБ се до скоро једино посматрала кроз ефекте које овај биогени амин остварује на нивоу тромбоцита. Шта више, показано је да блокирањем серотонинског система на нивоу тромбоцита долази до побољшања симптома код пацијената са ПАБ (Miyazaki et al., 2007). Оваква открића су и довела до укључивања блокатора серотонинских рецептора у водиче за лечење ПАБ (Stroke Organisation, 2011). Међутим, поред ефеката на тромбоците, у последњих неколико година испитује се и додатна улога серотонина у ПАБ. Тако је доказано да је ниво серотонина у периферној крви код пацијената са ПАБ значајно виши у односу на здраве испитанике (Senol и Es, 2015). Ово откриће додатно упућује на потенцијалну улогу серотонина у развоју ПАБ, поготову уколико се узме у обзир и доказано постојање локалног серотонинског (5-хидрокситриптаминског) система у периферним крвним судовима (Ni et al., 2008). Такође, показано је и да серотонин игра значајну улогу у развоју васкуларне дисфункције, која је настала као последица дијабетеса (Nelson et al., 2012). Улога серотонина у овом процесу је јасна. Наиме, серотонин ће у току дијабетеса потенцирати ефекте повишених вредности глукозе, чиме потенцира и убрзава оштећење ендотела (Yamada et al., 2012). Међутим, и поред ових сазнања, остаје нејасно да ли и какве ефекте на нивоу периферних крвних судова имају повишене вредности серотонина код ових пацијената, тј. да ли ће ове вредности серотонина утицати на дијаметар крвног суда, као и да ли то може на неки начин да се искористи за креирање нових терапијских стратегија у лечењу ПАБ.

1.2.5 Блокада серотонинског система у терапији ПАБ

Теоријски, модулацијом серотонинског система на два нивоа могло би се доћи до позитивних ефеката код пацијената са ПАБ. Први ниво на који можемо да утичемо је ниво тромбоцита где је серотонин укључен у процес њихове агрегације (Miyazaki et al., 2007), док други ниво означава дејство серотонина на периферне крвне судове.

Антитромбоцитни лекови се са успехом користе у терапији пацијената са ПАБ већ дужи низ година. У европским земљама доступан је лек, нафтидрофурил, који је блокатор 5-ХТ₂ рецептора. Овај лек редукује агрегацију и накупљање тромбоцита и еритроцита у периферној циркулацији (European Stroke Organisation, 2011). Потврда позитивног ефекта овог лека код пацијената са ПАБ реферисана је у мета-анализи у коју је било укључено укупно 888 пацијената. Овом мета-анализом је показано да примена наведеног лека повећава препешачену раздаљину без појаве бола у ногама за 26% у односу на плацебо (De Backer et al., 2009; European Stroke Organisation, 2011). Такође, овај лек побољшава и квалитет живота пацијената са ПАБ (Spengel et al., 2009).

За разлику од првог нивоа могуће модулације дејства серотонина, други ниво тј. ниво зида крвног суда, за сада још увек нема терапијску примену. Наиме, са открићем повећања нивоа серотонина у периферној циркулацији пацијената са ПАБ, поставља се питање како та повећана концентрација серотонина делују на периферне артерије, као и на који начин можемо то искористити у креирању нових терапијских протокола код ових пацијената? Одговори на ова питања би били изузетно важни, поготову уколико узмемо у обзир веома мали број лекова који су регистровани за ову индикацију. Такође, са бољим познавањем маеханизма дејства повећава се и број потенцијалних опција, тј. везних места и процеса на које терапијски можемо деловати.

1.3. АДЕНОЗИН

1.3.1. Метаболички пут аденозина

Аденозин је ендогени пурински нуклеозид, који има значајну улогу у функционисању људског организма. Присутан је у ниским концентрацијама (1μМ) у екстрацелуларној средини (Samsel и Dzierzbicka, 2011). Међутим, концентрација овог молекула се повећава у току метаболичког стреса, као што су нпр. ситуације у којима долази до хипоксије и исхемије (Kumar et al., 2009). Значај овог сигналног молекула се огледа у чињеници да преко својих, аденозинских рецептора учествује у регулацији великог броја процеса

неопходних за нормално функционисање људског организма. Поред овога, велики број аденозинских аналога и коњугата се већ користи у терапији различитих патолошких стања, или се налази у некој од фаза клиничких испитивања (Samsel и Dzierzbicka, 2011). Нека од патолошких стања у којима се испитује примена аденозинских аналога и коњугата су: атријална фибрилација, пароксизмална суправентрикуларна тахикардија, кардиометаболичке болести, улцерација стопала услед дијабетеса, коронарна артеријска болест, глауком, хепатоцелуларни карцином, хронични хепатитис Ц, али и у многе друге болести и патолошка стања (Samsel и Dzierzbicka, 2011).

Тренутно су позната два метаболичка пута која су укључена у продукцију аденозина. У првом метаболичком путу аденозин настаје из аденозин трифосфата, док се у другом путу аденозин формира из С-аденозинхомоцистеина. Локацијски посматрано аденозин може настати интрацелуларно и екстрацелуларно. У унутарћелијском простору аденозин настаје из аденозин трифосфата и С-аденозинхомоцистеина, док се у екстрацелуларном простору аденозин синтетише само из аденозинтрифосфата.

У унутарћелијском простору аденозин трифосфат се процесом дефосфорилације претвара, прво у аденозин дифосфат па у 5'-аденозин монофосфат (Meijer et al., 2008). У даљем току овог метаболичког пута 5'-аденозин монофосфат се у реверзибилном процесу претвара у аденозин каталитичком активношћу 5'-нуклеотидазе (Meijer et al., 2008). Реверзибилност овог процеса је омогућена захваљујући ензиму аденозин кинази, који има способност да рефосфорилише формиран аденозин и поново га преведе у 5'-аденозин монофосфат. На овај начин се цитоплазматска концентрација аденозина одржава на ниском нивоу (Kroll et al., 1992; Deussen et al., 1999). Поред овог метаболичког пута, интрацелуларно се аденозин може формирати и из С-аденозинхомоцистеина под дејством С-аденозинхомоцистеин хидроксилазе, која такође у реверзибилном процесу својом каталитичком активношћу формира аденозин. Последњи део интрацелуларног метаболичког пута аденозина чини аденозин деаминаза, која аденозин претвара у инозин (Meijer et al., 2008).

Екстрацелуларни метаблички пут аденозина се не разликује у многоме од интрацелуларног метаболичког пута. Наиме, у екстрацелуларном простору аденозин трифосфат прелази у аденозин дифосфат, а затим у 5'-аденозин монофосфат. У даљем процесу формирања аденозина учествује, као и у унутарћелијском путу, 5'-нуклеотидаза, која је локализована на површини великог броја ћелија и назива се екто-5'-нуклеотидаза (Meijer et al., 2008).

У току нормалне оксигенације ткива, 90% аденозина се формира из С-аденозинхомоцистеина (Kroll et al., 1992; Deussen et al., 1999). Због изражене активности аденозин киназе, која аденозин претвара у 5'-аденозинмонофосфат, концентрација аденозина у цитоплазми остаје веома ниска и формира се концентрацијски градијент, који условљава улазак аденозина у ћелију (Meijer et al., 2008). Овај инфлукс аденозина је олакшан постојањем нуклеозидног транспортер система. Постојање овог транспортер система доводи до брзог снижавања концентрације аденозина у екстрацелуларном простору, чиме се објашњава кратак екстрацелуларни полуживот овог нуклеозида, а тиме и отежана примена аденозина у терапији (Meijer et al., 2008).

1.3.2. Аденозински рецептори

Аденозин своје ефекте остварује преко истоимених аденозинских рецептора. Према петом издању водича за рецепторе и јонске канале Британског фармаколошког друштва, аденозински рецептори су подељени у четири подгрупе (A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3) (Alexander et al., 2011). Сви аденозински рецептори се сврставају у групу метаботропних рецептора (Alexander et al., 2011). Аденозински A_1 и A_3 рецептори су повезани са инхибицијом аденилатне циклазе. Са друге стране, A_{2a} и A_{2b} рецептори утичу на стимулацију аденилатне циклазе и следствени пораст цикличног аденозин монофосфата.

Аденозински рецептори су распрострањени по читавом организму. Међутим, степен њихове експресије може да варира. Тако је нпр. експресија аденозински A_1 рецептора изражена у можданом кортексу, хипокампусу, кичменој мождини, очима, надбубрежној жлезди, али и у преткоморама срца

(Samsel и Dzierzbicka, 2011). Изражена експресија A_{2a} рецептора је идентификована у стријатуму, нуклеусу акумбенсу, слезини, тимусу, леукоцитима и тромбоцитима, док је изражена експресија A_{2b} рецептора детектована у цекуму, колону и мокраћној бешици (Samsel и Dzierzbicka, 2011). Висок ниво експресије аденозинских A_3 рецептора је регистрован у тестисима и мастоцитним ћелијама (Samsel и Dzierzbicka, 2011).

1.3.3. Ефекат аденозина на нивоу васкуларног система

Познато је да аденозин доводи до релаксације крвних судова захваљујући дејству на одговарајуће аденозинске рецепторе, што је до сада показано на нивоу крвних судова различитих специјеса. Међутим, и поред ових особина примена аденозина у циљу модулације дијаметра крвних судова није ушла у ширу терапијску примену, понајвише због кратког биолошког полуживота ове супстанце у циркулацији. Наиме, као што је већ напоменуто, постојање нуклеозидног транспортер система утиче на повећано преузимање аденозина од стране крвних судова и на тај начин концентрација аденозина у циркулацији брзо пада (Meijer et al., 2008).

До сада је показано да код пацова аденозин, између осталог релаксира аорту (Grbović и Radenković, 2003), реналну артерију (Grbović et al., 2000), каротидну артерију (Radenković et al., 2013) и доњу мезентричну артерију (Radenković et al., 2005). Код зеца и заморца је утврђено да аденозин изазива релаксацију коронарних крвних судова (Mutafova-Yambolieva и Keef, 1997; Reffelman et al., 2004). Такође, аденозин може дилатирати аорту и каротидне крвне судове миша (Prentice et al., 2002), док је код људи кроз различите експерименталне процедуре показано да аденозин доводи до релаксације коронарних крвних судова (Sabouni et al., 1989), као и аорте (Iwamoto et al., 1994).

Поред релаксантних ефеката, који су предоминантни ефекти аденозина, могуће је да у артеријама неких специјеса аденозин изазива и контракцију. Тако је на пример на изолованој плућној артерији заморца аденозин проузроковао вазоконстрикцију (Szentmiklósi et al., 1995).

У процес релаксације крвних судова аденозином, преобладајуће су укључени аденозински A_{2A} рецептори. Такође, значајну улогу у релаксантном дејству могу имати и A_1 рецептори, а у нешто мањем обиму и аденозински A_{2B} рецептори. Ови рецептори се могу наћи на глатким мишићима, као и на ендотелним ћелијама крвних судова (Grbović et al., 2000). Међутим, у процесу дилатације крвних судова ендотел углавном нема значајнију улогу, односно, дилатација различитих крвних судова је преобладајуће ендотел-независна. Детаљнији механизам дејства аденозина на крвне судове је приказан у наставку текста.

1.3.3.1. Утицај јона калијума на ефекте аденозина у периферним крвним судовима

Мембрански потенцијал глатких мишићних ћелија је регулисан, између осталог и протоком јона кроз калијумске канале. Проток калијумових јона има значајну улогу у регулацији артеријског тонууса услед промена у дијаметру одређених артерија. Тачан механизам регулације се огледа у отварању калијумових канала на ћелијској мембрани глатких мишићних ћелија, што доводи до ефлукса калијумових јона и последичне хиперполаризације ћелијске мембране (Nelson и Quayle, 1995). Ова хиперполаризација даље изазива затварање калцијумских канала, што смањује улазак калцијумових јона у глатку мишићну ћелију и на тај начин долази до вазодилатације (Nelson и Quayle, 1995).

Познато је да вазодилатација у различитим животињским и људским крвним судовима, коју изазива аденозин, зависи од протока калијумових јона, односно од директног или индиректног утицаја аденозина на отварање различитих типова калијумових јонских канала. Допринос калијумових јона у ефектима аденозина је претходно регистрован у већем броју крвних судова различитих животињских врста. Тако је нпр. утицај калијумових јона потврђен у коронарним крвним судовима миша (Flood и Headrick, 2001), артериолама ретине (Heaps и Bowles, 1985) и коронарним артеријама свиње (Heaps et al., 2005), као и у репној (Kedzior et al., 2009), реналној (Grbović et al., 2001) и каротидној артерији пацова (Radenković et al., 2013A). Такође, улога калијумових јона у дејствима

аденозина је потврђена и у хуманим малим коронарним артеријама и артериолама (Kemp и Cocks, 1999; Sato et al., 2005).

1.3.4. Аденозин и ПАБ

Због кратког времена у коме се аденозин налази у циркулацији, као и брзог преузимања у околна ткива, потенцијална примена овог нуклеозида у терапији ПАБ није детаљно испитивана. Такође, за сада не постоје релевантни подаци који би говорили о ефектима аденозина на нивоу феморалне артерије. Са бољим разумевањем функције аденозина на нивоу крвних судова доњих екстремитета, поготово у патолошким стањима повезаним са развојем и прогресијом ПАБ, као што је нпр. дијабетес, повећала би се и могућност да се аденозин или неки од његових коњугата и/или аналога аденозинских рецептора, користи у терапији овог обољења. Супстанце које би настале у процесу модификације хемијске структуре аденозина (нпр. додавањем одређене хемијске групе са последичном променом фармакокинетских својстава новог једињења), морају показивати дуже време задржавања у циркулацији. Тренутно, постоји већи број аналога, агониста аденозинских рецептора, чија се примена још увек налази у различитим фазама клиничких студија (Samsel и Dzierzbicka, 2011). Између осталог, испитује се примена аналога у терапији коронарне артеријске болести, хроничне опструктивне болести плућа, атријалне фибрилације, алергијског ринитиса, као и бронхијалне астме. И поред великог броја студија о терапијској примени аденозинских аналога, до сада нису регистроване студије у којима се испитује њихова примена у терапији ПАБ, међутим постоје студије у којима се испитује дејство поменутих аналога у терапији компликација ПАБ. Тако се нпр. евалуира примена аналога аденозинских рецептора (A_{2a}), у облику гела, за лечење дијабетичног улкуса стопала, који настаје као последица развијене ПАБ (Samsel и Dzierzbicka, 2011).

Узимајући у обзир претходна разматрања о још увек недовољно разјашњеној улози серотонина и аденозина у ПАБ доњих екстремитета, као и мали број информација из релевантне литературе о механизмима дејства наведене

две вазоактивне супстанце на нивоу феморалних крвних судова у физиолошким и патолошким условима, у следећем одељку су формулисани циљеви истраживања.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1) Испитати дејство растућих концентрација серотонина и аденозина на прстеновима изоловане феморалне артерије пацова.

I. Утврдити да ли функционални интегритет ендотела утиче на васкуларне ефекте серотонина и аденозина .

II. Испитати у којој мери релаксантни и/или контрактилни аутокоиди ендотелног порекла учествују у васкуларним дејствима испитиваних агониста.

III. Утврдити допринос калцијумових јонских канала и натријум / калијум АТПазе у дејству серотонина.

IV. Испитати да ли и у којој мери калијумови јонски канали ендотелних и/или глатких мишићних ћелија доприносе васкуларним ефектима аденозина.

2) Испитати дејство серотонина и аденозина на препаратима феморалних артерија дијабетичних пацова.

I. Утврдити да ли је и у којој мери очуван морфолошки и функционални интегритет ендотелног слоја ћелија феморалне артерије

дијабетичних пацова, тј. да ли дијабетес утиче на васкуларне ефекте серотонина и аденозина.

II. Испитати у којој мери експериментални дијабетес модулише потенцијално учешће релаксантних и/или контрактилних аутокоида ендотелног порекла у васкуларним дејствима испитиваних агониста.

III. Утврдити да ли дијабетес утиче на допринос калцијумских јонских канала и натријум / калијум АТПазе у дејству серотонина на изолованој феморалној артерији пацова.

IV. Испитати да ли дијабетес модулише учешће калијумских јонских канала у дејству аденозина на изолованој феморалној артерији пацова.

3) Испитати дејство серотонина и аденозина на препаратима феморалне артерије пацова после оклузије проксималних делова овог крвног суда у трајању од 45 минута.

I. Утврдити да ли је очуван морфолошки и функционални интегритет ендотела феморалне артерије пацова након оклузије испитиване артерије у трајању од 45 минута, тј. да ли оклузија утиче на васкуларне ефекте серотонина и аденозина.

- II. Испитати у којој мери оклузија испитиваног крвног суда модулише учешће релаксантних и/или контрактилних аутокоида ендотелног порекла у васкуларним дејствима серотонина и аденозина.
- III. Утврдити да ли оклузија утиче и мења учешће калијумских јонских канала и натријум / калијум АТПазе у дејству серотонина на изолованој феморалној артерији пацова.
- IV. Испитати да ли оклузија утиче или мења учешће калијумских јонских канала у дејству аденозина на изолованој феморалној артерији пацова.
- 4) Испитати дејство серотонина и аденозина на препаратима феморалне артерије пацова, код којих је иницијално индукован експериментални дијабетес, а затим извршена оклузија испитиване артерије у трајању од 45 минута.
- I. Утврдити да ли је очуван морфолошки и функционални интегритет ендотела феморалне артерије дијабетичних пацова након оклузије феморалне артерије у трајању од 45 минута, тј. да ли дијабетес и оклузија заједно утичу на васкуларне ефекте серотонина, тј. аденозина.
- II. Испитати у којој мери дијабетес и оклузија испитиваног крвног суда модулишу учешће релаксантних и/или контрактилних аутокоида ендотелног порекла у васкуларним дејствима испитиваних агониста.

III. Утврдити да ли дијабетес и оклузија утичу и мењају допринос калцијумских јонских канала и натријум / калијум АТПазе у дејству серотонина на изолованој феморалној артерији пацова.

IV. Испитати да ли дијабетес и оклузија утичу или мењају учешће калијумских јонских канала у дејству аденозина на изолованој феморалној артерији пацова.

3. МЕТОДЕ И МАТЕРИЈАЛ

3.1. Експерименталне животиње

Експериментални протокол описан у даљем тексту одобрен је од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Медицинског факултета Универзитета у Београду (Мишљење бр. 2424/2 од 27.06.2012. год.) уз финалну сагласност Министарства пољопривреде, трговине, шумарства и водопривреде Републике Србије (Решење бр. 323-07-04764/2012-05/1 од 08.10.2012. год.)

Експериментална истраживања су извођена на албино пацовима мушког пола соја *Wistar*, телесне масе 250 – 320 грама. Животиње су чуване у поликарбонским кавезима у групама од по 3 до 4 животиње. Услови у којима су чуване животиње су били прилагођени њиховим потребама, са температуром од $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ и влажношћу ваздуха од $55\pm 10\%$. Животиње су имале слободан приступ стандардној пелетној храни и боцама са пијаћом водом.

3.2. Експерименталне групе

Животиње које су коришћене током ових експеримената су насумично подељене у две групе. У првој групи су се налазиле животиње којима је експериментално индукован дијабетес, док су се у другој групи налазиле здраве животиње. Животиње из ове две групе су у даљем поступку насумично распоређене у три подгрупе. У првој подгрупи су биле „лажно“ оперисане животиње, другу подгрупу су чиниле оперисане животиње којима су подвезане обе феморалне артерије, док су трећу подгрупу чиниле контролне животиње. Додатно, у циљу испитивања ЕД, креирана је паралелна група животиња, којој је ендотелна дисфункција изазвана никотином.

3.3. Индукција дијабетеса

Дијабетес је насумично одабраним животињама индукован једном интраперитонеалном ињекцијом алоксана у дози од 175 мг/кг телесне масе, а

након претходног двадесетчетворочасовног гладовања (Radenković et al., 2013a). Алоксан је растворан у физиолошком раствору непосредно пре процеса апликације. У циљу утврђивања ефеката алоксана, експерименталним животињама је мерена телесна маса и гликемија. Мерења су вршена пре гладовања, пре индукције дијабетеса, као и на крају сваке недеље од тренутка индукције дијабетеса, укупно током периода од 4 недеље. Гликемија је одређивана у периферној венској крви, узорковане из репне вене пацова. Вредност гликемије од 11 mM (198mg/dl) на крају четврте недеље је узета као гранична вредност за постављање дијагнозе дијабетеса код експерименталних животиња.

3.4. Оклузија феморалних артерија

Насумично одабраним здравим животињама, као и животињама са дијабетесом, почетак тј. проксимални део феморалне артерије је био подвезан хируршким концем током периода од 45 минута. Пре процеса оклузије, животиње су увођене у дубоку анестезије помоћу уртана (25% раствор), у једнократној дози од 125 мг на 100 грама телесне масе. Уретан је животињама апликован интраперитонеално. Након апликације уретана животњама је остављен период од 90 минута да се стабилизују. После периода стабилизације, а пре самог захвата, дубина анестезије је одређивана уз помоћу рефлексних реакција на бол. Наиме, након што се животиња успавала, пинцетом је штипан врх репа и простор између прстију на задњим шапама. Губитак одговора на оба болна стимулуса се сматрао доказом развоја дубоке анестезије. Једнострано губитак одговора на штипање репа, уз изостанак одговора са задњих шапа, био је показатељ постојања површне анестезије, па се у оваквим случајевима животињи остављало још времена за улазак у дубоку анестезију и/или се примењивала додатна, мала доза уретана. Животиње су биле способне да спонтано дишу током анестезије, те стога није било потребе за механичком вентилацијом. Телесна температура је током оклузије експерименталним животињама у дубокој анестезији одржавана уз помоћ подлоге са електричним загревањем.

3.5. Индукција ендотелне дисфункције

У циљу испитивања развоја ЕД и њеног утицаја на васкуларни одговор феморалне артерије према серотонину или аденозину, креирана је паралелна група животиња која је свакодневно, у јутарњим часовима током периода од 4 недеље, третирана никотином. Никотин је растваран у физиолошком раствору непосредно пре апликације. Након припреме, никотин је апликован интраперитонеално у дози од 2 мг/кг/дан (Luo et al., 2006).

3.6. Узорковање животињск крви

Потврда развоја, као и степена прогресије ЕД су одређивани квантификавањем различитих маркера васкуларног оштећења из животињске плазме и серума. Здравим, дијабетичним и никотином-третираним животињама истог узраста је у циљу добијања серума и плазме узимана крв, непосредно пре коришћења животиња за даља васкуларна испитивања. Крв је узимана из животињске репне вене. Узимани узорци су количински били мањи од 10% укупног волумена крви. Пре самог узимања крви, животиње су смештене у тзв. „врुће кутије“ у којима су проводиле максимално 15 минута како би репне вене постале дилатирание. Након тога животиње су смештане у такозване „*restrainer*“ кутије у којима им је било ограничено било какво кретање, док је реп био постављен са спољашње стране. Крв је узимана помоћу 21Г X 1 „лептир система“ модификованог тако да је дугачка пластична цевчица исечена до дужине од максимално 1 цм. Игла овог система је пласирана у бочну репну вену пацова, док је крв са другог краја система сакупљана у одговарајућу епендорф тубу (1.5 мл). Након прикупљања крви, у циљу издвајања серума узорци су остављани у епендорф тубама током два сата на собној температури како би се крв згрушала. После згрушавања узорци су центрифугирани током периода од 15 мин брзином од 1000г, што је резултовало одвајањем серума. У циљу екстракције плазме понављана је слична процедура, са том разликом што је у овом случају додаван

ЕДТА. Овакви узорци су центрифугирани након само 15 минута од узимања узорка, брзином од 1000г, током 15 минута, на температури од 4°C. Након добијања серума и плазме, ови узорци су чувани на -80°C до тренутка испитивања.

3.7. Детекција маркера ендотелне дисфункције и маркера показатеља атеросклерозе

У плазми и серуму експерименталних животиња одређивана је концентрација различитих маркера ЕД, као што су асиметрични диметиларгинин (ADMA), васкуларни ћелијски адхезиони молекул-1(VCAM-1) или von Willebrand фактор (vWF), као и концентрација хемокина (Ц-Ц мотив) лиганд 5 (CCL5), показатеља прогресије атеросклерозе. Концентрација ових маркера одређивана је ELISA тестом помоћу комерцијално доступних комплета произвођача Cusabio Biotech Co., Ltd. (Wuhan, China). Одређивање претходно наведених концентрација ELISA тестом вршено је помоћу читача DV 990 BV-6 (GDV, Gio Da Vita, Rome, Italy).

3.8. Изолација крвног суда

Пре изолације крвног суда од интереса, животиње које нису уведене у анестезију су биле жртвоване цервикалном дислокацијом, након које су им пресеци каротидни крвни судови у циљу терминалног искривљења. Животиње које су претходно уведене у дубоку анестезију су биле жртвоване искривљењем, након одсецања и изолације крвног суда од интереса.

Након жртвовања, лева и десна феморална артерија пацова су пажљиво изоловане и ослобађане од околног масног и везивног ткива (Radenković et al., 2013). Овако узети крвни судови су исецани у прстенове дужине 4 мм и стављани у Кребс-Рингеров бикарбонатни раствор. На насумично одабраним препаратима ендотелни слој крвног суда је уклањан благим окретањем жице од нерђајућег челика у лумену крвног суда. Прстенасти сегменти су постављани на стаклене носаче са два троугла од нерђајућег челика, који су иницијално провучени кроз

лумен крвног суда. Препарати постављени на носаче су урањани у органска купатила, која су била испуњена са 20 мл Кребс-Рингеровог раствора (састав у mM: NaCl 118.3; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25.0; Ca-EDTA 0.026; глукоза 11.1) оксигенисаног помоћу 95% CO₂ и 5% O₂. Температура раствора је одржавана на 37°C, а pH на 7.4. Доњи троугао је био повезан са стакленим носачем, док је горњи троугао био повезан са трансдјусером (Hugo Sachs Elektronik F30 Type 372, Freiburg, Germany), који је континуирано регистровао изометријске промене тонуса крвног суда. Промене тонуса су графички бележене путем писача (Rikadenki Kogyo CO., LTD, Tokyo, Japan) или компјутерског система.

3.9. Мерење промене васкуларног тонуса

Након иницијалне припреме крвних судова и после периода адаптације у органском купатилу у трајању од 45 минута, васкуларни прстен је постепено затезан до нивоа базалног тонуса од 1.5 гр. Ниво базалног тонуса од 1.5 гр је експериментално одређен у прелиминарној серији експеримената. Након затезања крвног суда до нивоа базалног тонуса, испитиван је функционални интегритет ендотелног и мишићног слоја ћелија. Ово испитивање је рађено тако што је крвни суд прво законтрахован субмаксималном концентрацијом (EC₅₀-EC₈₀) фенилефрина (1μM), а након тога је у циљу изазивања релаксације у купатило за изоловане органе додаван ацетилхолин (1μM). Овај процес је понављан три пута. Између сваког од ових понављања постојала је пауза од 20 мин. Релаксација крвног суда узрокована ацетилхолином већа од 80% у односу на преконтракцију изазвану фенилефрином је указивала на постојање интактног ендотела. Након провере функционалног интегритета ендотела, кумулативна концентрацијски-зависна кривна за контрактилно дејство серотонина је добијена на нивоу базалног тонуса крвног суда поступком додавања растућих концентрација серотонина (0.001–0.3 μM) у органско купатило. Већа концентрација испитиваног агонисте је додавана у купатило тек након успостављања платоа, односно максималног ефекта претходно дате ниже концентрације. Концентрацијски-зависне криве за релаксантно дејство аденозина су добијане постепеним додавањем растућих

концентрација аденозина на претходно контраховани крвни суд фенилефрином. Аденозин је кумулативним поступком, као и серотонин, апликован у органско купатило након успостављања платоа претходно дате ниже концентрације агонисте. Како је у прелиминарној серији експеримената показано да дизајн мултиплих криви није могућ за испитивање контрактилног дејства серотонина и релаксантног дејства аденозина, примењен је поступак где је један прстен крвног суда представљао временску контролу, док су други прстенови добијени од исте животиње служили за испитивање дејства блокатора од интереса. Овакав поступак је примењен с обзиром на постојања статистички значајне разлике између прве и друге кумулативне концентрацијски-зависне криве коришћених агониста, које су формиране са временским размаком од 45 или 60 минута. Блокатори од интереса су инкубирани након провере функционалног интегритета ендотела. Инкубација блокатора је трајала 30 минута пре формирања концентрацијски-зависних криви.

3.10. Обрада података и статистика

Контракtilни ефекат серотонина је у свим експериментима изражаван као проценат у односу на трећу контролну контракцију изазвану фенилефрином, док је релаксантни ефекат аденозина изражаван као проценат релаксације постигнут у односу на максималну преконтракцију изазвану фенилефрином, и то у поступку формирања концентрацијски-зависне криве за аденозин. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка средње вредности (S.E.M), док се односи на број експеримената. Коришћењем нелинеарне регресионе анализе за сваку дозно-зависну криву одређивана је средња ефективна концентрација, тј. концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}), као и максимални ефекат испитиваних агониста ($E_{\text{макс}}$). Средња ефективна концентрација представља концентрацију агонисте, која доводи до настанка половине максималног ефекта и представљена је помоћу pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). У циљу детаљнијег испитивања ефеката агониста од интереса (аденозина и серотонина) област испод добијених концентрацијски-зависних криви, у различитим анималним моделима патолошких стања, као и након примене

различитих агониста, додатно је поређена. Област испод криве (AUC) је рачуната за сваку појединачну концентрацијски-зависну криву.

Статистичко поређење добијених вредности унутар једне групе је изведено помоћу непарног студентовог т-теста, док је за статистичко поређење добијених вредности између група коришћена једнофакторска анализа варијанси (АНОВА). У овом случају постојање статистичке значајности је детаљно испитивано Turkey-овим *post hoc* тестом. Вредности $P < 0.05$ су сматране статистички значајном, вредности $P < 0.01$ сматране су високо статистички значајном, док су вредности $P < 0.001$ сматране изразито статистички значајном.

3.11. Супстанце

У поменутих експерименталним процедурама, коришћене су следеће супстанце: аденозин, алоксан, индометацин, лосартан, (–)-никотин хидроген тартаратна со, убаин, уретан, фенилефрин хидрохлорид, (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); ацетилхолин јодид (Serva, Heidelberg, Germany); нифедипин и серотонин (ICN, Irvine, CA, USA).

Раствори наведених супстанци прављени су сваког дана пре почетка експеримената. Супстанце су растваране у дестилованој води. Изузетак су алоксан и (–)-никотин хидроген тартаратна со, који су растварани у физиолошком раствору, затим индометацин, који је растваран у еквимоларом раствору натријум карбоната, као и нифедипин, који је растваран у 70% етанолу. Контролни експерименти су показали да коришћени растварачи нису утицали на дејства испитиваних агониста. Експерименти у којима су коришћени убаин и нифедипин извођени су у мрачној просторији због фотосензибилности супстанци. Све супстанце, коришћене за експерименте у органском купатилу, директно су додаване у органско купатило у дози од 0.15 мл, а приказане концентрације представљају финалне концентрације у органском купатилу.

4. РЕЗУЛТАТИ

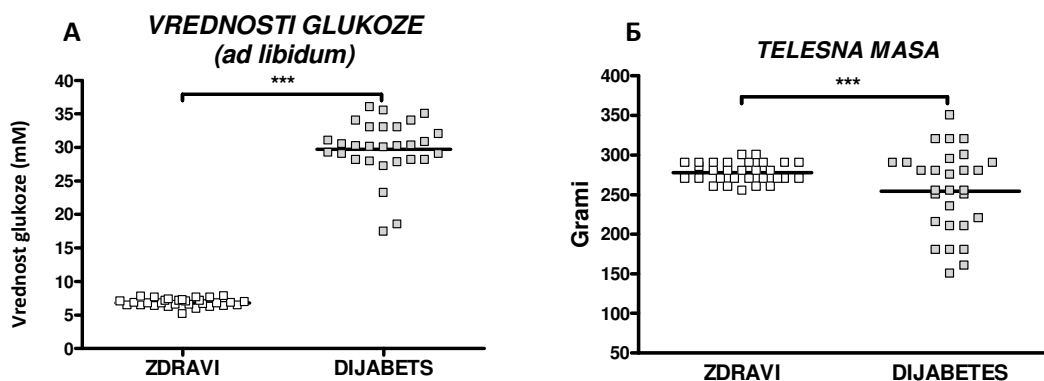
У два одвојена одељка приказани су резултату у којима су испитивана фармаколошка дејства серотонина и аденозина на препаратима изоловане феморалне артерије пацова у физиолошким, као и у патолошким условима од интереса.

4.1. Дејство серотонина на изолованој феморалној артерији пацова

4.1.1. Улога серотонина у периферној артеријској болести, посматрано кроз одговор феморалне артерије пацова: улога ендотела

4.1.1.1. Утицај дијабетеса изазваног алоксаном на телесну масу и ниво глукозе у периферној крви

Код животиња које су третиране алоксаном забележена телесна маса (245.60 ± 8.50 г) и ниво глукозе периферне крви (29.86 ± 0.61 mM) се статистички значајно разликују у односу на вредности истих параметара нетретираних животиња (279.70 ± 2.00 г; 6.68 ± 0.09 mM).



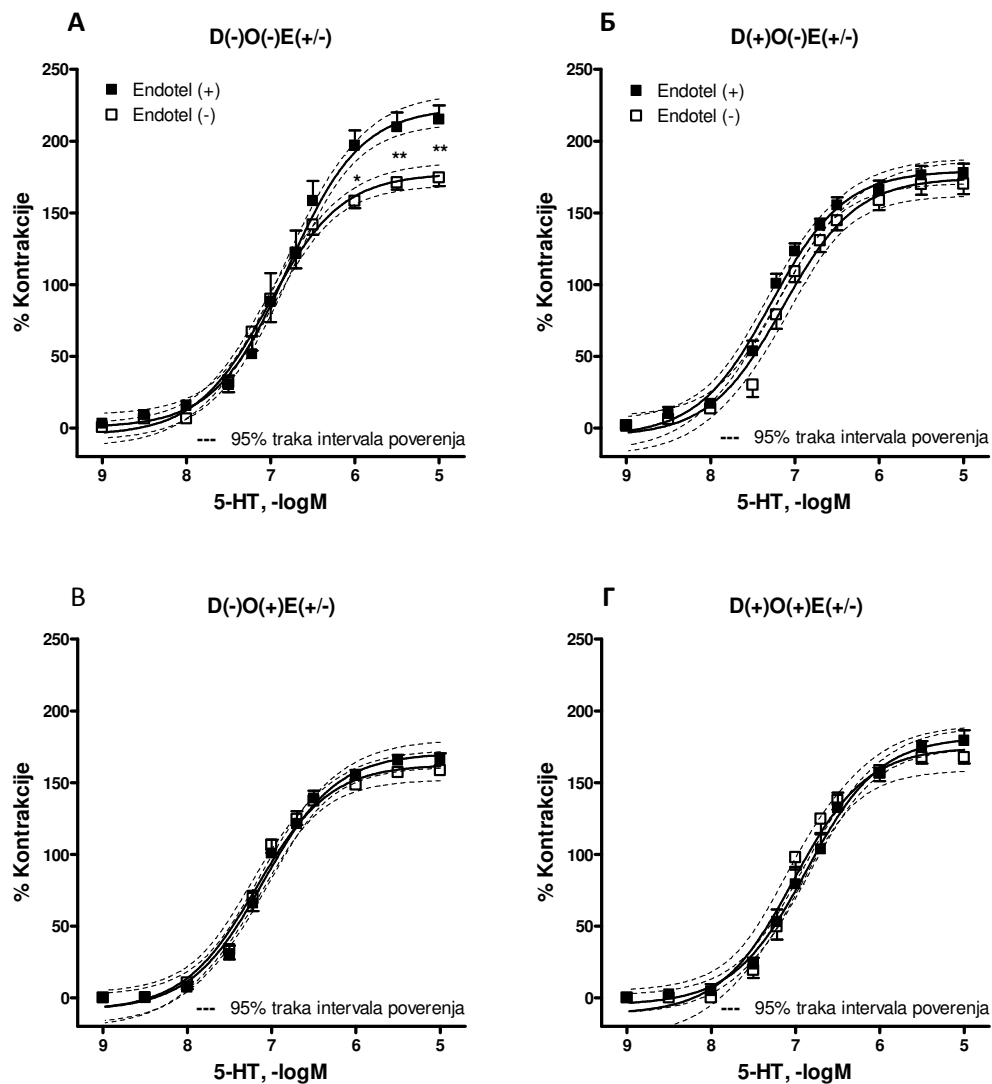
Слика 1. Промене у вредностима глукозе (А), и телесне масе (Б) изазване дијабетесом*** P < 0.001.

4.1.1.2. Дејство серотонина на изолованој феморалној артерији пацова

Серотонин (0.001 – 10 μM) је изазвао поредиве концентрацијски зависне контракције интактне феморалне артерије добијене од неоперисаних (здравих), и лажно оперисаних животиња ($E_{\text{макс}} = 199.30 \pm 15.25$; $pEC_{50} = 7.01 \pm 0.07$; $AUC = 379.20 \pm 47.67$). Слични резултати су добијени након одстрањивања ендотелног слоја ћелија, између група неоперисаних и лажно оперисаних животиња ($E_{\text{макс}} = 195.44 \pm 10.01$; $pEC_{50} = 7.025 \pm 0.042$; $AUC = 382.10 \pm 41.79$). У складу са “The 3Rs” принципом, а у циљу даљег избегавања непотребног коришћења експерименталних животиња, контролну групу су надаље сачињавале само неоперисане (здраве) животиње. Овакав приступ је био могућ пошто није детектована статистички значајна разлика у ефектима серотонина на феморалним артеријама здравих и лажно оперисаних животиња.

4.1.1.3. Последице одстрањивања ендотела на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином

Максимални контрактилни ефекат серотонина, пре и након одстрањивања ендотела, скоро је индентичан у свим експерименталним групама. Једина разлика постоји код здравих животиња где након уклањања ендотела долази до статистички значајне редукције ($P < 0.01$) контракције изазване серотонином (слика 2; Табела 1). Овај резултат говори у прилог значајног утицаја ендотелних ћелија у процесу контракције индуковане серотонином феморалне артерије, и даље упућује на постојање механизма који доводе до редукције максималног одговора у испитиваним патолошким стањима. Насупрот примећеној разлици у максималним ефектима серотонина, разлика у вредностима AUC и pEC_{50} није утврђена (Табела 1; $P > 0.05$). Додатна анализа је показала да контракција изазвана серотонином на препаратима здравих животиња са ендотелом показује статистички значајно већи максимални ефекат у односу на максималне ефекте добијене на препаратима са ендотелом других (патолошких) експерименталних група (Табела 1). Контрактилни одговор након одстрањивања ендотела је скоро индентичан у свим испитиваним експерименталним групама (Табела 1; $P > 0.05$).



Слика 2. Контракција изазвана серотонином изоловане феморалне артерије пацова након одстрањивања ендотела. Васкуларни сегменти су добијани од здравих (А,В), као и животиња са дијабетесом (Б,Г). Оклузија феморалне артерије је претходно извршена на насумично изабраним здравим (В) и дијабетичним животињама (Г). Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. (n = 5–11). Васкуларна контракција изазвана серотонином је приказана као проценат контролне контракције изазване фенилефрином. (---) 95% трака интервала поверења. * P < 0.05 и ** P < 0.01.

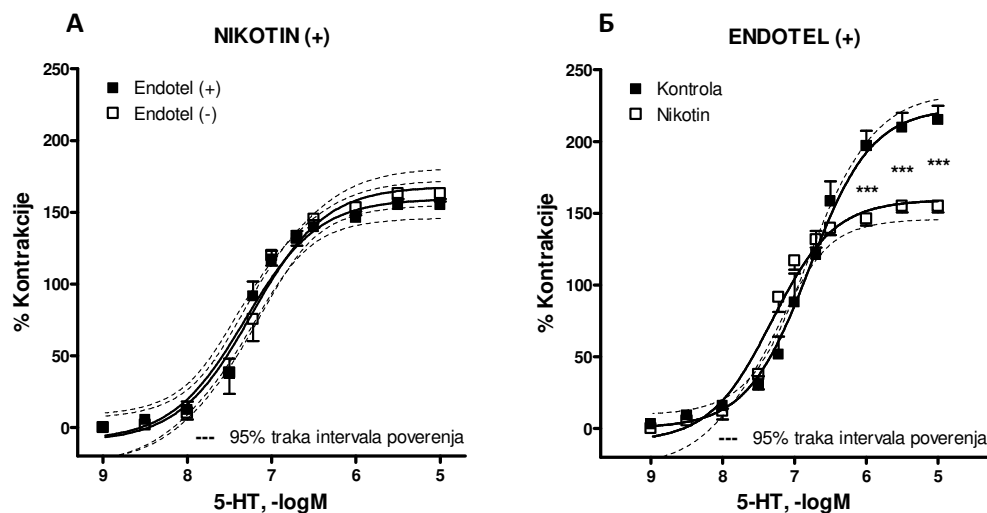
Табела 1. Контракција серотонином изоловане феморалне артерије пацова пореклом од животиња из различитих група/подгрупа.

	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
Са ендотелом			
Здрави	6.91 ± 0.09	214.70 ± 8.65	417.90 ± 22.96
Дијабетични	$7.40 \pm 0.09^{+++}$	$178.20 \pm 4.70^{+++}$	429.80 ± 27.59
Оклузија	7.11 ± 0.07	$169.7 \pm 4.252^{+++}$	348.60 ± 12.61
Дијабетес + оклузија	7.06 ± 0.05	$168.20 \pm 2.46^{+++}$	334.80 ± 8.17
Никотин	7.33 ± 0.07	$155.00 \pm 4.39^{+++}$	347.80 ± 14.27
Без ендотела			
Здрави	7.13 ± 0.09	$174.70 \pm 4.46^{***}$	362.10 ± 13.65
Дијабетични	7.22 ± 0.07	$170.60 \pm 6.53^{+++}$	367.90 ± 15.11
Оклузија	7.20 ± 0.07	$161.20 \pm 3.82^{+++}$	339.80 ± 8.16
Дијабетес + оклузија	7.12 ± 0.14	$177.30 \pm 3.41^{+++}$	369.30 ± 21.61
Никотин	7.26 ± 0.09	$163.20 \pm 5.76^{+++}$	353.80 ± 20.94

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности контракције (E_{max}) су приказане као проценат контракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 10-16$). *** $P < 0.001$ за унутар групну компарацију (непарни т-тест). $+++ P < 0.001$ након поређења са резултатима здравих животиња, код којих је очуван ендотел (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом).

4.1.1.4. Испитивање постојања ендотелне дисфункције и њеног потенцијалног ефекта на контракцију изазвану серотонином

Између препарата са и без ендотела, добијених од животиња код којих је ендотелна дисфункција изазвана никотином, није регистрована статистички значајне промена у васкуларним ефектима серотонина (Слика 3, $P > 0.05$).



Слика 3. Контракција феморалне артерије пацова изазване серотонином након уклањања ендотела код пацова третираних никотином (А). Поређење појединачних резултата након индукције ендотелне дисфункције никотином (Б) и утицаја интактног ендотела у контракцији феморалне артерије индуковане серотонином. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 5-11$). *** $P < 0.001$.

Међутим, статистички значајна разлика се може приметити уколико се пореде контракција изазване серотонином на сегментима интактне феморалне артерије, са резултатима на интактним сегментима добијених од животиња, којима је ендотелна дисфункција индукована никотином (Слика3, Табела 1, $P < 0.001$). Статистички значајна разлика изостаје уколико се на претходно поменутих сегментима феморалних крвних судова одстрие ендотел (Табела 1, $P > 0.05$). У свим осталим групама/подгрупама максимална контракција изазвана серотонином је била поредива са резултатима из групе третиране никотином (Табела 1, $P > 0.05$). Ови резултати нам указују на постојање ендотелне дисфункције, као и на њен јасан утицај на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином. Додатним поређењем вредности EC_{50} и AUC између групе третиране никотином и осталих група, није откривена статистички значајна разлика ($P > 0.05$).

Вредности ADMA у серуму животиња третираних никотином су биле статистички значајно веће у односу на вредности овог маркера у серуму здравих и дијабетичних животиња (слика 4, табела 2, $P < 0.05$). Насупрот овим резултатима, вредности ADMA у плазми различитих експерименталних група нису се

статистички значајно разликовале (слика 4, табела 2, $P > 0.05$). Међутим, значајна разлика је регистрована када су поређене вредности ADMA у серуму и плазми групе животиња третиране никотином (табела 2, $P < 0.01$).

Поређењем вредности VCAM-1у плазми и серуму испитиваних група није показано постојање статистички значајне разлике (слика 4, табела 2, $P > 0.05$). Такође, ни додатним поређењем вредности овог маркера између плазме и серума сваке експерименталне групе, није откривена статистички значајна разлика.

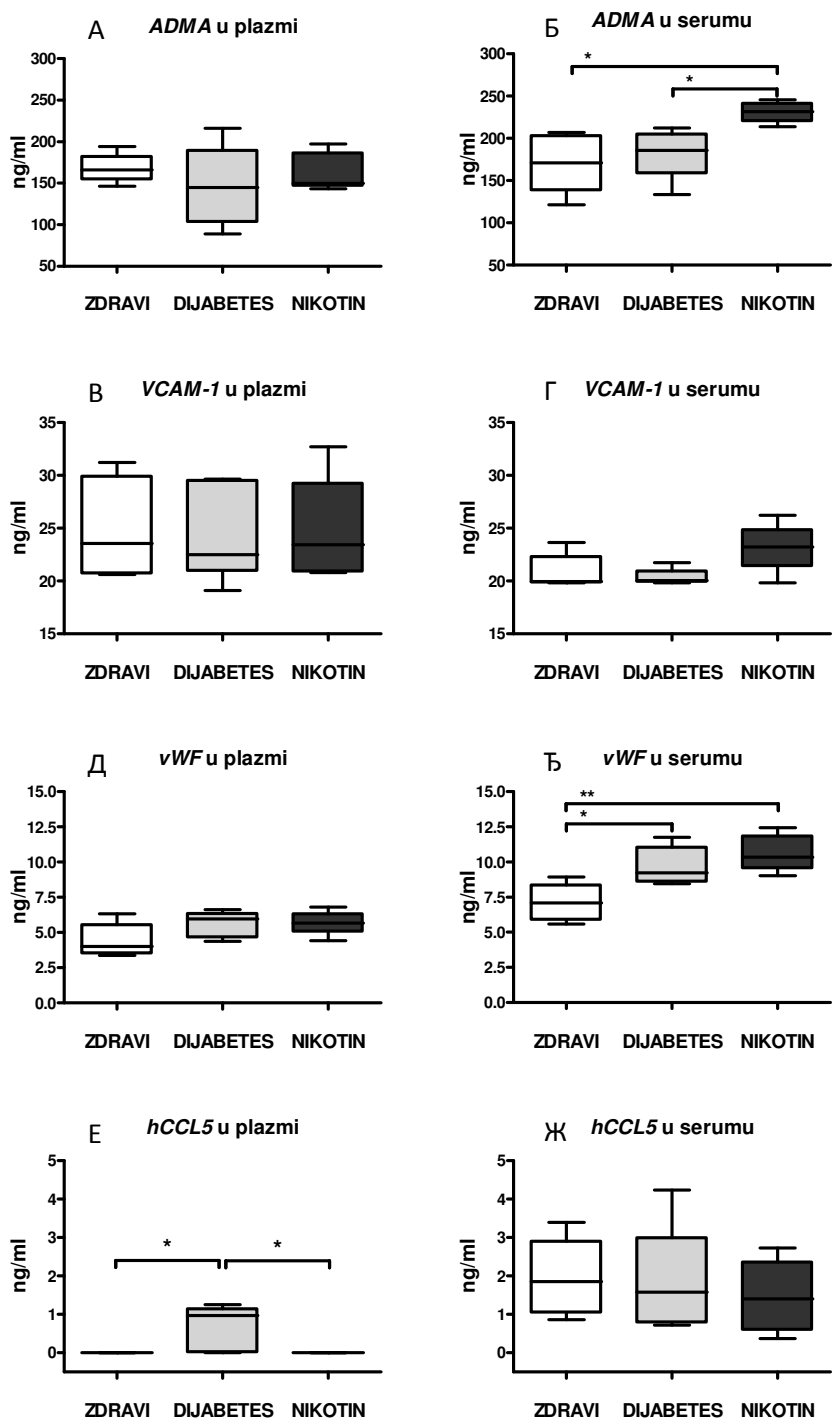
Серумске вредности vWF су значајно више у групи дијабетичних ($P < 0.05$) и животиња третираних никотином ($P < 0.01$), у односу на групу здравих животиња (слика 4, табела 2). Насупрот овим резултатима, вредности у плазми овог маркера се нису статистички значајно разликовале између испитиваних група (слика 4, табела 2, $P > 0.05$). Генерално посматрано, вредности овог маркера су биле више у животињском серуму у односу на плазму (табела 2, $P < 0.001$).

Вредности CCL5 маркера у серуму су биле сличне у свим поређеним групама (слика 4, табела 2, $P > 0.05$). Насупрот овим резултатима, вредности CCL5 су биле више у групи дијабетичних животиња у односу на групу здравих и животиња третираних никотином, код којих није било могуће детектовати овај маркер (слика 4, табела 2, $P < 0.05$).

Табела 2. Вредности ADMA, CCL5, VCAM-1 и vWF у серуму и плазми здравих, дијабетичних и животиња третираних никотином.

	Здрави	Дијабетични	Третирани никотином
Серум			
ADMA	170.5 ± 15.50*	182.8 ± 10.82*	230.5 ± 6.90
CCL5	1.927 ± 0.37	1.782 ± 0.52	1.473 ± 0.54
VCAM-1	20.92 ± 0.57	20.34 ± 0.36	23.11 ± 1.3
vWF	7.105 ± 0.60***†	9.692 ± 0.61	10.61 ± 0.58
Плазма			
ADMA	168.1 ± 10.05	145.8 ± 21.64	162.9 ± 10.26
CCL5	0.00 ± 0.00†	0.6533 ± 0.27	0.00 ± 0.00†
VCAM-1	24.71 ± 1.86	24.15 ± 1.55	24.51 ± 1.82
vWF	4.416 ± 0.53	5.572 ± 0.42	5.674 ± 0.38

Свака вредност представља средњу вредност ± S.E.M. (n = 4–7). * P < 0.05, ** P < 0.01 (поређење са групом третираном никотином). † P < 0.05 (поређење са дијабетичном групом).



Слика 4. Box and whiskers plots који приказују вредности маркера ADMA (А,Б), VCAM-1(В,Г), vWF (Д,Ђ) и CCL5 (Е,Ж) код здравих, дијабетичних и животиња третираних никотином. На графикону су приказани аритметичка средина, интерквартилни опсег, као и минимална и максимална вредност. * P < 0.05, ** P < 0.01.

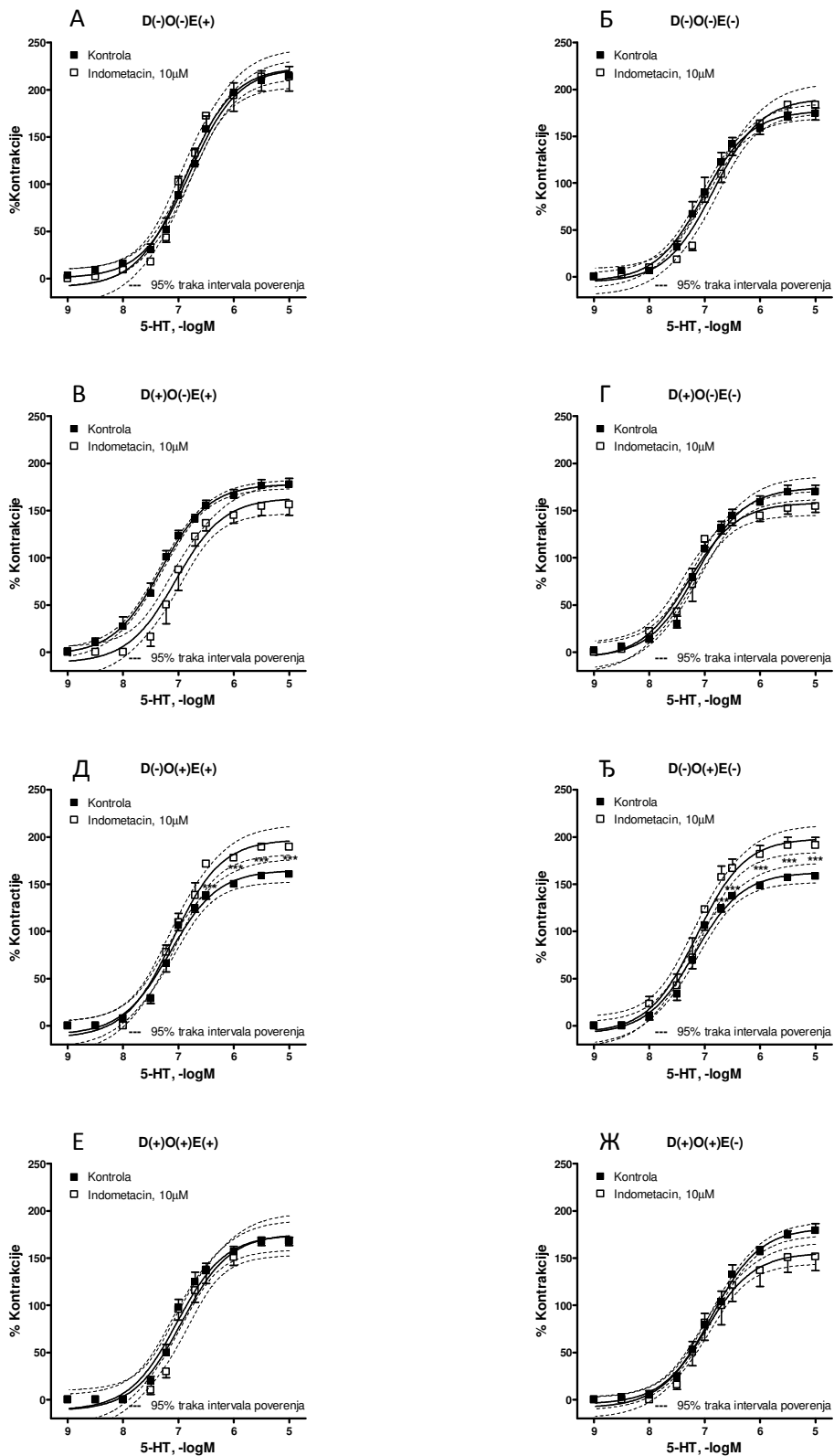
4.1.1.5. Дејство индометацина на контрактилне ефекте серотонина

У присуству индометацина (инхибитора циклооксигеназе, 10 μM) контрактилни ефекат изазван серотонином је био измењен само у групи здравих животиња са претходно подвезаном феморалном артеријом. Наиме, независно од присуства ендотела максимални ефекат серотонина се појачава након инкубације индометацина у овој групи експерименталних животиња (Табела 3, Слика 5). Присуство индометацина није утицало на промену pEC_{50} вредности. Са друге стране, након инкубације овог блокатора вредности AUC у групи животиња којима је извршена оклузија феморалне артерије је била статистички значајно већа у односу на одговарајућу контролу (Слика 5, Табела 3, $P < 0.01$). Такође, вредности овог параметра су биле ниже у групи здравих животиња без ендотела и дијабетичних животиња са ендотелом у односу на њихове одговарајуће контроле (Табела 3, Слика 5, $P < 0.01$).

Табела 3. Ефекат индометацина на контракцију феморалне артерије пацова из различитих група/подгрупа изазвану серотонином.

	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
Са ендотелом			
Здрави + индометацин	6.87 ± 0.05	213.80 ± 15.19	401.00 ± 31.80
Дијабетични + индометацин	7.06 ± 0.10	$156.40 \pm 11.39^{\dagger\dagger\dagger}$	$309.00 \pm 27.10^*$
Оклузија + индометацин	7.09 ± 0.06	$189.60 \pm 1.82^*$	384.90 ± 9.79
Дијабетес + оклузија + индометацин	6.92 ± 0.07	$168.40 \pm 4.98^{\dagger\dagger\dagger}$	314.80 ± 17.50
Без ендотела			
Здрави + индометацин	6.85 ± 0.08	183.60 ± 16.27	$339.20 \pm 20.36^*$
Дијабетични + индометацин	7.33 ± 0.11	$154.6 \pm 6.56^{\dagger\dagger\dagger}$	347.50 ± 30.35
Оклузија + индометацин	7.17 ± 0.07	$191.40 \pm 8.30^{**}$	$410.40 \pm 25.93^{**}$
Дијабетес + оклузија + индометацин	6.92 ± 0.09	$157.10 \pm 12.89^{\dagger\dagger\dagger}$	295.30 ± 31.24

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности контракције (E_{max}) су приказане као проценат контракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 4-7$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, када се поређење врши са одговарајућом контролом (непарни т-тест), $^{\dagger\dagger\dagger} P < 0.001$ уколико се поређење врши са препаратима здравих животиња са очуваним ендотелом (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом).



Слика 5. Ефекат индометацина на контракцију феморалне артерије пацова индуковану серотонином. Васкуларни прстенови су добијени од здравих (А,Б,Д,Ђ), као и животиња са дијабетесом (В,Г,Ж,Е). Додатно је извршена оклузија феморалних крвних судова на насумично одабраним здравим (Д,Ђ), као и животињама са дијабетесом (Е,Ж). Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. (n = 4–16). * P < 0.001, ** P < 0.001, *** P < 0.001.

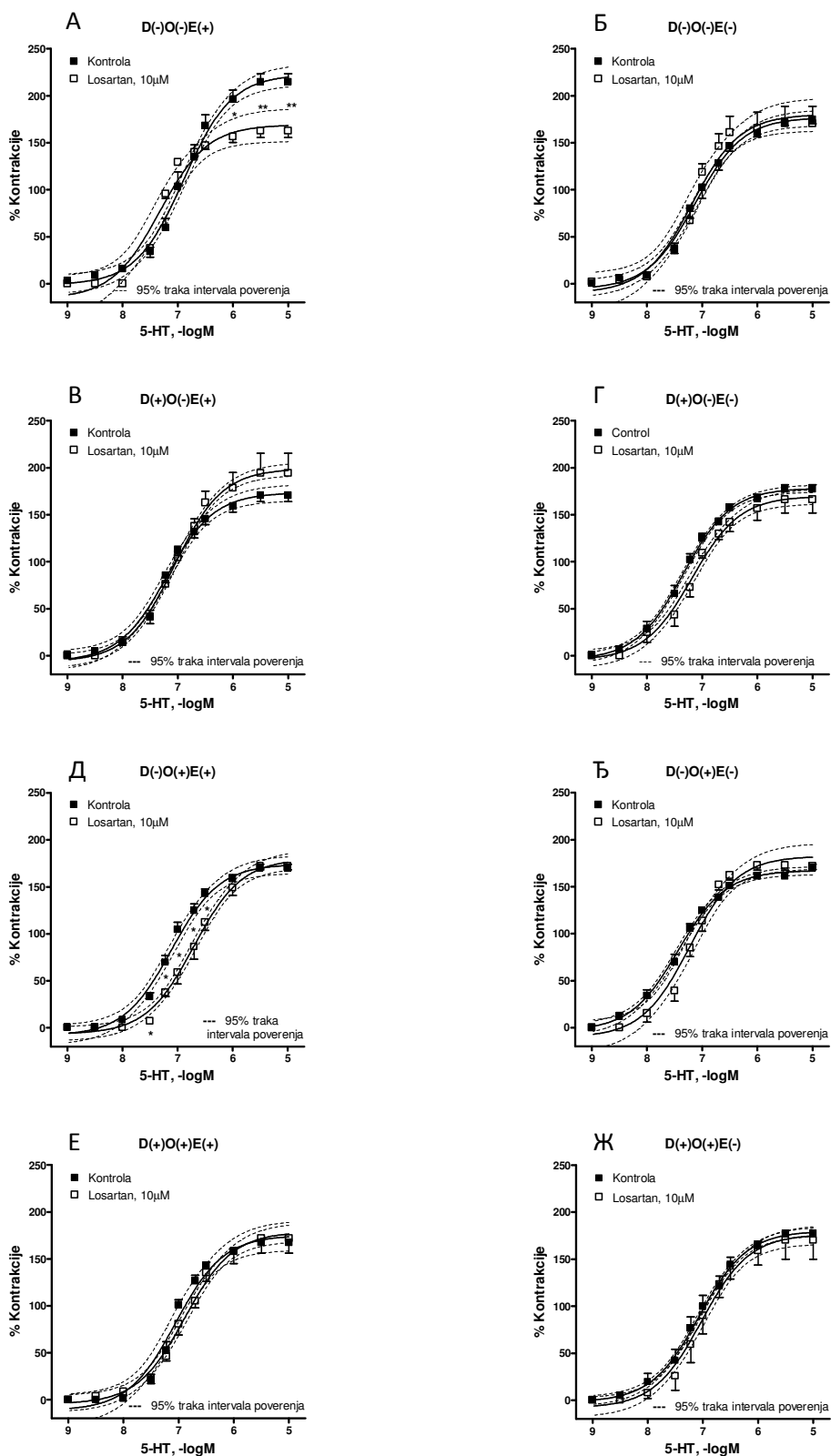
4.1.1.6. Ефекти инкубације лосартана на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином

Након инкубације лосартана (блокатора ангиотензинских рецептора, 10 μM), долази до редукције максималног одговора феморалне артерије са очуваним ендотелом према дејствима серотонина (Табела 4, слика 6, $P < 0.01$). Лосартан је утицао на вредности E_{max} у осталим групама (Табела 4, слика 6). Такође, инкубација овог блокатора није довела до статистички значајне промене у вредностима параметара pEC_{50} и AUC (Табела 4, слика 6).

Табела 4. Ефекат лосартана на контракцију феморалне артерије пацова из различитих група/подгрупа изазвану серотонином.

	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{\text{max}} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
Са ендотелом			
Здрави + лосартан	7.33 ± 0.02	$162.70 \pm 7.21^{**}$	359.00 ± 14.64
Дијабетични + лосартан	7.11 ± 0.10	$194.30 \pm 21.10^{\dagger\dagger\dagger}$	395.60 ± 26.09
Оклузија + лосартан	6.70 ± 0.08	$172.00 \pm 3.73^{\dagger\dagger\dagger}$	291.70 ± 16.61
Дијабетес + оклузија + лосартан	6.89 ± 0.07	$171.9 \pm 15.61^{\dagger\dagger\dagger}$	329.3 ± 28.55
Без ендотела			
Здрави + лосартан	7.20 ± 0.06	$170.50 \pm 18.14^{\dagger\dagger\dagger}$	371.20 ± 31.52
Дијабетични + лосартан	7.28 ± 0.18	$166.30 \pm 14.45^{\dagger\dagger\dagger}$	361.20 ± 11.74
Оклузија + лосартан	6.94 ± 0.08	$173.00 \pm 5.27^{\dagger\dagger\dagger}$	330.3 ± 15.08
Дијабетес + оклузија + лосартан	7.06 ± 0.15	$169.90 \pm 20.14^{\dagger\dagger\dagger}$	339.5 ± 38.59

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности контракције (E_{max}) су приказане као проценат контракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 4-6$). $** P < 0.01$, када се поређење врши са одговарајућом контролом (непарни т-тест), $^{\dagger\dagger\dagger} P < 0.001$ уколико се поређење врши са препаратима здравих животиња са очуваним ендотелом (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом).

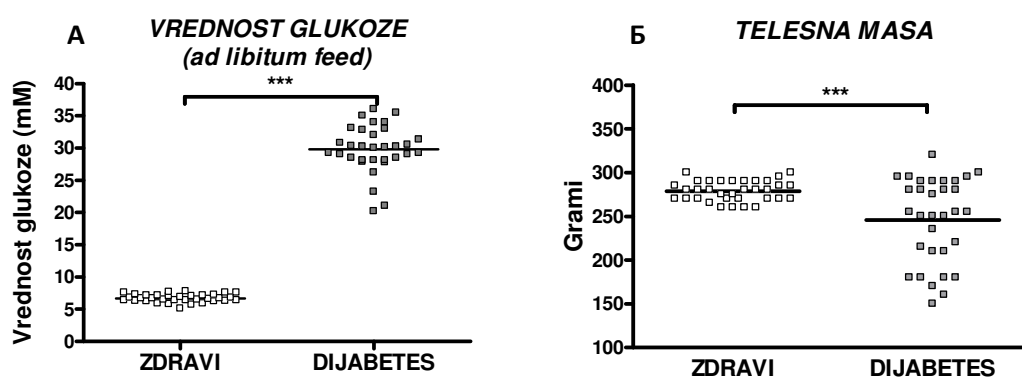


Слика 6. Ефекат лосартана на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином. Васкуларни прстенови су добијени од здравих (А,Б,Д,Ђ), као и животиња са дијабетесом (В,Г,Ж,Е). Додатно је извршена оклузија феморалних крвних судова на насумично одабраним здравим (Д,Ђ), као и животињама са дијабетесом (Е,Ж). Свака вредност представља средњу вредност ± S.E.M. (n = 4–16). * P < 0.001, ** P < 0.001, *** P < 0.001.

4.1.2. Улога серотонина у периферној артеријској болести, посматрано кроз одговор феморалне артерије пацова: улога калцијумових јона

4.1.2.1. Утицај дијабетеса изазваног алоксаном на телесну масу и ниво глукозе у периферној крви

Као и у претходном делу истраживања, и у овом делу се код животиња које су третиране алоксаном, телесна маса (245.80 ± 8.59 г), као и ниво глукозе у периферној крви (29.78 ± 0.65 mM) статистички значајно разликују уколико се пореде са вредностима нетретираних животиња (278.70 ± 1.98 г; 6.69 ± 0.11 mM).



Слика 7. Промене у вредностима глукозе (А), и телесне масе (Б) изазване дијабетесом. *** P < 0.001.

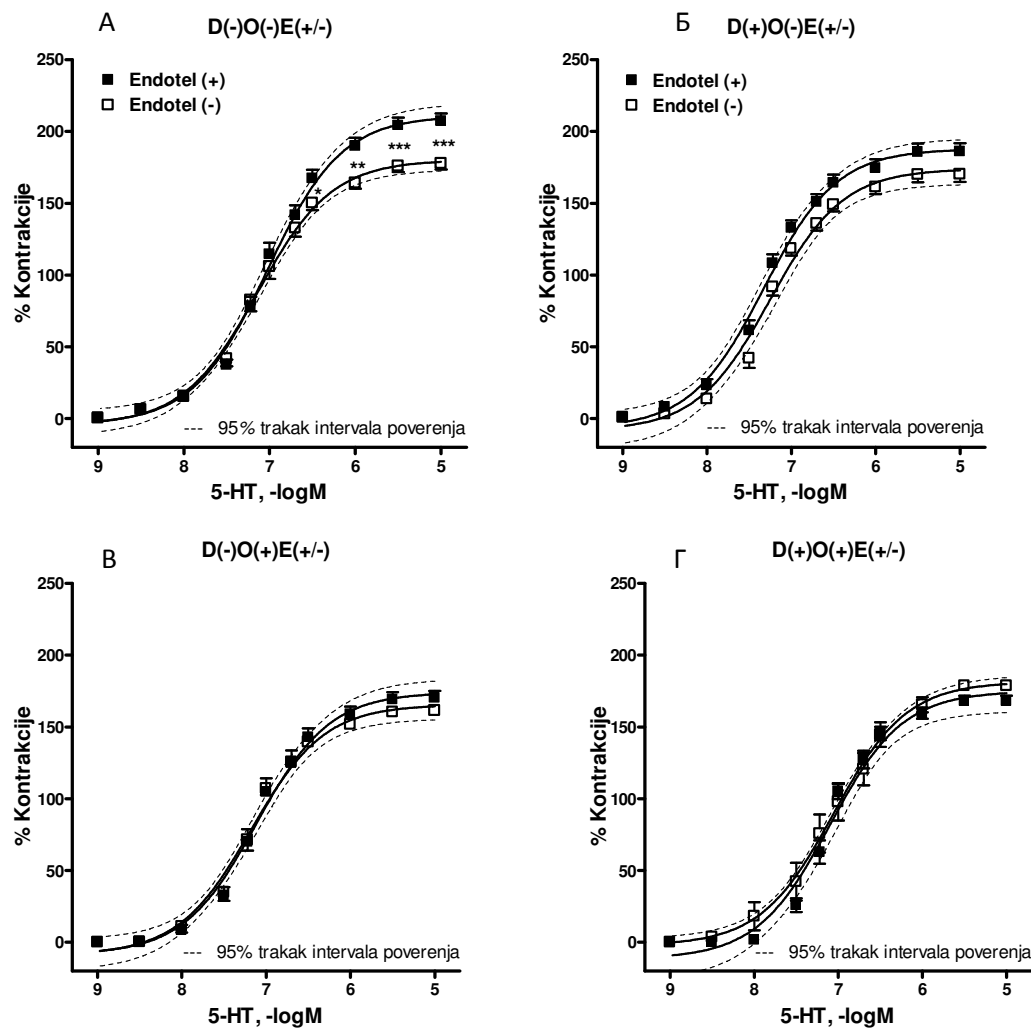
4.1.2.2. Последице одстрањивања ендотела на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином

Добијени резултати у овом делу истраживања, а који су у вези са дејством серотонина ($0.001 - 10$ μ M) на нивоу феморалне артерије у присуству или одсуству ендотела, били су готово индентични као и резултати из претходног дела истраживања, чиме се овај резултат додатно потврђује. Наиме, максимални контрактилни ефекат је био сличан у свим испитиваним групама, без обзира на присуство ендотела (Табела 5, Слика 8, P > 0.05). Једина разлика је примећена у групи здравих животиња са очуваним ендотелом, где је контракција била значајно већа (Табела 5, Слика 8, P > 0.001). Насупрот максималног ефекта, вредности pEC₅₀ и AUC се нису разликовале међу испитиваним групама (Табела 5).

Табела 5. Контракција изоловане феморалне артерије пацова из различитих група/подгрупа индукована серотонином.

	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
Са ендотелом			
Здрави	$7,04 \pm 0,06$	$207,20 \pm 5,38$	$418 \pm 12,02$
Дијабетични	$7,34 \pm 0,05$	$186 \pm 5,92$	$443,80 \pm 24,19$
Оклузија	$7,11 \pm 0,08$	$170,10 \pm 5,05$	$349,40 \pm 14,98$
Дијабетес + оклузија	$7,11 \pm 0,05$	$167,90 \pm 3,72$	$342,30 \pm 9,57$
Без ендотела			
Здрави	$7,14 \pm 0,06$	$177,60 \pm 4,17^{***}$	$375,30 \pm 12,49^*$
Дијабетични	$7,27 \pm 0,05$	$170,10 \pm 5,26$	$372,80 \pm 12,04^*$
Оклузија	$7,21 \pm 0,06$	$161,40 \pm 3,56$	$341,30 \pm 7,76$
Дијабетес + оклузија	$7,11 \pm 0,14$	$178,60 \pm 3,46$	$369,10 \pm 23,67$

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности контракције (E_{max}) су приказане као проценат контракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 10-16$). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ када се резултати пореде са одговарајућом контролом (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом).



Слика 8. Контракција изоловане феморалне артерије пацова изазвана серотонином након одстрањивања ендотела . Васкуларни сегменти су добијани од здравих (А,В), као и животиња са дијабетесом (Б,Г). Оклузија феморалне артерије је претходно извршена на насумично изабраним здравим (В) и дијабетичним животињама (Г). Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. (n = 5–11). Васкуларна контракција изазвана серотонином је приказана као проценат претходне контракције изазване фенилефрином. (---) 95% трака интервала поверења. * P < 0.05, ** P < 0.01 и *** P < 0.001.

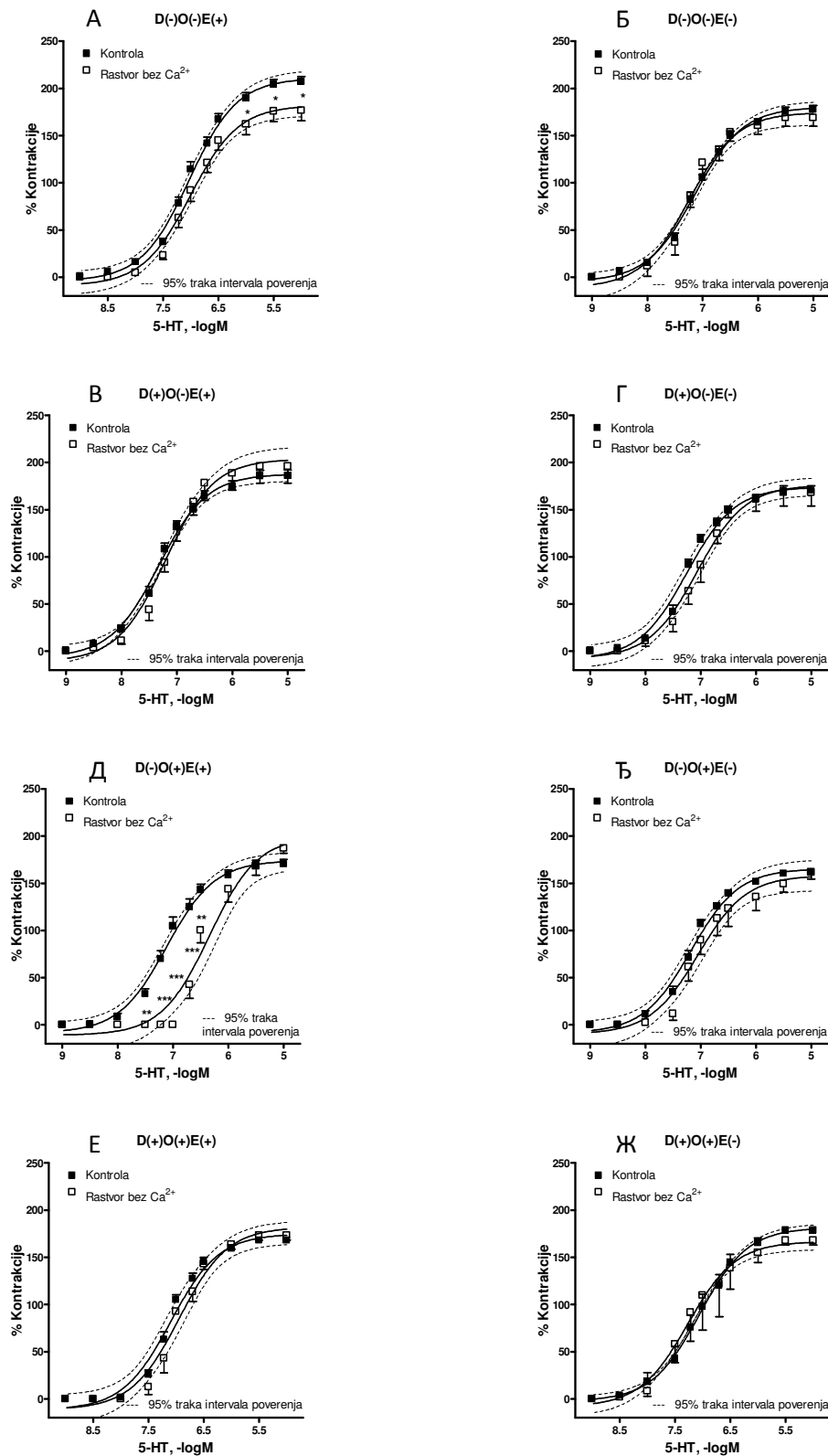
4.1.2.3. Утицај измењеног Кребс-Рингеровог раствора на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином

Замена Кребс-Рингеровог бикарбонатног раствора са раствором без калцијума је довела до статистички значајне редукције контракције изазване серотонином само у групи здравих животиња, код којих је очуван ендотелни слој ћелија (Табела 6, слика 9, $P < 0.05$). Са друге стране, у подгрупи здравих животиња којима је извршена оклузија феморалне артерије, раствор без калцијума је утицао на померање концентрацијски-зависне сигмоидне криве у десно, што је проузроковало промене вредности pEC_{50} , као и AUC (Табела 6, слика 9).

Табела 6. Контракција изазвана серотонином изоловане феморалне артерије пацова из различитих група/подгрупа у присуству раствора без калцијума.

<i>Раствор без калцијума</i>	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
<i>Са ендотелом</i>			
Здрави	$7,00 \pm 0,06^\dagger$	$176,70 \pm 10,74^*$	$345,20 \pm 24,61^{**}$
Дијабетични	$7,34 \pm 0,05$	$186 \pm 5,92$	$443,80 \pm 24,19$
Оклузија	$6,28 \pm 0,07^{***}$	$187,00 \pm 5,15$	$260,20 \pm 28,24^{**}$
Дијабетес + оклузија	$7,11 \pm 0,05$	$167,90 \pm 3,72$	$342,30 \pm 9,57$
<i>Без ендотела</i>			
Здрави	$7,26 \pm 0,09$	$169,00 \pm 9,141$	$368,20 \pm 30,38$
Дијабетични	$7,27 \pm 0,05$	$170,10 \pm 5,26$	$372,80 \pm 12,04^*$
Оклузија	$6,89 \pm 0,27$	$161,90 \pm 7,57^\dagger$	$298,80 \pm 30,09$
Дијабетес + оклузија	$7,11 \pm 0,14$	$178,60 \pm 3,46$	$369,10 \pm 23,67$

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности контракције (E_{max}) су приказане као проценат контракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност $\pm S.E.M.$ ($n = 5-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ уколико се резултати пореде са одговарајућом контролом (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом).



Слика 9. Ефекат раствора без калцијума на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином. Васкуларни прстенови су добијени од здравих (А,Б,Д,Ђ), као и животиња са дијабетесом (В,Г,Ж,Е). Додатно је извршена оклузија феморалних крвних судова на насумично одабраним здравим (Д,Ђ), као и животињама са дијабетесом (Е,Ж). Свака вредност представља средњу вредност ± S.E.M. (n = 4–16). * P < 0.001, ** P < 0.001, *** P < 0.001.

4.1.2.4. Ефекат нифедипина на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином

Примена нифедипина (блокатор L-типа калцијумских канала, 0.1 μM) је на различите начине утицала на контракцију изазвану серотонином у различитим групама/подгрупама. Тако је, на пример, у групи здравих животиња са очуваним ендотелом, нифедипин довео до померања криве, настале под дејством серотонина, у десно и промене $p\text{EC}_{50}$ вредности, уколико се ова вредност пореди са одговарајућом контролом (Табела 7, слика 10). Након одстрањивања ендотела, нифедипин је утицао само на вредност $E_{\text{макс}}$ (Табела 7, слика 10).

У групи дијабетичних животиња регистрован је сличан, само израженији ефекат нифедипина. Тако је на препаратима са очуваним ендотелом померање криве у десно израженије у односу на померање у групи здравих животиња (Табела 7, слика 10, $P < 0.01$). Такође, након одстрањивања ендотела и истовремене примене нифедипина, максимални контрактилни ефекат је био значајно редукован у односу на здраву групу животиња (Табела 7, слика 10, $P < 0.01$), а додатно је регистровано и померање криве у десно. Ово померање се види и кроз промену $p\text{EC}_{50}$ вредности ($P < 0.01$). Такође, AUC ($P < 0.001$) је значајно снижена уколико се пореди са одговарајућом контролом.

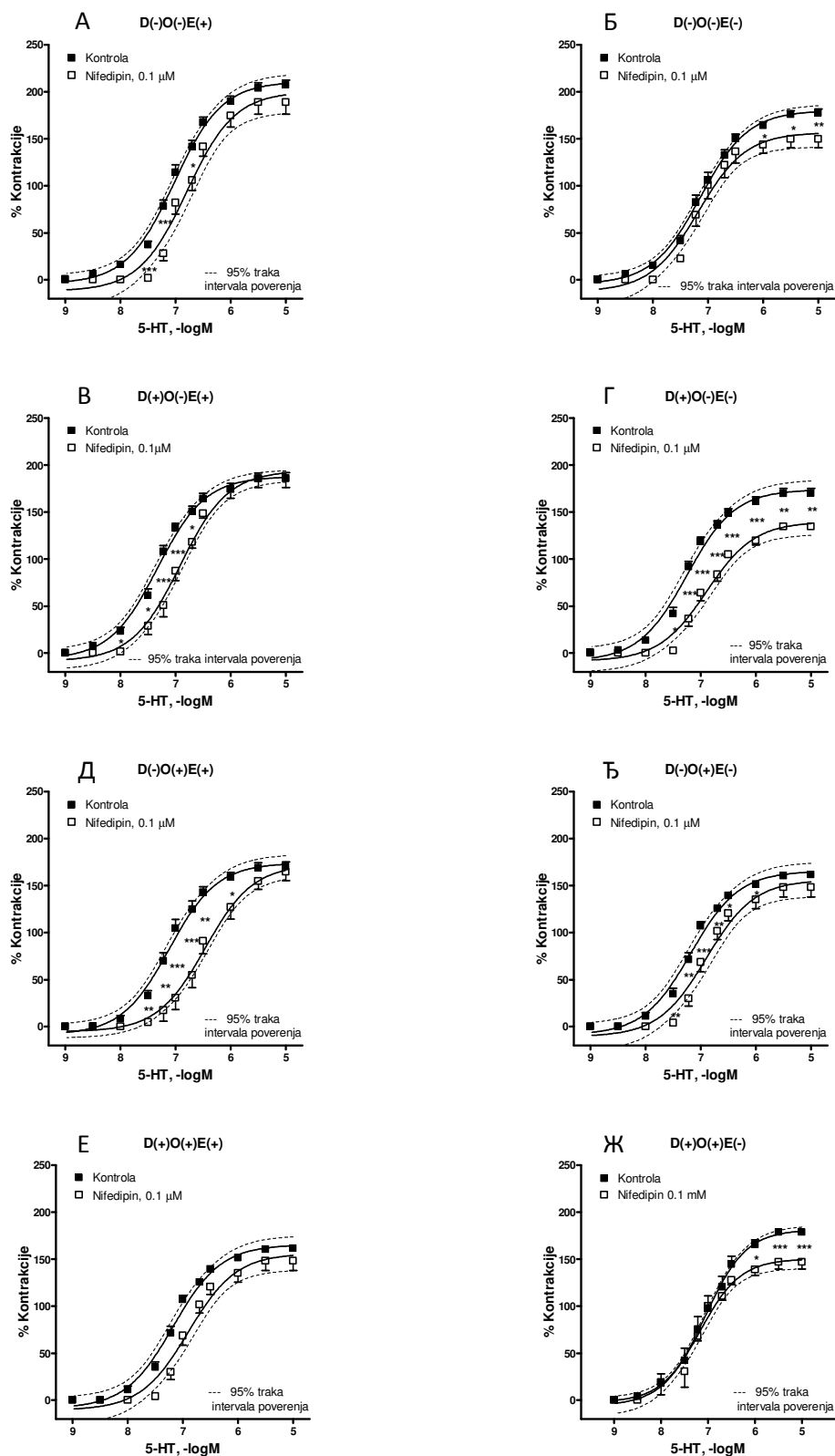
У подгрупи здравих животиња којима је оклудирана феморална артерија примена нифедипина је довела до значајнијег померања криве у десно на препаратима са и без ендотела. Такође, без обзира на присуство ендотела, примена нифедипина је довела до статистички значајне промене у вредностима $p\text{EC}_{50}$ и AUC уколико се поређење вршило са одговарајућом контролом (Табела 7, слика 10, $P < 0.001$).

У подгрупи дијабетичних животиња, којима је оклудирана феморална артерија, једина разлика је регистрована након одстрањивања ендотела. Наиме, максимални ефекат изазван серотонином је значајно био редукован након примене нифедипина (Табела 7, слика 10, $P < 0.001$).

Табела 7. Контракција изоловане феморалне артерије пацова из различитих група/подгрупа изазвана серотонином у присуству нифедипина.

<i>Нифедипин</i>	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
<i>Са ендотелом</i>			
Здрави	$6.79 \pm 0.06^{*\dagger\dagger}$	188.9 ± 12.63	334.2 ± 23.48
Дијабетични	$6.96 \pm 0.10^{**}$	185.80 ± 9.66	355.40 ± 11.59
Оклузија	$6.47 \pm 0.14^{***\dagger}$	164.7 ± 9.28	$241.80 \pm 22.74^{***}$
Дијабетес + оклузија	6.97 ± 0.03	148.2 ± 10.26	332.80 ± 27.12
<i>Без ендотела</i>			
Здрави	7.17 ± 0.06	$149.6 \pm 9.25^{**}$	$314.6 \pm 24.77^*$
Дијабетични	$6.90 \pm 0.08^{**}$	$134.60 \pm 2.61^{**}$	$245.20 \pm 7.39^{***\dagger\dagger\dagger}$
Оклузија	$6.91 \pm 0.08^*$	148.20 ± 10.26	$273.3 \pm 16.99^{***}$
Дијабетес + оклузија	7.26 ± 0.14	$146.80 \pm 7.36^{***}$	316.4 ± 13.03

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности контракције (E_{max}) су приказане као проценат контракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 4-7$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ уколико се резултати пореде са одговарајућом контролом (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом). \dagger $P < 0.05$, $\dagger\dagger$ $P < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger$ $P < 0.001$ када се врши унутаргрупно поређење (непарни т-тест).



Слика 10. Ефекат нифедипина на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином. Васкуларни прстенови су добијени од здравих (А,Б,Д,Ђ), као и животиња са дијабетесом (В,Г,Ж,Е). Додатно је извршена оклузија феморалних крвних судова на насумично одабраним здравим (Д,Ђ), као и животињама са дијабетесом (Е,Ж). Свака вредност представља средњу вредност ± S.E.M. (n = 4–16). * P < 0.001, ** P < 0.001, *** P < 0.001.

4.1.2.5. Ефекат убаина на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином

У присуству убаина (блокатора натријум / калијум АТПазе, 100 μM), у групи здравих животиња, максимални ефекат серотонина је значајно био редукован без обзира на присуство ендотела (Табела 8, слика 11). Исто тако, независно од присуства ендотела, вредност АУС је значајно била редукована након примене убаина (Табела 8).

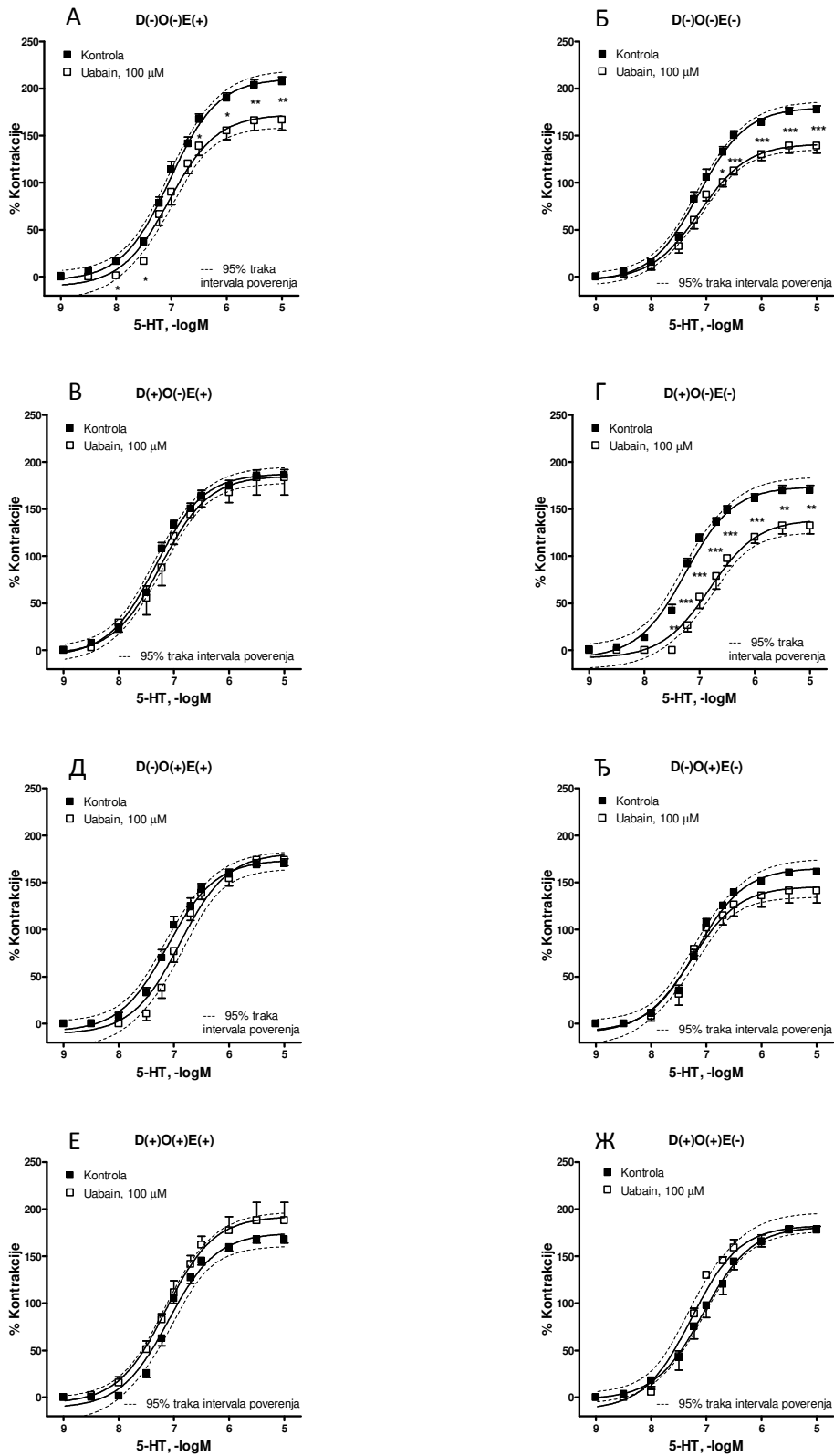
У групи животиња са дијабетесом, убаин није значајније мењао кумулативну криву индуковану серотонином на препарата са ендотелом. Међутим, након одстрањивања ендотела, убаин проузрокује промене сва три испитивана параметра ($E_{\text{макс}}$, pEC_{50} и АУС) (Табела 8).

Са друге стране, у подгрупи животиња којима је била подвезана феморална артерија (и код здравих, и код дијабетичних) убаин не утиче на испитиване параметре $E_{\text{макс}}$, pEC_{50} и АУС (Табела 8, слика 11).

Табела 8. Контракција узрокована серотонином изоловане феморалне артерије пацова из различитих група/подгрупа у присуству убаина.

Убаин	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
Са ендотелом			
Здрави	$7,04 \pm 0,07$	$166,8 \pm 10,65^{**}$	$328,4 \pm 22,81^{**}$
Дијабетични	$7,31 \pm 0,18$	$183,50 \pm 18,44$	$405,60 \pm 22,98$
Оклузија	$6,89 \pm 0,08^{\dagger\dagger}$	$174,10 \pm 6,44$	$319,50 \pm 15,14$
Дијабетес + оклузија	$7,16 \pm 0,11$	$188,10 \pm 19,29$	$400,30 \pm 23,88^*$
Без ендотела			
Здрави	$7,14 \pm 0,06$	$139,20 \pm 7,65^{***}$	$292,70 \pm 6,29^{**}$
Дијабетични	$6,81 \pm 0,12^{**\dagger}$	$132,30 \pm 8,55^{**\dagger\dagger\dagger}$	$234,50 \pm 15,13^{***\dagger}$
Оклузија	$7,28 \pm 0,05$	$141,40 \pm 13,12$	$310,10 \pm 32,05$
Дијабетес + оклузија	$7,26 \pm 0,08$	$178,00 \pm 3,89$	$384,40 \pm 11,72$

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности контракције (E_{max}) су приказане као проценат контракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 4 - 6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ уколико се резултати пореде са одговарајућом контролом (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом). \dagger $P < 0.05$, $\dagger\dagger$ $P < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger$ $P < 0.001$ уколико се врши унутаргрупно поређење (непарни т-тест).



Слика 11. Ефекат уабаина на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином. Васкуларни прстенови су добијени од здравих (А,Б,Д,Ђ), као и животиња са дијабетесом (В,Г,Ж,Е). Додатно је извршена оклузија феморалних крвних судова на насумично одабраним здравим (Д,Ђ), као и животињама са дијабетесом (Е,Ж). Свака вредност представља средњу вредност ± S.E.M. (n = 4–16). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

4.1.2.6. Ефекат истовремене примене нифедипина и убаина на контракцију феморалне артерије изазвану серотонином

У групи здравих животиња са сачуваним слојем ендотелних ћелија, комбинација нифедипина и убаина је довела до значајне промене у вредностима $E_{\text{макс}}$ и АУС (Табела 9, Слика12). Добијени резултати су слични са резултатима забележеним након примене убаина, међутим израженија статистичка значајност се добија након додавања нифедипина. На препаратима са уклоњеним ендотелом, разлика у максималном ефекту је такође била приметна, али није статистички значајна. Комбинована примена нифедипина и убаина није утицала на вредност pEC_{50} .

У групи дијабетичних животиња, комбинација нифедипина и убаина није утицала ни на један од испитиваних параметара. Ипак, тренд ка повећању контракције изазване серотонином, на препаратима са ендотелом се региструје након примене ове комбинације.

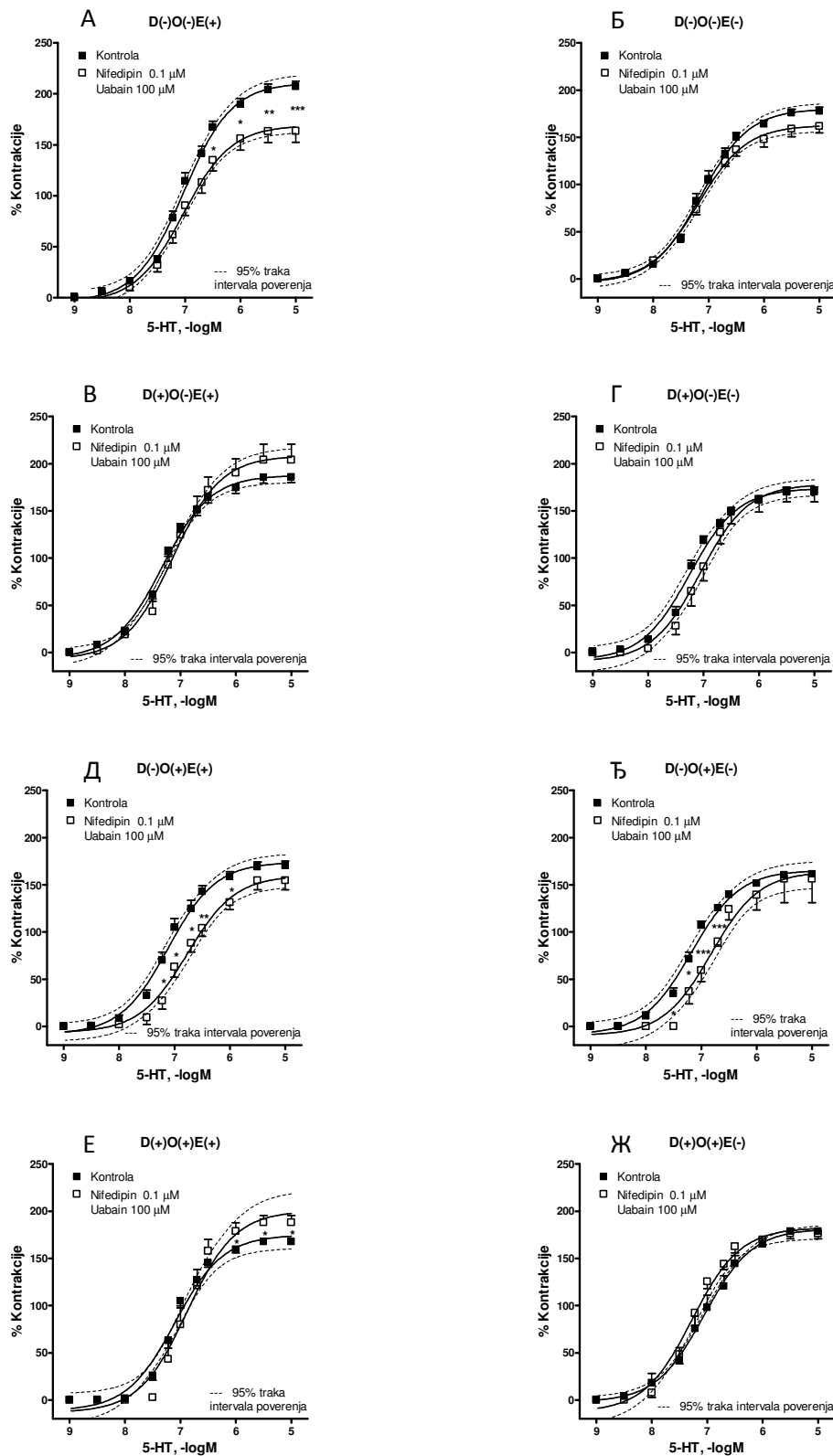
Са друге стране у групи здравих животиња, којима је подвезана феморална артерија, крива индукована серотонином је померена у десно без обзира на писуство ендотела (Табела 9, Слика12). Ово се може видети и у промени pEC_{50} вредности. У овој подгрупи животиња вредности $E_{\text{макс}}$ и АУС остају непромењене након истовремене примене поменутих блокатора.

У подгрупи дијабетичних животиња са оклузијом феморалне артерије истовремена примена нифедипина и убаина је појачала контракцију изазвану серотонином на сегменту феморалне артерије са ендотелом. Такође, вредност pEC_{50} је била нижа уколико се поређење врши са одговарајућом контролом. На препаратима са одстрањеним ендотелом, ове супстанце нису имале значајније ефекте.

Табела 9. Контракција изазвана серотонином изоловане феморалне артерије пацова из различитих група/подгрупа у присуству нифедипина и убаина.

Нифедипин+ убаин	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
Са ендотелом			
Здрави	7.04 ± 0.08	$163.60 \pm 11.10^{***}$	$334.20 \pm 25.89^{**}$
Дијабеични	7.15 ± 0.10	204.20 ± 16.58	429.20 ± 36.33
Оклузија	6.80 ± 0.13	154.60 ± 9.85	$267.90 \pm 9.17^{**}$
Дијабетес + оклузија	$6.87 \pm 0.10^{*\dagger}$	$188.00 \pm 7.72^*$	348.6 ± 25.80
Без ендотела			
Здрави	7.20 ± 0.06	161.60 ± 6.77	347.60 ± 9.97
Дијабеични	7.06 ± 0.09	171.10 ± 11.53	346.4 ± 31.82
Оклузија	$6.85 \pm 0.11^*$	156.00 ± 24.81	$277.2 \pm 33.43^{**}$
Дијабетес + оклузија	7.28 ± 0.08	176.30 ± 5.48	388.50 ± 17.87

Концентрација која је довољна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности контракције (E_{max}) су приказане као проценат контракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. (n = 4–8). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 када се резултати пореде са одговарајућом контролом (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом). † P < 0.05, када се врши унутаргрупно поређење (непарни т-теста).



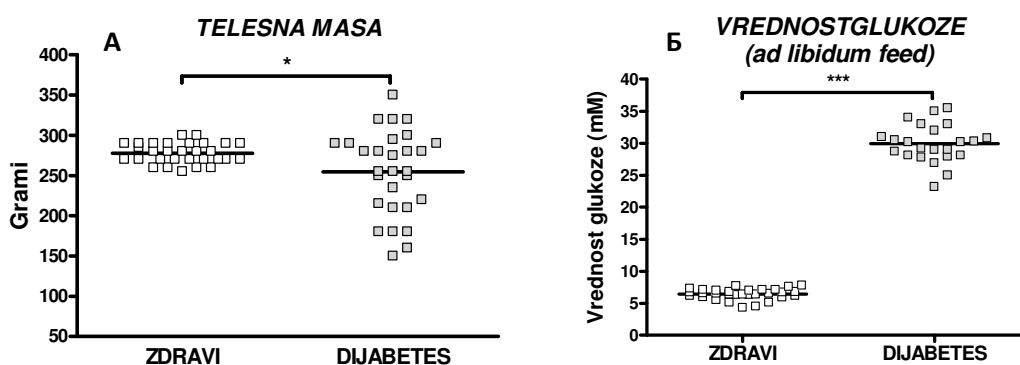
Слика 12. Ефекат комбиноване примене нифедипина и уабаина на серотонином-индуковану контракцију феморалне артерије пацова. Васкуларни прстенови су добијени од здравих (А,Б,Д,Ђ) и животиња са дијабетесом (В,Г,Ж,Е). Додатно је извршена оклузија феморалних крвних судова на насумично одабраним здравим (Д,Ђ) и животињама са дијабетесом (Е,Ж). Свака вредност представља средњу вредност ± S.E.M. (n = 4 – 8). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

4.2. Резултати са аденозином

4.2.1. Релаксатни одговор феморалне артерије према аденозину у експерименталним моделима дијабетеса и/или васкуларне оклузије

4.2.1.1. Утицај дијабетеса изазваног алоксаном на телесну масу и ниво глукозе у периферној крви

Јасна разлика у вредностима телесне масе, као и нивоа глукозе, у овом делу истраживања, примећена је баш као што је то био случај у претходним деловима истраживања. Наиме, код животиња третираних алоксаном, телесна маса (246.70 ± 8.82 г), као и ниво глукозе периферне крви (29.93 ± 0.62 mM), статистички се значајно разликују уколико се пореде са вредностима животиња којима није апликован алоксан (277.70 ± 2.30 г; 6.43 ± 0.16 mM) (слика 13).



Слика 13. Промене у вредностима глукозе (А), и телесне масе (Б) изазване дијабетесом. ** P < 0.001, *** P < 0.001.

4.2.1.2. Дејство аденозина на изолованој феморалној артерији пацова

Аденозин ($1 - 100 \mu\text{M}$) је изазвао поредиву концентрацијски зависну релаксацију интактне феморалне артерије добијене од неоперисаних (здравих), као и лажно оперисаних животиња ($E_{\text{макс}} = 117.90 \pm 6.97$; $pEC_{50} = 4.45 \pm 0.27$; $AUC = 113.70 \pm 15.90$; $P > 0,05$). Слични резултати су добијени након одстрањивања

ендотелног слоја ћелија, и то између група неоперисаних и лажно оперисаних животиња ($E_{\max} = 101.00 \pm 2.87$; $pEC_{50} = 3.75 \pm 0.5$; $AUC = 84.70 \pm 9.47$; $P > 0,05$). Као и у претходним деловима истраживања, а у складу са “The 3Rs” принципом и у циљу избегавања непотребног коришћења експерименталних животиња, контролну групу су у даљем току сачињавале само неоперисане (здраве) животиње (Radenković et al., 2012). Овакав приступ је био могућ пошто није детектована статистички значајна разлика у ефектима аденозина на феморалним артеријама здравих и лажно оперисаних животиња.

4.2.1.3. Улога ендотела у релаксантним ефектима аденозина на нивоу феморалне артерије пацова

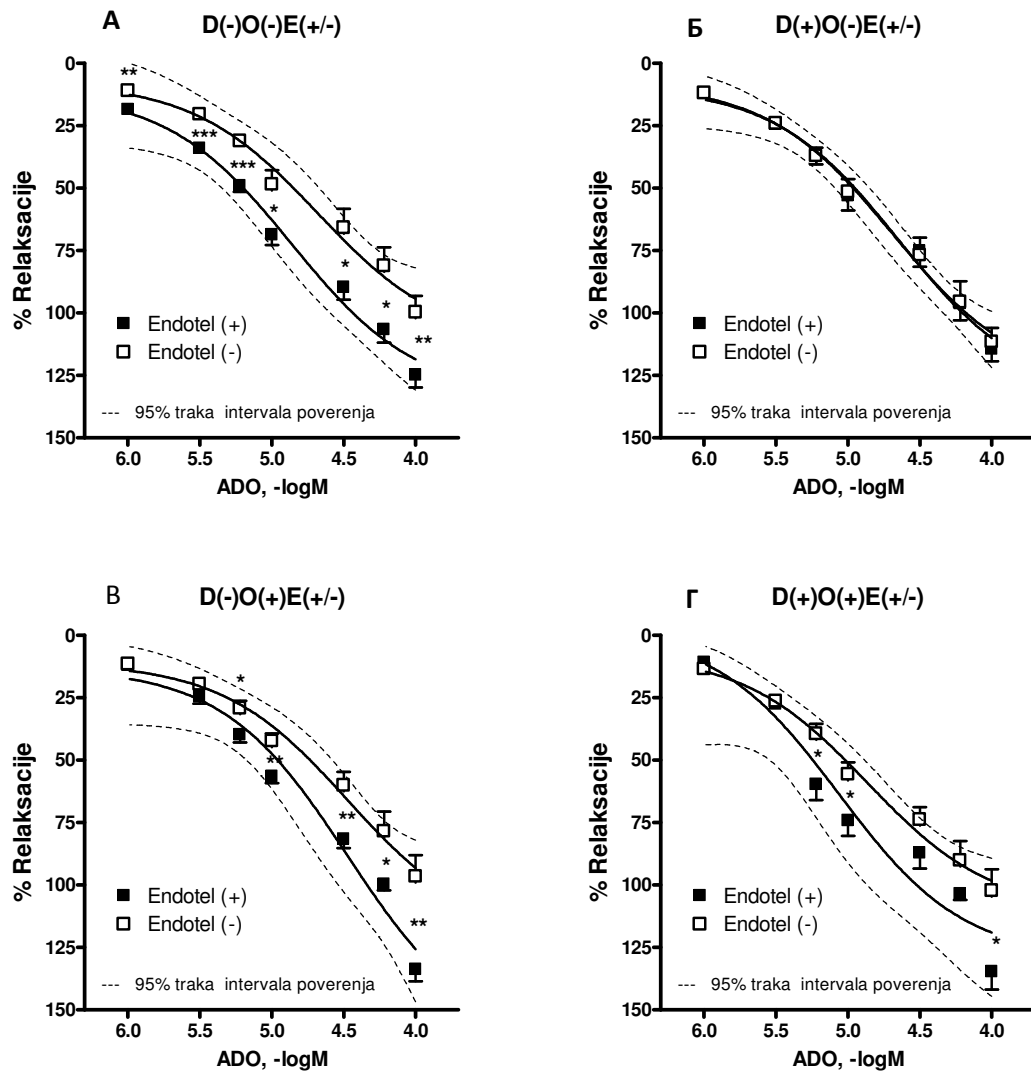
Максимално релаксантно дејство аденозина је било статистички значајно веће на препаратима феморалне артерије пацова са очуваним ендотелом, у односу на препарате на којима је ендотел механички уклоњен ($P < 0.01$) (Табела 10, Слика 14). Овај резултат говори у прилог значајног утицају ендотелних ћелија у процесу релаксације феморалне артерије изазване аденозином. Поред разлике у максималним вредностима, примећена је и статистички значајна разлика у вредностима AUC ($P < 0.01$), али не и у pEC_{50} вредностима ($P > 0.05$) (Табела 10). Код животиња са развијеним дијабетесом разлика у максималним вредностима између препарата са и без ендотела није забележена ($P > 0.05$) (Табела 10, Слика 14). Максималне вредности релаксантног одговора аденозина на препаратима са и без ендотела дијабетичних животиња су скоро индентични као и резултати добијени на препаратима здравих животиња са очуваним слојем ендотелних ћелија. Такође, одстрањивање ендотела у групи дијабетичних животиња није утицало на појаву статистички значајне разлике у вредностима AUC и pEC_{50} . Након оклузије крвних судова, регистрована је статистички значајна разлика у максималним вредностима између релаксација добијених на препаратима феморалне артерије са и без ендотела. Оклузија је довела и до значајне разлике у вредностима AUC ($P < 0.001$) (Табела 10), али не и у pEC_{50} вредностима ($P > 0.05$) (Табела 10). Максимални ефекат аденозина на препаратима са ендотелом у групи животиња којима је извршена оклузија феморалне артерије је био израженији у

односу на максимални ефекат аденозина на препаратима са ендотелом здравих животиња без извршене оклузије. Оклузија феморалне артерије је код животиња са дијабетесом условила појаву статистички значајне разлике у максималним вредностима релаксационог ефекта аденозина, уколико се пореде препарати са и без ендотела ($P < 0.05$) (Табела 10, Слика 14). Разлика је примећена и у вредностима AUC ($P < 0.05$), али не и у pEC_{50} вредностима ($P > 0.05$) (Табела 10, Слика 14).

Табела 10. Релаксација феморалне артерије пацова узете од животиња из различитих група/подгрупа изазвана аденозином.

	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
Са ендотелом			
Здрави	4.64 ± 0.15	124.90 ± 4.98	130.30 ± 5.99
Дијабетични	4.52 ± 0.17	114.50 ± 4.98	106.80 ± 8.05
Оклузија	4.41 ± 0.10	133.90 ± 4.70	114.50 ± 3.23
Дијабетес + оклузија	5.03 ± 0.14	134.80 ± 7.12	129.90 ± 7.11
Без ендотела			
Здрави	4.23 ± 0.26	$99.67 \pm 6.46^{**}$	$92.95 \pm 7.29^{**}$
Дијабетични	4.57 ± 0.12	111.60 ± 5.44	106.40 ± 8.00
Оклузија	4.48 ± 0.09	$96.66 \pm 8.50^{**}$	$86.83 \pm 5.60^{***} \dagger\dagger\dagger$
Дијабетес + оклузија	4.85 ± 0.09	$102.30 \pm 8.48^*$	$106.20 \pm 6.32^*$

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности релаксације (E_{max}) су приказане као проценат преконтракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 5-26$). * $P < 0.01$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ за унутаргрупну компарацију (непарни т-теста). ††† $P < 0.001$ након поређења са резултатима здравих животиња код којих је очуван ендотел (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом).



Слика 14. Релаксација изоловане феморалне артерије пацова изазвана аденозином након одстрањивања ендотела. Васкуларни сегменти су добијани од здравих (А,В) и животиња са дијабетесом (Б,Г). Оклузија феморалне артерије је претходно извршена на насумично изабраним здравим (В) и дијабетичним животињама (Г). Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 5-26$). Вазодилатација изазвана аденозином је приказана као проценат претходне контракције изазване фенилефрином. (---) 95% трака интервала поверења. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ и *** $P < 0.001$.

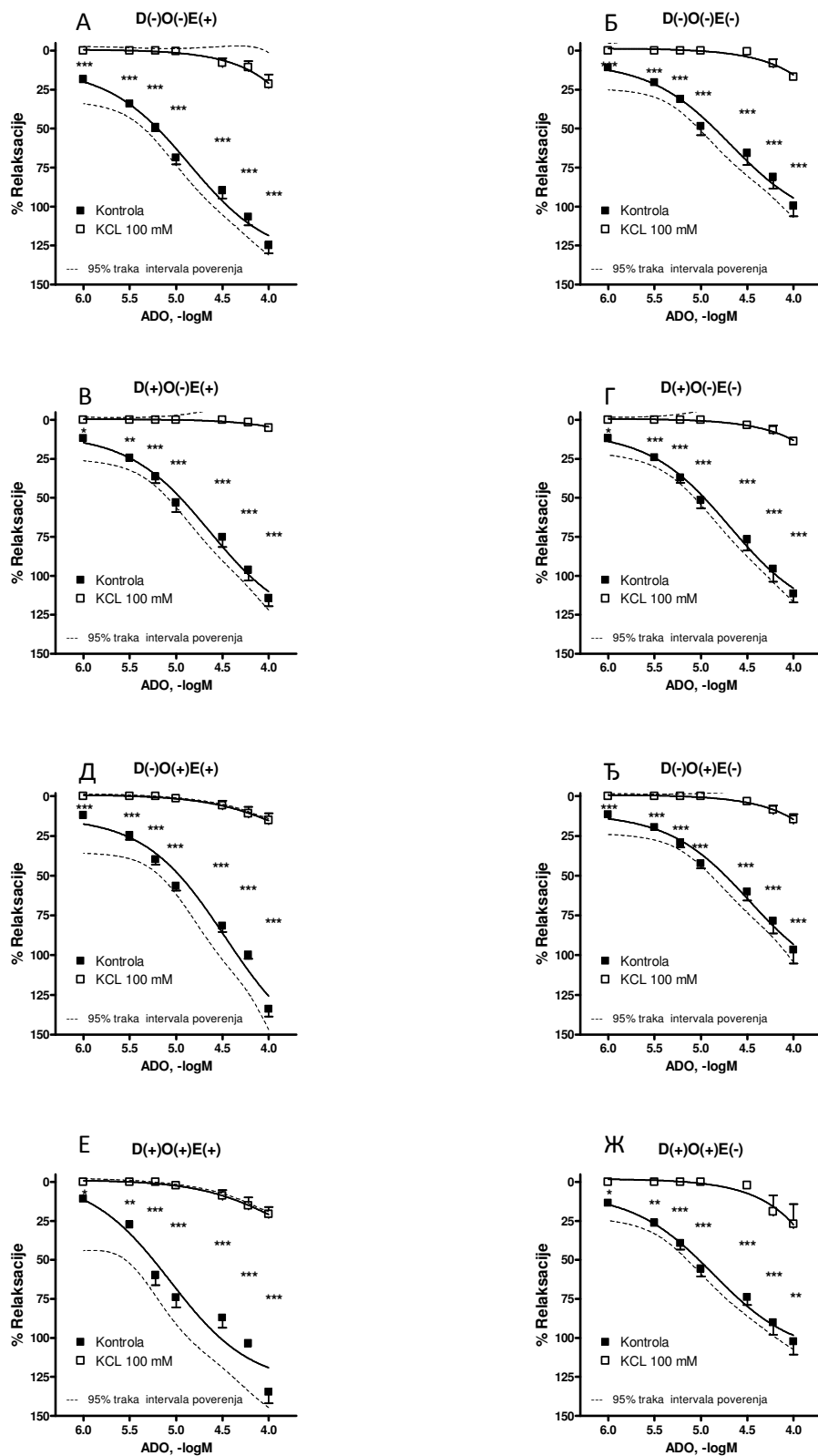
4.2.1.4. Улога трансмембранског протока јона калијума у релаксантним ефектима аденозина на нивоу феморалне артерије пацова

Хиперполаришући раствор доводи до редуције релаксације феморалне артерије изазване аденозином у свим испитиваним групама и подгрупама (Табела 11, слика 15). Максимални релаксантни ефекат аденозина, као и вредности pEC_{50} и AUC су статистички значајно редуковани у односу на одговарајуће контроле. Поређењем вредности $E_{\text{макс}}$, pEC_{50} , као и AUC између препарата са присутним и одстрањеним ендотелом, добијених након примене хиперполаришућег раствора, није примећена статистички значајна разлика. Ипак, треба напоменути да је редуција релаксантног одговора аденозина након примене хиперполаришућег раствора била најизраженија у групи дијабетичних животиња са ендотелом (Табела 11, слика 15).

Табела 11. Релаксација феморалне артерије пацова узете од животиња из различитих група/подгрупа изазвана аденозином у присуству хиперполаришућег раствора.

КСL (100 мМ)	$pEC_{50} \pm S.E.M.$	$E_{max} (\%) \pm S.E.M.$	AUC
Са ендотелом			
Здрави	3.24 ± 0.42 †††	21.44 ± 6.06 †††	8.37 ± 2.88 †††
Дијабетични	1.57 ± 0.10 †††	5.23 ± 0.72 †††	0.98 ± 0.07 †††
Оклузија	2.74 ± 0.57 †††	15.22 ± 4.52 †††	7.27 ± 3.08 †††
Дијабетес + оклузија	3.388 ± 0.61 †††	20.65 ± 4.63 †††	10.35 ± 3.78 †††
Без ендотела			
Здрави	2.0 ± 0.44 †††	16.89 ± 1.45 †††	4.15 ± 0.72 †††
Дијабетични	2.66 ± 0.64 †††	13.84 ± 0.70 †††	4.57 ± 1.57 †††
Оклузија	2.26 ± 0.62 †††	14.74 ± 3.47 †††	5.12 ± 1.60 †††
Дијабетес + оклузија	1.69 ± 0.70 †††	27.06 ± 12.92 †††	8.594 ± 4.02 †††

Концентрација која је неопходна за постизање 50% максималног ефекта (EC_{50}) је приказана као pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Максималне вредности релаксације (E_{max}) су приказане као проценат преконтракције изазване фенилефрином. AUC = област испод криве. Свака вредност представља средњу вредност \pm S.E.M. ($n = 4-6$). ††† $P < 0.001$ након поређења са резултатима здравих животиња код којих је очуван ендотел (АНОВА са Tukey-овим *post hoc* тестом).



Слика 15. Ефекат блокаде трансмембранског протока јона калијума на релаксацију феморалне артерије пацова изазвану аденозином. Вазкуларни прстенови су добијени од здравих (А,Б,Д,Ђ) и животиња са дијабетесом (В,Г,Ж,Е). Додатно је извршена оклузија феморалних крвних судова на насумично одабраним здравим (Д,Ђ) и животињама са дијабетесом (Е,Ж). Свака вредност представља средњу вредност ± S.E.M. (n = 4 – 8). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

5. ДИСКУСИЈА

У првом делу наше студије је испитивно дејство серотонина на изолованој феморалној артерији пацова у различитим групама/подгрупама. Укратко, резултати овог дела наше студије показују да серотонин изаива концентрацијски-зависну контракцију феморалне артерије пацова у свим испитиваним групама/подгрупама. Ова контракција изазвана серотонином је била ендотел-зависна само у групи здравих животиња. Наиме у групи здравих животиња очувани ендотел је потенцирао концентрацијски-зависну контракцију феморалне артерије. Такође, није примећена статистички значајна разлика након поређења добијених контракција на прстеновима без ендотела, како оних узетих од здравих животиња, тако и прстенова осталих група/ подгрупа са и без ендотела. Краткотрајни дијабетес (4 недеље), који је индукован у једној групи експерименталних животиња, довео је до развоја ендотелне дисфункције. Ово је откривено након поређења резултата добијених из групе дијабетичних животиња са додатном, новоформираном групом третираном никотином, за коју знамо да има развијену ендотелну дисфункцију. Такође, vWF, један од маркера ендотелне дисфункције, био је статистички повећан у групи животиња са дијабетесом, као и код животиња третираних никотином, у односу на групу здравих животиња. Додатно је показано да је ендотел-зависни део контракције изазване серотонином настао као последица ослобађања ангиотензина II из ендотела, као и да не зависи од циклооксигеназних продуката арахидонске киселине. У наставку овог дела студије је испитиван утицај калцијума на контракцију феморалне артерије пацова изазвану серотонином. Добијени резултати указују на то да је екстрацелуларни калцијум значајан за ендотел-зависни део серотонинске контракције. Такође, резултати истраживања указују да ангиотензин II, ослобођен од стране ендотелних ћелија након дејства серотонина, највероватније утиче на улазак екстрацелуларног калцијума у глатке мишићне ћелије неким механизмом који није везан за L-тип калцијумових канала. У даљем току испитивања је показано и да је за контракцију индуковану серотонином неопходно ослобађање интрацелуларног калцијума, као и да инкубацијом нифедипина и убаина може да дође до промене у унутарћелијском путу ослобађања овог јона.

Претходно поменути резултати указују на то да серотонин може да изазове концентрацијски- и ендотел-зависну контракцију феморалне артерије здраве

животиње. Ови резултати су у сагласности са чињеницом да ендотелне ћелије имају способност продукције различитих вазоконстрикторних супстанци, које даље могу да контрахују глатке мишићне ћелије крвних судова (Radenković et al., 2013Б). Иако је познато да ендотел може да продукује вазоактивне супстанце, које ће допринети контрактилним дејствима серотонина (Lin et al. 1991; Zhang et al. 1998), ово нису били очекивани резултати, поготово уколико се узме у обзир чињеница да ендотел, много чешће, има протективну улогу којом ограничава контрактилне ефекте серотонина на нивоу васкуларног система (Datté et al. 2005; Parga et al. 2006), или уопште нема никаквог ефекта на контракцију индуковану серотонином (Radenkovic et al. 2010).

Највероватнији разлог за постојање разлике у ефектима серотонин на крвним судовима здравих животиња са ендотелом и осталих група/подгрупа, лежи у чињеници да у осталим групама/подгрупама долази до развоја ендотелне дисфункције. Међутим, треба имати на уму да је у нашим експериментима регистрована разлика само након примене виших концентрација серотонина, док је одговор на серотонин у нижим концентрацијама остао исти или је био умерено измењен након оштећења ендотела. Дакле, ова опсервација би могла потенцијално да искључи претпостављену улогу ендотела у патофизиолошким процесима који воде ка развоју ПАБ, а који зависе од серотонина. Ипак, при тумачењу ових резултата треба имати на уму да су највише концентрације серотонина у нашим експериментима адекватна апроксимација концентрацијама серотонина измереним у периферној циркулацији пацијената са ПАБ (Senol и Es, 2015). Међутим, и поред свега наведеног неопходно је нагласити да је ово само апроксимација, као и да наше резултате треба даље верификовати кроз додатне *in vivo* студије.

Иако су иницијални резултати говорили у прилог развоја ЕД код животиња у току дијабетеса, неопходно је било потврдити присуство ЕД, што смо ми и урадили укључивањем додатне контролне групе, као и испитивањем показатеља ЕД у плазми. Овакав приступ је био неопходан пошто су добијени неуобичајени резултати према којима су последице ЕД биле супротне од онога што је генерално прихваћено и очекивано, а што се кроз наше резултате види као губитак

способности ендотелних ћелија да продукују вазодилаторне супстанце. Стога је у циљу испитивања ЕД уведена додатна контролна група у којој су животиње третиране никотином. Никотински модел ЕД је изабран због везе између хроничног уноса никотина и развоја ПАБ (Jones et al. 2013). Ипак, на овом месту треба нагласити да ендотелна дисфункција изазвана глукозом и никотином немају исти механизам настанка, али да је крајњи исход исти, а то је развој ЕД. Никотин је познат као супстанца која негативно утиче на ендотелну функцију, а његова примена код експерименталних животиња, током периода од 4 недеље, показала се као довољна да изазове ЕД (Luo et al. 2006; Balakumar et al. 2008). Након поређења новодобијених серотонинских концентрацијски-зависних криви из никотинске групе са кривама из других група/подгрупа, може се рећи да су криве међусобно сличне и чак шта више индентичне. Једино је уочена разлика уколико су новодобијене криве поређене са кривама добијеним са препарата здравих животиња на којима је очуван ендотел, а где је контракција била повећана у делу криве са већим концентрацијским опсегом. Ови резултати су додатно потврдили нашу претпоставку да је код животиња које су имале дијабетес током периода од 4 недеље дошло до развоја ендотелне дисфункције. Такође, ови резултати су у складу са резултатима студије Matsumoto et al. (2014) где је контракција серотонином била измењена насталим променама у ендотелној функцији, које су биле изазваним дијабетесом. Ипак треба напоменути да су у овој студији коришћени *Goto-Kakizaki* пацови, као и да је студија изведена након 11 месеци, док је у нашој студији испитиван утицај дијабетеса кратког трајања (4 недеље) на *Wistar* пацовима, где је дијабетес индукован помоћу једне интраперитонеалне ињекције алоксана (Radenkovic et al. 2016 A).

У претходном делу истраживања добијени су резултати, који у функционалном смислу говоре у прилог развоја ЕД. Како би додатно потврдили нашу првобитну претпоставку, концентрација неколико маркера ЕД је мерена у серуму и плазми испитиваних животиња. Ово је било могуће пошто смо имали и групу животиња третирану никотином, која је служила као контролна група, а за коју са сигурношћу можемо да кажемо да има развијену ЕД. Један од коришћених биомаркера у нашој студији је и ADMA, који у ендотелу инхибира азот оксид синтазу (Radenkovic et al. 2016B). Одређивањем концентрације ADMA

представља алтернативу за квантификовање продукције азот оксида, пошто ADMA има способност да блокира азот оксид синтазу, као и транспортни систем који азот оксид синтазу снабдева са L-аргинином (Burger и Touyz, 2012). Резултати наше студије показују да су вредности ADMA у серуму значајно повећане само у групи животиња третираних никотином, док су вредности ADMA у плазми биле готово исте у све три испитиване групе. Иако је код пацијената са дијабетесом пораст ADMA веома добро документован (Krzyzanowska et al. 2008), изостанак скока вредности овог маркера не мора аутоматски да указује да није дошло до развоја ЕД. Тако се на пример оксидативни стрес, који има кључну улогу у развоју ендотелне дисфункције дијабетичких пацијената (Magenta et al. 2014), развија пре него што се скок у вредностима ADMA може и регистровати (Korandji et al. 2011). Ипак, треба напоменути да су насупрот нашим резултатима Lin et al.(2002) показали да код пацова након 4 месеца од појаве дијабетеса долази до скока вредности ADMA у серуму. Највероватније објашњење ове разлике лежи у чињеници да су Lin et al.(2002) користили другачији модел дијабетеса. Тачније, они су користили модел у којем се у комбинацији са ињекцијом стрептозотоцина примењује и дијета са великом уделом масти. У литератури је познато да дијета са великим уделом масти може, независно од других фактора, да доведе до повећања вредности ADMA у циркулацији.

Други биомаркер, такође показатељ ЕД, чија је концентрација одређивана, био је VCAM-1. Овај маркер верно приказује инфламаторни статус повезан са ЕД (Burger и Touyz, 2012). Наши резултати нису показали значајну разлику у вредностима VCAM-1 у серуму или плазми међу испитиваним групама. Иако у нашим резултатима није примећена разлика између вредности VCAM-1 у плазми и серуму здравих и животиња третираних никотином, друге студије су регистровале ову разлику. Тако је након четири недеље примене никотина експресија VCAM-1 у бубрезима била виша у односу на почетак испитивања (Agarwal et al. 2012). Такође, никотин је индуковао експресију овог гена у аорти пацова 4 недеље након његове примене (Rodella et al., 2010). Са друге стране, постоје и студије које говоре у прилог наших резултата. Таква је на пример и студија у којој је LDLR-/- мишевима имплантирана никотинска таблета (5 мг) са продуженим ослобађањем. Тридесет дана након имплантације није дошло до

повећане експресије VCAM-1 гена у аорти. У складу са нашим резултатима су били и резултати у студији у којој се мерила експресија VCAM-1 гена у ткиву ретине животиња са дијабетесом (Noda et al. 2014). У студији Medina-Bravo et al. (2013) није регистрована статистички значајна разлика у серумским вредностима овог маркера између група здравих и дијабетичних животиња, иако су вредности неких других маркера ЕД, попут ИЦАМ-1, биле статистички значајно различите након поређења ове две групе животиња.

Услед немогућности да се на основу мерења вредности претходна два маркера са сигурношћу утврди присуство ЕД, у даљем току наше студије смо такође мерили концентрацију vWF. Концентрација овог гликопротеина је мерена пошто је утврђено да се он може сматрати маркером ЕД. Наиме, због његове повећане продукције од стране ендотелних ћелија регистроване након њиховог оштећења, овај маркер се убраја у показатеље ЕД (Burger & Touyz, 2012). Резултати наше студије су показали да су вредности vWF биле повећане у групама дијабетичних, као и никотином-третираних животиња, у односу на групу здравих животиња. Повишен ниво vWF је био очекиван у групи дијабетичних животиња пошто се зна да у току дијабетеса може доћи до развоја дифузних оштећења ендотела. Ови резултати нас додатно наводе на закључак да је такође дошло до развоја ЕД и код наших експерименталних животиња. Такође, ови резултати нам говоре да је највероватније динамика појављивања маркера ЕД различита, односно да се маркери ЕД не појављују у исто време, као и да иницијално долази до функционалних промена у ендотелу пре појаве наведених маркера у циркулацији.

Пошто је у претходном делу студије присуство ЕД адекватно испитано, у даљем делу истраживања смо желели да проверимо да ли оштећење ендотела у коришћеним експерименталним моделима превазилази, уско посматрано, функционални поремећај ендотелних ћелија. У циљу даљег испитивања васкуларног оштећења мерене су концентрације CCL5. Повишене вредности овог биомаркера су повезане са прогресијом атеросклерозе, услед њеног утицаја на повећање акумулације макрофага, неointимални раст, као и повећану продукцију хемокина од стране моноцита (Mason et al., 2015). Наши резултати нису показали

значајну разлику након мерења овог хемокина у серуму, без обзира на експерименталну групу. Са друге стране, вредности овог хемокина су биле повећане у серуму дијабетичних животиња, док су код здравх и животиња третираних никотином вредности овог маркера остале непромењене. Једна од интерпретација ових резултата може се повезати са убрзаном прогресијом атеросклерозе код дијабетичних животиња. Друга интерпретација се односи на познату корелацију овог хемокина са вредностима гликемије, као и вредностима гликозилираног хемоглобина (Dworacka et al. 2014). Међутим, како је до скока дошло само код дијабетичних животиња, док код животињама третираних никотином овај скок није примећен, прихватљивије је друго објашњење да је код дијабетичних животиња дошло до скока овог хемокина услед метаболичких промена у дијабетесу.

У следећем делу истраживања желели смо да испитамо који ендотелни фактор доприноси вазоконстрикторном дејству серотонина на нивоу феморалне артерије. Како ендотел има способност да синтетише тромбоксан A_2 (продукт циклооксигеназног пута арахидонске киселине), једна од идеја у даљем раду је била да се блокира циклооксигеназа, поготово уколико се узме у обзир чињеница да овај ензимски пут арахидонске киселине може бити укључен у вазоконстрикторна дејства серотонина (Radenković et al., 2010; Kanagy et al., 1996). У циљу блокаде циклооксигеназе смо у органским купатилима инкубирали индометацин. Након инкубације индометацина, једино је у подгрупи здравих животиња, којима је оклудирана феморална артерија, примећена статистички значајна разлика у добијеним резултатима у односу на резултате са адекватном контролом. Наиме, у овој групи је након инкубације индометацина дошло до парадоксалног појачања контракције изазване серотином. Међутим, на препаратима здравих животиња на којима је очуван ендотел, индометацин није довео до значајније промене у дејствима серотонина. Овај резултат нам указује да тромбоксан A_2 није укључен у ендотелни део контракције феморалне артерије индуковане серотином. Такође, добијени резултати из подгрупе здравих животиња, којима је додатно оклудирана феморална артерија, указују нам на протективну улогу метаболичких продуката циклооксигеназног пута арахидонске киселине. Добијени резултати нису у сагласности са истраживањима, која говоре

у прилог потенцирању вазоконстрикторних ефекта серотонина од стране продуката циклооксигеназе (Radenković et al., 2010). Такође, интересантно је да у ранијој студији са хипертензивним пацовима индометацин блокирао ефекте серотонина, што у нашим резултатима није био случај (Kanagy et al., 1996). За разумевање наших резултата мора се узети у обзир чињеница да одређени циклооксигеназни продукти арахидонске киселине могу да утичу и на вазодилатацију крвних судова (Ruan et al. 2010), као и да је након оклузије феморалне артерије највероватније дошло до активације овог пута. Ово је довело до тога да се плато контракције, у овој подгрупи, одржи на истом нивоу као код здравих животиња. Наведене претпоставке је ипак потребно додатно испитати.

С обзиром на то да продукти циклооксигеназног пута арахидонске киселине не учествују у ендотелном делу контракције изазване серотонином, наш следећи корак је био усмерен ка испитивању потенцијалне улоге ангиотензина II у овом процесу. За ангиотензин II се зна да има вазоконстрикторно дејство, као и да ендотелне ћелије могу да га синтетишу (Radenkovic et al. 2016 B). У овом делу експеримената смо у органском купатилу инкубирали лосартан, блокатор ангиотензинских AT1 рецептора. Добијени резултати, након инкубације лосартана, указују да је ангиотензин II ендотелни продукт који у нашем испитивању доприноси васкуларним ефектима серотонина, пошто је контракција индукована серотонином на крвним судовима здравих животиња са очуваним слојем ендотелних ћелија била статистички нижа након инкубације лосартана. Како у другим групама/подгрупама лосартан није проузроковао значајнију разлику у резултатима, можемо претпоставити да настала ЕД спречава продукцију ангиотензина II од стране ендотелних ћелија након дејства серотонина. Ово се може сматрати веома битним протективним механизмом са клиничким значајем за пацијенте са ПАБ, с обзиром на постојање повећане концентрације серотонина у периферној крви (Senol и Es, 2015). Такође, ово сазнање по свом значају превазилази досадашња сазнања о ефектима серотонина на нивоу крвних судова у ПАБ, пре свега узимајући у обзир чињеницу да серотонин потенцира пролиферацију глатких мишићних ћелија изазвану ангиотензином II, а што је уједно и један од кључних процеса у развоју атеросклерозе (Watanabe et al. 2001 A; Watanabe et al. 2001 B).

Након испитивања улоге ендотела у дејствима серотонина, циљеви нашег истраживања су били преусмерени у правцу испитивању улоге јона калцијума у овом преоцесу. За ова испитивања су у органском купатилу били инкубирани нифедипин и убаин, појединачно као и у комбинацији, а такође је ефекат серотонина испитиван у Кребс-Рингеровом хранљивом медијуму без калцијума.

Како би се испитао утицај екстрацелуларног калцијума у ефектима серотонина на нивоу феморалне артерије, Кребс-Рингеров раствор је замењен са модификованим Кребс-Рингеровим раствором у коме није било јона калцијума. Добијени резултати су говорили у прилог томе да је екстрацелуларни калцијум неопходан за ендотел-зависни део серотонинске контракције. Узимајући у обзир ове резултате, као и резултате из претходног дела истраживања о улози ендотела, можемо претпоставити да серотонин активира ендотелне ћелије феморалне артерије са последичним ослобађањем ангиотензина II и додатном контракцијом феморалне артерије, за коју је показано да је неопходан екстрацелуларни калцијум. Изостанак редукције максималног контрактилног ефекта након замене хранљивог раствора у осталим испитиваним групама/подгрупама говори у прилог учешћа интрацелуларног калцијума у процесу контракције феморалне артерије. Ови резултати су такође у складу са другим студијама у којима серотонин доводи до контракције крвних судова захваљујући ослобађању интрацелуларног калцијума (Wylam et al., 1993; Hu и Dyer, 1997; Sugai et al., 1999).

У даљем раду је додатно евалуирано учешће екстрацелуларног калцијума у контракцији изазваној серотонином, односно испитиван је пут уласка калцијума у ћелију. Са тим у вези, у органском купатилу за изоловане органе је инкубиран нифедипин, који се преодминантно сматра блокатором L-типа калцијумских канала. Очекивало се да након инкубације нифедипина добијемо исте резултате попут оних добијених након одстрањивања калцијума из хранљивог раствора. Међутим, у групи здравих животиња са очуваним ендотелом нифедипин није довео до редукције контракције феморалне артерије изазване серотонином, као што је то био случај након примене раствора без калцијума. Ови резултати нам указују на то да контракција изазвана ангиотензином, кога продукују ендотелне ћелије услед дејства серотонина, не зависи од L-типа калцијумских канала.

Тачније, калцијум у овом случају улази неким другим путем у глатке мишићне ћелије феморалне артерије. Могуће је да калцијум у глатке мишићне ћелије улази преко натријум/калцијум размењивача или захваљујући рецепторима осетљивим на калцијум (*Ca-sensing receptor - CaSR*). Једно од могућих објашњења ових резултата је и да ангиотензин II, који се ослобађа из ендотелних ћелија, утиче на те исте ћелије и проузрокује даље ослобађање ендотелина, такође снажног вазоконстриктора. У даљем току овог процеса, ендотелин може утицати на натријум/калцијум размењивач (Pérez et al., 2003). Такође, добијени резултати се могу објаснити и чињеницом да су рецептори осетљиви на калцијум експримирани на глатким мишићним ћелијама (Smajilovic et al., 2011), као и да реагују на промене у екстрацелуларној концентрацији калцијума (Qu et al., 2016). У даљем току нашег истраживања, након одстрањивања ендотела и додавања нифедипина, примећена је редукција контракција феморалне артерије индуковане серотонином. Овај резултат указује да нифедипин утиче на интрацелуларни пут калцијума у одсуству ендотелног слоја ћелија. Иако ово није био очекивани резултат на почетку нашег истраживања, позната је чињеница да нифедипин може утицати на интрацелуларне депое калцијума, као и на ослобађање калцијума из њих (Raicu и Florea, 2001). Још израженија редукција је примећена у групи дијабетичних животиња у односу на групу здравих животиња након одстрањивања ендотела. Израженија редукција контракције феморалне артерије изазване серотонином у групи дијабетичних животиња највероватније је настала услед измене у унутарћелијском сигналном путу калцијума, која се развија у присуству дијабетеса (Searls et al., 2010). Такође, у дијабетесу долази до промена у мобилизацији калцијума од стране ендоплазматичног ретикулума глатких мишићних ћелија (Ma et al., 2007). Ова промена у унутарћелијском протоку јона калцијума није специфична само за глатке мишићне ћелије, већ се дешава и у ендотелним ћелијама, као и у кардиомиоцитима (Sheikh et al., 2012). У нашим експериментима оклузија није довела до промене у унутарћелијском протоку јона калцијума, као што је то регистровано на крвним судовима дијабетичних животиња. Сличан ефекат нифедипина је регистрован и након оклузије феморалне артерије дијабетичних животиња. Претходно описани резултати сугеришу да нифедипин утиче на контрактилно дејство серотонина на нивоу

феморалне артерије мењајући интрацелуларни проток јона калцијума. Овај ефекат изостаје у присуству ендотела, што највероватније значи да ендотел продукује факторе који олакшавају улазак калцијума у глатке мишићне ћелије. Протективни ефекти ендотела, у односу на утицај нифедипина на васкуларне ефекте серотонина, могу објаснити изостанак позитивних ефеката у клиничким студијама у којима је испитивана примена нифедипина у терапији ПАБ (Solomon et al., 1991; Roberts et al., 1992; Chacón-Quevedo et al., 1994).

Након серије експеримената са нифедипином, у органско купатило је инкубиран убаин, са циљем да се испита улога блокаде натријум / калијум АТПазе у дејствима серотонина, у односу на проток калцијумових јона унутар глатких мишићних ћелија. Убаин се сматра ендогеним кардиотоничним стероидним хормоном, који се синтетише у адреналном кортексу (Hamlyn et al., 2016). Сматра се да је убаин укључен у регулацију крвног притиска (Hamlyn et al., 2013). Убаин је у овом делу експеримената коришћен са идејом да блокира улазак екстрацелуларног калцијума у ћелију, пошто једна од хипотеза о његовом деловању говори у прилог блокаде натријум / калијум АТПазе, после чега се вишак натријума задржава у ћелији (Hauck et al., 2012). Овај вишак натријума се у даљем процесу размењује за калцијум помоћу натријум / калцијум размењивача, који се у овом случају активира у супротном смеру (ефлукс натријум уз инфлукс калцијума) (Hauck et al., 2012). Цео овај процес треба да резултира порастом интрацелуларне концентрације калцијума.

Узимајући у обзир претходну хипотезу, очекивали смо резултате сличне онима добијеним након одстрањивања калцијума из хранљивог медијума. Међутим, већ током испитивања на здравим животињама могло се приметити одскакање од очекиваних резултата. Тако је на крвним судовима здравих животиња, на којима је очуван ендотел, убаин проузроковао израженију редукцију контракције изазване серотонином у односу ону добијену после примене Кребс Рингеровог раствора без калцијума. Ови резултати указују да убаин потенцијално утиче на глатке мишићне ћелије, али и на ендотел. Може се ипак претпоставити да убаин утиче преодминантно на глатке мишићне ћелије. Супротно резултатима који су добијени након примене раствора без калцијума,

уабаин је значајно редуковао контракцију изазвану серотонином на препаратима са одстрањеним ендотелом. Ова редукација је била израженија у односу на редукацију контракције регистровану на препаратима са ендотелом. Добијени резултати нам говоре да је након инкубације уабаина, исто као и након инкубације нифедипина, дошло до промена у унутарћелијском протоку јона калцијума. Овакви резултати нису неочекивани пошто се зна да је могуће да уабаин утиче и на друге путеве уласка калцијума у глатке мишићне ћелије, као и да тачан механизам дејства уабаина није у потпуности познат (Nauck et al., 2012). Додатно, након одстрањивања ендотела код дијабетичних животиња уабаин утиче на криву индуковану серотонином на сличан начин, као што је то био случај након инкубације нифедипина. Ово нам, као и у случају са нифедипином, додатно потврђује да дијабетес утиче на интрацелуларни метаболички пут калцијума. Процес васкуларне оклузије није утицао на испитиване ефекте серотонина у присуству уабаина. Такође, разлика која је примећена код дијабетичних животиња изостаје након што се дијабетичним животињама подвезу крвни судови. Ови резултати сугеришу да дијабетес и васкуларна оклузија утичу на различите изворе калцијума и/или путеве уласка калцијума у глатку мишићну ћелију, независно од уабаина.

Пошто су у досадашњем току експеримената испитивана појединачна дејства уабаина и нифедипина, даљи циљ је био да се утврди да ли постоји кумулативни ефекат након истовремене инкубације ове две супстанце. Иницијално је очекивано да ће овакав поступак изазвати израженију редукацију контракције, поготову у групи дијабетичних животиња којима није подвезана феморална артерија. Добијени резултати нису били у складу са предвиђањима, јер је значајна редукација једино регистрована код здравих животиња, док је очекивана редукација код дијабетичних животиња изостала. До овог тренутка, барем колико је нама познато, у литератури не постоји објашњење у односу на добијене резултате. Можемо само претпоставити да коришћени блокатори, на неки начин утичу један на другог, спречавајући тако појединачна дејства.

У последњем делу спроведеног истраживања, желели смо да испитамо дејства аденозина на нивоу феморалне артерије, у експерименталним моделима

дијабетеса и/или оклузије. Наиме, како се аденозин у повећаном степену ослобађа у току различитих патолошких стања, као што је нпр. оклузија крвних судова, са циљем заштите органа дистално од места оклузије, постоји тенденција да се овај молекул обимније испитује и у већој мери користи у терапијске сврхе (Radenković et al., 2013).

Сумарно, у нашем истраживању примена растућих концентрација аденозина узроковала је концентрацијски-зависну релаксацију преконтрахованих феморалних артерија, и то у свим испитиваним групама/подгрупама. Релаксација је била зависна од ендотела, изузев у групи дијабетичних животиња. Након механичког уклањања ендотела у осталим групама долази до редуције у релаксантном одговору феморалне артерије. Изузетак су дијабетичне животиње код којих је након уклањања ендотела максимални релаксантни ефекат аденозина био скоро индентичан у односу на онај добијен на препаратима са ендотелом. Ови резултати највероватније указују да се у току дијабетеса формира протективни механизам, који појачава релаксацију на препаратима на којима је одстрањен ендотел. Међутим, оклузија феморалних артерија животиња са дијабетесом проузрокује реверзију учешћа и доприноса ендотелних ћелија у релаксантном одговору испитиваног крвног суда према аденозину. Такође, показано је да трансмембрански проток јона калијума има значајну улогу у релаксантном дејству аденозина на нивоу феморалне артерије, независно од присуства ендотела или испитиваног патолошког стања.

У претходним студијама у којима је испитивано дејство аденозина на нивоу аорте, доње мезентеричне артерије и каротидне артерије, примећено је да аденозин изазива концентрацијски-зависну и ендотел-независну релаксацију ових крвних судова (Grbović et al., 2003; Radenković et al., 2005; Radenković et al., 2013). Такође, у експериментима на каротидној артерији пацова, дијабетес није довео до функционалних промена ендотелних ћелија, које би утицале на релаксантни одговор према аденозину (Radenković et al., 2013). Насупрот овим резултатима, резултати на феморалним крвним судовима пацова, које смо добили у нашем истраживању, указују да ендотел има значајну улогу у релаксантном одговору према аденозину. Такође је показано да дијабетес кратког трајања

проузрокује извесне промене, које доприносе појачању ефеката аденозина након уклањања ендотела. Ово је у складу са већим бројем студија, које говоре у прилогу чињенице да се током дијабетеса дешавају промене, које утичу на ефекте различитих ендогених супстанци са вазодилататорним дејством (Abebe, 2008; Fahim et al., 2001; Shi et al., 2006; Wigg et al., 2001; Yousif et al., 2005). Узимајући у обзир да се у дијабетесу након механичког уклањања ендотела максимални релаксантни ефекат феморалне артерије према аденозину статистички не разликује у односу на максимални ефекат регистрован на препаратима са ендотелом, можемо да претпоставимо да ендотелна компонента у дејству аденозина највероватније бива инхибирана патолошким дејством дијабетеса, али да се у исто време активира протективни механизам на нивоу мишићног слоја феморалне артерије, чиме се релаксација одржава на истом нивоу, као и код препарата са ендотелом добијених од здравих животиња.

Након оклузије феморалних крвних судова, аденозин изазива сличне ефекте као код здравих животиња. Тачније, додавањем растућих концентрација аденозина, региструје се концентрацијски- и ендотел-зависна релаксација. Такође, након оклузије феморалних крвних судова дијабетичних животиња, примећује се функционална зависност у одговору феморалне артерије према дејствима аденозина у односу на присуство ендотела. Међутим, у овом случају зависност од ендотелних ћелија није била изражена као код здравих животиња, или пак здравих животиња којима је додатно подвезана феморална артерија.

У другом делу испитивања релаксантног ефекта аденозина на нивоу феморалне артерије, од интереса је било утврдити улогу трансмембранског протока калијумових јона у овим процесима. Трансмембрански проток калијумових јона је на многим крвним судовима од примарног значаја за процес вазодилатације узрокован аденозином (Kedzior et al., 2009). Наиме, аденозин активира аденозинске рецепторе, а као последица њихове активације долази до стварања интрацелуларних секундарних гласника и отварања различитих калијумових јонских канала, или у неким случајевим до активације натријум / калијум АТПазе (Radenković et al., 2005). Излазак калијумових јона из ћелије доводи до хиперполаризације ћелијске мембране, што даље редукује проток

калцијумових јона кроз волтажно-зависне калцијумове канале (Heaps et al., 1985). На овај начин долази до релаксације крвних судова.

Након активације аденозинских рецептора, различити типови калијумових канала могу бити активирани. Тако на пример на нивоу аорте пацова, аденозин доводи до отварања волтажно-зависних, као и АТП-зависних калијумових канала (Arsyad et al., 2016). Калцијум-зависни, као и калијумови канали зависни од АТП су укључени у релаксантне ефекте аденозина на нивоу доње мезентеричне артерије (Radenković et al., 2005). Калијумови канали са унутрашњом исправљачком активношћу су укључени у релаксантне одговоре пијалне артерије свиње према аденозину (Hein et al., 2013). Међутим, како би се испитала блокада трансмембранског протока калијумових јона органско купатило може бити испуњено модификованим Кребс-Рингеров бикарбонатним раствором са високом концентрацијом калијумових јона (100 mM) (Radenković et al., 2013). На овај начине се блокирају сви типови калијумових канала, стога се може добити слика о свеукупном учешћу трансмембранског протока калијумових јона у релаксантним ефектима аденозина (Radenković et al., 2013). У нашим експериментима, добијени резултати указују да у присуству високе концентрације калијумових јона долази до скоро потпуне блокаде релаксације феморалне артерије у свим испитиваним групама/подгрупама индуковане аденозином. Добијени резултати су у складу са резултатима добијеним у претходним студијама у којима је испитиван трансмембрански проток калијумових јона (Radenković et al., 2013).

6. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата, а у складу са постављеним циљевима овог истраживања, могу се извести следећи закључци:

I. Испитивање дејства серотонина на нивоу феморалне артерије пацова у физиолошким условима, као и у патолошким стањима дијабетеса и/или оклузије феморалне артерије у трајању од 45 минута.

1. Серотонин изазива контракцију феморалне артерије, која је зависна од концентрације серотонина, а код здравих животиња и од присуства очуваног ендотела. Зависност од ендотела не постоји у патолошким стањима дијабетеса и/или оклузије феморалне артерије.
2. Метаболички продукти циклооксигеназног пута арахидонске киселине нису укључени у контрактилне ефекте серотонина на нивоу феморалне артерије. Међутим, овај метаболички пут има протективну улогу у спречавњу прекомерне контракције феморалне артерије серотонином након оклузије ових крвних судова.
3. Део контракције узроковане серотонином, који зависи од ендотела је посредован ангиотензином II, који се ослобађа из ендотела под дејством серотонина.
4. Екстрацелуларни калцијум је неопходан за удео контракције феморалне артерије изазване серотонином, који зависи од ендотела, али само у групи здравих животиња.

5. Након одстрањивања ендотела, нифедипин (блокатор Л-типа калцијумских канала) значајно утиче на интрацелуларни проток јона калцијума, који је детектован у глатким мишићима феморалне артерије током дејства серотонина. Ове промене настају код здравих, као и код животиња са дијабетесом, али не и након оклузије феморалне артерије.

6. Убаин (блокатора натријум / калијум АТПазе) мења унутарћелијски проток калцијумових јона, слично нифедипину, са том разликом што код здравих животиња ендотел не утиче на ефекте убаина, као што је то показано са нифедипином.

7. Истовремена примена нифедипина и убаина редукује контракцију феморалне артерије само у групи здравих животиња, док у осталим групама изостају ефекти на контракцију серотонином, који су детектовани током појединачне примене ових блокатора.

II. Испитивање дејства аденозина на нивоу феморалне артерије пацова у физиолошким условима, као и у патолошким стањима дијабетесе и/или оклузије феморалне артерије у трајању од 45 минута.

1. Аденозин изазива релаксацију феморалне артерије, која је зависна од примењене концентрације. Ендотел има значајну улогу у процесу релаксације феморалне артерије аденозином у групи здравих животиња, као и у групи животиња у којој је додатно извршена оклузија феморалне артерије у периоду од 45 минута.

2. Јони калијума имају битну улогу у регулацији процеса релаксације феморалне артерије аденозином, што је у највећем степену забележено код дијабетичних животиња са очуваним ендотелом.

III. Значај краткотрајног дијабетеса (4 недеље) као експерименталног модела у обављеном испитивању.

1. Експериментални дијабетес изазван алоксаном доводи до настанка ендотелне дисфункције у временском периоду од 4 недеље.
2. Спроведеним експериментима је утврђено да се дијабетес изазван алоксаном у трајању од 4 недеље може користити као валидан експериментални модел ендотелне дисфункције изазване хипергликемијом.
3. Краткотрајни дијабетес (4 недеље) изазван алоксаном значајно утиче на унутарћелијски проток јона калцијума у експерименталном моделу изолованих крвних судова.

7. ЛІТЕРАТУРА

Abebe W. Effects of taurine on the reactivity of aortas from diabetic rats. *Life Sci.* 2008 Jan 30;82(5-6):279-89. doi: 10.1016/j.lfs.2007.11.012. Epub 2007 Dec 4. PubMed PMID: 18174109.

Agarwal PK, van den Born J, van Goor H, Navis G, Gans RO, Bakker SJ. Renoprotective effects of long-term oral nicotine in a rat model of spontaneous proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Apr 1;302(7):F895-904. doi: 10.1152/ajprenal.00507.2011. Epub 2012 Jan 4. PubMed PMID: 22218593.

Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol.* 2011 Nov;164 Suppl 1:S1-324. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01649_1.x. PubMed PMID: 22040146; PubMed Central PMCID: PMC3315626.

Arsyad A, Dobson GP. Adenosine relaxation in isolated rat aortic rings and possible roles of smooth muscle Kv channels, KATP channels and A2a receptors. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2016 May 23;17(1):23. doi: 10.1186/s40360-016-0067-8. PubMed PMID: 27211886; PubMed Central PMCID: PMC4876563.

Armstrong EJ, Waltenberger J, Rogers JH. Percutaneous coronary intervention in patients with diabetes: current concepts and future directions. *J Diabetes Sci Technol.* 2014 May;8(3):581-9. doi: 10.1177/1932296813517058. Review. PubMed PMID: 24876623; PubMed Central PMCID: PMC4455433. E

Armstrong EJ, Chen DC, Westin GG, Singh S, McCoach CE, Bang H, Yeo KK, Anderson D, Amsterdam EA, Laird JR. Adherence to guideline-recommended therapy is associated with decreased major adverse cardiovascular events and major adverse limb events among patients with peripheral arterial disease. *J Am Heart Assoc.* 2014 Apr 10;3(2):e000697. doi: 10.1161/JAHA.113.000697. PubMed PMID: 24721799; PubMed Central PMCID: PMC4187469.

American Diabetes Association. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care.* 2003 Dec;26(12):3333-41. Review. PubMed PMID: 14633825.

Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK. Management of patients with peripheral artery disease (compilation of 2005 and 2011

ACCF/AHA guideline recommendations): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2013 Apr 2;127(13):1425-43. doi: 10.1161/CIR.0b013e31828b82aa. PubMed PMID: 23457117.

Ankle Brachial Index Collaboration., Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, Heald CL, Lee RJ, Chambless LE, Folsom AR, Hirsch AT, Dramaix M, deBacker G, Wautrecht JC, Kornitzer M, Newman AB, Cushman M, Sutton-Tyrrell K, Fowkes FG, Lee AJ, Price JF, d'Agostino RB, Murabito JM, Norman PE, Jamrozik K, Curb JD, Masaki KH, Rodríguez BL, Dekker JM, Bouter LM, Heine RJ, Nijpels G, Stehouwer CD, Ferrucci L, McDermott MM, Stoffers HE, Hooi JD, Knottnerus JA, Ogren M, Hedblad B, Wittteman JC, Breteler MM, Hunink MG, Hofman A, Criqui MH, Langer RD, Fronck A, Hiatt WR, Hamman R, Resnick HE, Guralnik J, McDermott MM. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA*. 2008 Jul 9;300(2):197-208. doi: 10.1001/jama.300.2.197. Review. PubMed PMID: 18612117; PubMed Central PMCID: PMC2932628.

Balakumar P, Sharma R, Singh M. Benfotiamine attenuates nicotine and uric acid-induced vascular endothelial dysfunction in the rat. *Pharmacol Res*. 2008 Nov-Dec;58(5-6):356-63. doi: 10.1016/j.phrs.2008.09.012. Epub 2008 Oct 2. PubMed PMID: 18951979.

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002 May 15;287(19):2570-81. Review. PubMed PMID: 12020339.

Bierhaus A, Nawroth PP. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia*. 2009 Nov;52(11):2251-63. doi: 10.1007/s00125-009-1458-9. Review. PubMed PMID: 19636529.

Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Jul;72(13):2475-89. doi: 10.1007/s00018-015-1876-4. Review. PubMed PMID: 25746430.

Bonaca MP, Gutierrez JA, Creager MA, Scirica BM, Olin J, Murphy SA, Braunwald E, Morrow DA. Acute Limb Ischemia and Outcomes With Vorapaxar in Patients With Peripheral Artery Disease: Results From the Trial to Assess the Effects of Vorapaxar in

Preventing Heart Attack and Stroke in Patients With Atherosclerosis-Thrombolysis in Myocardial Infarction 50 (TRA2°P-TIMI 50). *Circulation*. 2016 Mar 8;133(10):997-1005. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019355. PubMed PMID: 26826179.

Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens*. 2012 Mar-Apr;6(2):85-99. doi: 10.1016/j.jash.2011.11.003. Epub 2012 Feb 9. Review. PubMed PMID: 22321962.

Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications*. 2001 Jan-Feb;15(1):44-54. Review. PubMed PMID: 11259926.

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:521-55. Review. PubMed PMID: 11031246.

Chacón-Quevedo A, Eguaras MG, Calleja F, Garcia MA, Roman M, Casares J, Muñoz I, Concha M. Comparative evaluation of pentoxifylline, buflomedil, and nifedipine in the treatment of intermittent claudication of the lower limbs. *Angiology*. 1994 Jul;45(7):647-53. PubMed PMID: 8024164.

Conde ID, Erwin PA. Evaluation of the patient who presents with critical limb ischemia: diagnosis, prognosis, and medical management. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2014 Sep;17(3):140-6. doi: 10.1053/j.tvir.2014.08.002. Review. PubMed PMID: 25241314.

Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res*. 2015 Apr 24;116(9):1509-26. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303849. Review. Erratum in: *Circ Res*. 2015 Jun 19;117(1):e12. PubMed PMID: 25908725.

Datté JY, Yapo PA, Offoumou MA. Nitric oxide effect on 5-hydroxytryptamine-induced vasoconstrictions of isolated smooth muscle. *Pharmacol Rep*. 2005 Jan-Feb;57(1):113-20. PubMed PMID: 15849385.

Davies JH, Richards J, Conway K, Kenkre JE, Lewis JE, Mark Williams E. Primary care screening for peripheral arterial disease: a cross-sectional observational study. *Br J Gen Pract*. 2017 Feb;67(655):e103-e110. doi: 10.3399/bjgp17X689137. PubMed PMID: 28126882; PubMed Central PMCID: PMC5308116.

De Backer T, Vander Stichele R, Leher P, Van Bortel L. Naftidrofuryl for intermittent claudication: meta-analysis based on individual patient data. *BMJ*. 2009 Mar 10;338:b603. doi: 10.1136/bmj.b603. Review. PubMed PMID: 19276131; PubMed Central PMCID: PMC2659292.

De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000 Jul;130(5):963-74. Review. PubMed PMID: 10882379; PubMed Central PMCID: PMC1572156.

Deussen A, Stappert M, Schäfer S, Kelm M. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation*. 1999 Apr 20;99(15):2041-7. PubMed PMID: 10209010.

Dick F, Diehm N, Galimanis A, Husmann M, Schmidli J, Baumgartner I. Surgical or endovascular revascularization in patients with critical limb ischemia: influence of diabetes mellitus on clinical outcome. *J Vasc Surg*. 2007 Apr;45(4):751-61.

Dworacka M, Krzyżagórska E, Iskakova S, Bekmukhambetov Y, Urazayev O, Dworacki G. Increased circulating RANTES in type 2 diabetes. *Eur Cytokine Netw*. 2014 Jul-Sep;25(3):46-51. doi: 10.1684/ecn.2014.0355. PubMed PMID: 25373852.

European Stroke Organisation., Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, Baumgartner I, Clément D, Collet JP, Cremonesi A, De Carlo M, Erbel R, Fowkes FG, Heras M, Kownator S, Minar E, Ostergren J, Poldermans D, Riambau V, Roffi M, Röther J, Sievert H, van Sambeek M, Zeller T; ESC Committee for Practice Guidelines.. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011 Nov;32(22):2851-906. doi: 10.1093/eurheartj/ehr211. PubMed PMID: 21873417.

Fahim M, Hussain T, Mustafa SJ. Relaxation of rat aorta by adenosine in diabetes with and without hypertension: role of endothelium. *Eur J Pharmacol*. 2001 Jan 19;412(1):51-9. PubMed PMID: 11166736.

Flood A, Headrick JP. Functional characterization of coronary vascular adenosine receptors in the mouse. *Br J Pharmacol*. 2001 Aug;133(7):1063-72. PubMed PMID: 11487517; PubMed Central PMCID: PMC1572876.

Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol Rev*. 2007 Apr;87(2):593-658. Review. PubMed PMID: 17429043; PubMed Central PMCID: PMC2901638.

Froldi G, Nicoletti P, Caparrotta L, Ragazzi E. 5-HT receptors mediating contraction in the rat-tail artery. *Adv Exp Med Biol*. 2003;527:665-70. PubMed PMID: 15206788.

Fukumoto H, Naito Z, Asano G, Aramaki T. Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 1998;5(1):29-35. PubMed PMID: 10077455.

Fujiwara T, Chiba S. Augmented responses to 5-HT₂-receptor-mediated vasoconstrictions in atherosclerotic rabbit common carotid arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995 Sep;26(3):503-10. PubMed PMID: 8583795

Galzin AM, Delahaye M, Hoornaert C, McCort G, O'Connor SE. Effects of SL 65.0472, a novel 5-HT receptor antagonist, on 5-HT receptor mediated vascular contraction. *Eur J Pharmacol*. 2000 Sep 22;404(3):361-8. PubMed PMID: 10996601.

Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, Fleisher LA, Fowkes FG, Hamburg NM, Kinlay S, Lookstein R, Misra S, Mureebe L, Olin JW, Patel RA, Regensteiner JG, Schanzer A, Shishehbor MH, Stewart KJ, Treat-Jacobson D, Walsh ME. 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2016 Nov 13. pii: CIR.0000000000000470. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27840332.

Grbović L, Radenković M, Prostran M, Pesić S. Characterization of adenosine action in isolated rat renal artery. Possible role of adenosine A_{2A} receptors. *Gen Pharmacol*. 2000 Jul;35(1):29-36. PubMed PMID: 11679203.

Grbović L, Radenković M. Analysis of adenosine vascular effect in isolated rat aorta: possible role of Na⁺/K⁺-ATPase. *Pharmacol Toxicol*. 2003 Jun;92(6):265-71. PubMed PMID: 12787258.

Hamlyn JM, Blaustein MP. Salt sensitivity, endogenous ouabain and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013 Jan;22(1):51-8. doi: 10.1097/MNH.0b013e32835b36ec. Review. PubMed PMID: 23207724; PubMed Central PMCID: PMC3712615.

Hamlyn JM, Blaustein MP. Endogenous Ouabain: Recent Advances and Controversies. *Hypertension*. 2016 Sep;68(3):526-32. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06599. Epub 2016 Jul 25. PubMed PMID: 27456525; PubMed Central PMCID: PMC4982830.

Hauck C, Frishman WH. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na⁺/K⁺ ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin. *Cardiol Rev*. 2012 May-Jun;20(3):130-8. doi: 10.1097/CRD.0b013e31823c835c. Review. PubMed PMID: 22183064.

Haugen G, Mellembakken J, Stray-Pedersen S. Characterization of the vasodilatory response to serotonin in human umbilical arteries perfused in vitro. The influence of the endothelium. *Early Hum Dev*. 1997 Jan 20;47(2):185-93. PubMed PMID: 9039968.

Heaps CL, Bowles DK. Gender-specific K⁽⁺⁾-channel contribution to adenosine-induced relaxation in coronary arterioles. *J Appl Physiol (1985)*. 2002 Feb;92(2):550-8. PubMed PMID: 11796663.

Heaps CL, Tharp DL, Bowles DK. Hypercholesterolemia abolishes voltage-dependent K⁺ channel contribution to adenosine-mediated relaxation in porcine coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Feb;288(2):H568-76. Epub 2004 Sep 30. PubMed PMID: 15458946.

Hein TW, Xu W, Ren Y, Kuo L. Cellular signalling pathways mediating dilation of porcine pial arterioles to adenosine A_{2A} receptor activation. *Cardiovasc Res*. 2013 Jul 1;99(1):156-63. doi: 10.1093/cvr/cvt072. Epub 2013 Mar 27. PubMed PMID: 23539502; PubMed Central PMCID: PMC3687749.

Hill-Eubanks DC, Werner ME, Heppner TJ, Nelson MT. Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Sep 1;3(9):a004549. doi:

10.1101/cshperspect.a004549. Review. PubMed PMID: 21709182; PubMed Central PMCID: PMC3181028.

Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, Krook SH, Hunninghake DB, Comerota AJ, Walsh ME, McDermott MM, Hiatt WR. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA*. 2001 Sep 19;286(11):1317-24. PubMed PMID: 11560536.

Hu XQ, Dyer DC. 5-Hydroxytryptamine stimulates phosphoinositide hydrolysis and contraction in the ovine umbilical artery. *Eur J Pharmacol*. 1997 Mar 12;322(1):107-12. PubMed PMID: 9088878.

Iwamoto T, Umemura S, Toya Y, Uchibori T, Kogi K, Takagi N, Ishii M. Identification of adenosine A2 receptor-cAMP system in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Mar 15;199(2):905-10. PubMed PMID: 8135838.

Ibarra M, López-Guerrero JJ, Mejía-Zepeda R, Villalobos-Molina R. Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. *Arch Med Res*. 2006 Apr;37(3):334-41. PubMed PMID: 16513481.

Ishida T, Kawashima S, Hirata Ki, Sakoda T, Shimokawa Y, Miwa Y, Inoue N, Ueyama T, Shiomi M, Akita H, Yokoyama M. Serotonin-induced hypercontraction through 5-hydroxytryptamine 1B receptors in atherosclerotic rabbit coronary arteries. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1289-95. PubMed PMID: 11238275.

Jones MR, Apelberg BJ, Samet JM, Navas-Acien A. Smoking, menthol cigarettes, and peripheral artery disease in U.S. adults. *Nicotine Tob Res*. 2013 Jul;15(7):1183-9. doi: 10.1093/ntr/nts253. Epub 2012 Dec 3. PubMed PMID: 23212436; PubMed Central PMCID: PMC3682841.

Joosten MM, Pai JK, Bertoia ML, Rimm EB, Spiegelman D, Mittleman MA, Mukamal KJ. Associations between conventional cardiovascular risk factors and risk of peripheral artery disease in men. *JAMA*. 2012 Oct 24;308(16):1660-7. doi: 10.1001/jama.2012.13415. PubMed PMID: 23093164; PubMed Central PMCID: PMC3733106.

Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care*. 2001 Aug;24(8):1433-7.

Kannel WB, McGee DL. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc*. 1985 Jan;33(1):13-8.

Kanagy NL, Mecca TE, Webb RC. Arachidonate metabolites and serotonin contraction of femoral arteries from DOCA-salt hypertensive rats. *Blood Press*. 1996 Mar;5(2):113-20. PubMed PMID: 8860100.

Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Matsuo M, Sakata T, Miyata T. Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Aug;15(8):1114-20. PubMed PMID: 7627704.

Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):998-1005. Review. PubMed PMID: 15001455.

Kedzior K, Szczepańska R, Kocić I. Contribution of NO, ATP-sensitive K⁺ channels and prostaglandins to adenosine receptor agonists-induced relaxation of the rat tail artery. *Pharmacol Rep*. 2009 Mar-Apr;61(2):330-4. PubMed PMID: 19443947.

Kemp BK, Cocks TM. Adenosine mediates relaxation of human small resistance-like coronary arteries via A_{2B} receptors. *Br J Pharmacol*. 1999 Apr;126(8):1796-800. PubMed PMID: 10372822; PubMed Central PMCID: PMC1581442.

Korandji C, Zeller M, Guillard JC, Collin B, Lauzier B, Sicard P, Duvillard L, Goirand F, Moreau D, Cottin Y, Rochette L, Vergely C. Time course of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and oxidative stress in fructose-hypertensive rats: a model related to metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2):310-5. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.014. Epub 2010 Nov 18. PubMed PMID: 21146169.

Kroll K, Deussen A, Sweet IR. Comprehensive model of transport and metabolism of adenosine and S-adenosylhomocysteine in the guinea pig heart. *Circ Res*. 1992 Sep;71(3):590-604. PubMed PMID: 1499107.

Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, Scherthaner G. ADMA, cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008 Dec 15;82 Suppl 2:S122-6. doi: 10.1016/j.diabres.2008.09.024. Epub 2008 Oct 30. Review. PubMed PMID: 18973964.

Kumar V, Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol.* 2009 Aug 15;616(1-3):7-15. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.05.005. Epub 2009 May 20. Review. PubMed PMID: 19464286.

Lambert MA, Belch JJ. Medical management of critical limb ischaemia: where do we stand today? *J Intern Med.* 2013 Oct;274(4):295-307. doi: 10.1111/joim.12102. Review. PubMed PMID: 23795817.

Lamping KG, Faraci FM. Role of sex differences and effects of endothelial NO synthase deficiency in responses of carotid arteries to serotonin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Apr;21(4):523-8. PubMed PMID: 11304467.

Lin PJ, Pearson PJ, Cartier R, Schaff HV. Superoxide anion mediates the endothelium-dependent contractions to serotonin by regenerated endothelium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991 Sep;102(3):378-85. PubMed PMID: 1652668.

Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 2002 Aug 20;106(8):987-92. PubMed PMID: 12186805.

Linder AE, Gaskell GL, Szasz T, Thompson JM, Watts SW. Serotonin receptors in rat jugular vein: presence and involvement in the contraction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Jul;334(1):116-23. doi: 10.1124/jpet.109.163014. Epub 2010 Apr 8. PubMed PMID: 20378714; PubMed Central PMCID: PMC2912045.

Luo HL, Zang WJ, Lu J, Yu XJ, Lin YX, Cao YX. The protective effect of captopril on nicotine-induced endothelial dysfunction in rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006 Sep;99(3):237-45. PubMed PMID: 16930297.

Ma L, Zhu B, Chen X, Liu J, Guan Y, Ren J. Abnormalities of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ mobilization in aortic smooth muscle cells from streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 May;35(5-6):568-73. Epub 2007 Dec 7. PubMed PMID: 18067595.

Maassen VanDenBrink A, Reekers M, Bax WA, Saxena PR. Human isolated coronary artery contraction to sumatriptan characterised by the selective 5-HT_{1B/1D} receptor antagonist GR55562. *Pharmacol Toxicol.* 2000 Jun;86(6):287-90. PubMed PMID: 10895993.

Magenta A, Greco S, Capogrossi MC, Gaetano C, Martelli F. Nitric oxide, oxidative stress, and p66Shc interplay in diabetic endothelial dysfunction. *Biomed Res Int.* 2014;2014:193095. doi: 10.1155/2014/193095. Epub 2014 Mar 5. Review. PubMed PMID: 24734227; PubMed Central PMCID: PMC3964753.

Marso SP, Hiatt WR. Peripheral arterial disease in patients with diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Mar 7;47(5):921-9.

Mason RP, Corbalan JJ, Jacob RF, Dawoud H, Malinski T. Atorvastatin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure, nitroxidative stress and rantes levels in hypertensive rats with diabetes. *J Physiol Pharmacol.* 2015Feb;66(1):65-72. PubMed PMID: 25716966.

Matsumoto T, Watanabe S, Taguchi K, Kobayashi T. Mechanisms underlying increased serotonin-induced contraction in carotid arteries from chronic type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pharmacol Res.* 2014 Sep;87:123-32. doi: 10.1016/j.phrs.2014.07.001. Epub 2014 Jul 15. PubMed PMID: 25034165.

Masu K, Saino T, Kuroda T, Matsuura M, Russa AD, Ishikita N, Satoh Y. Regional differences in 5-HT receptors in cerebral and testicular arterioles of the rat as revealed by Ca²⁺ imaging of real-time confocal microscopy: variances by artery size and organ specificity. *Arch Histol Cytol.* 2008 Dec;71(5):291-302. PubMed PMID: 19556691.

McKune CM, Watts SW. Characterization of the serotonin receptor mediating contraction in the mouse thoracic aorta and signal pathway coupling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Apr;297(1):88-95. PubMed PMID: 11259531.

Medina-Bravo P, Medina-Urrutia A, Juárez-Rojas JG, Cardoso-Saldaña G, Jorge-Galarza E, Posadas-Sánchez R, Coyote-Estrada N, Nishimura-Meguro E, Posadas-Romero C. Glycemic control and high-density lipoprotein characteristics in adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2013 Sep;14(6):399-406. doi: 10.1111/j.1399-5448.2012.00924.x. Epub 2012 Oct 11. PubMed PMID: 23057424.

Meijer P, Wouters CW, van den Broek PH, Scheffer GJ, Riksen NP, Smits P, Rongen GA. Dipyridamole enhances ischaemia-induced reactive hyperaemia by increased adenosine receptor stimulation. *Br J Pharmacol.* 2008 Mar;153(6):1169-76. doi: 10.1038/bjp.2008.10. Epub 2008 Feb 11. PubMed PMID: 18264130; PubMed Central PMCID: PMC2275438.

Miyazaki M, Higashi Y, Goto C, Chayama K, Yoshizumi M, Sanada H, Orihashi K, Sueda T. Sarpogrelate hydrochloride, a selective 5-HT_{2A} antagonist, improves vascular function in patients with peripheral arterial disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007 Apr;49(4):221-7.

Mutafova-Yambolieva VN, Keef KD. Adenosine-induced hyperpolarization in guinea pig coronary artery involves A_{2b} receptors and KATP channels. *Am J Physiol.* 1997 Dec;273(6 Pt 2):H2687-95. PubMed PMID: 9435605.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 1):C799-822. Review. PubMed PMID: 7733230.

Nelson PM, Harrod JS, Lamping KG. 5HT_{2A} and 5HT_{2B} receptors contribute to serotonin-induced vascular dysfunction in diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:398406. doi: 10.1155/2012/398406. Epub 2012 Dec 30. PubMed PMID: 23346101; PubMed Central PMCID: PMC3546478.

Ni W, Geddes TJ, Priestley JR, Szasz T, Kuhn DM, Watts SW. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br J Pharmacol.* 2008 Jun;154(3):663-74. doi: 10.1038/bjp.2008.111. Epub 2008 Apr 14. PubMed PMID: 18414394; PubMed Central PMCID: PMC2439511.

Noda K, Nakao S, Zandi S, Sun D, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A. Retinopathy in a novel model of metabolic syndrome and type 2 diabetes: new insight on the inflammatory paradigm. *FASEB J.* 2014 May;28(5):2038-46. doi: 10.1096/fj.12-215715. Epub 2014 Feb 26. PubMed PMID: 24571922; PubMed Central PMCID: PMC3986844.

Nugent AG, McGurk C, Hayes JR, Johnston GD. Impaired vasoconstriction to endothelin 1 in patients with NIDDM. *Diabetes.* 1996 Jan;45(1):105-7. PubMed PMID: 8522053.

Olin JW, White CJ, Armstrong EJ, Kadian-Dodov D, Hiatt WR. Peripheral Artery Disease: Evolving Role of Exercise, Medical Therapy, and Endovascular Options. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Mar 22;67(11):1338-57. doi: 10.1016/j.jacc.2015.12.049. Review. PubMed PMID: 26988957.

Patel MR, Conte MS, Cutlip DE, Dib N, Geraghty P, Gray W, Hiatt WR, Ho M, Ikeda K, Ikeno F, Jaff MR, Jones WS, Kawahara M, Lookstein RA, Mehran R, Misra S, Norgren L, Olin JW, Povsic TJ, Rosenfield K, Rundback J, Shamoun F, Tcheng J, Tsai TT, Suzuki Y, Vranckx P, Wiechmann BN, White CJ, Yokoi H, Krucoff MW. Evaluation and treatment of patients with lower extremity peripheral artery disease: consensus definitions from Peripheral Academic Research Consortium (PARC). *J Am Coll Cardiol.* 2015 Mar 10;65(9):931-41. doi: 10.1016/j.jacc.2014.12.036. Erratum in: *J Am Coll Cardiol.* 2015 Jun 16;65(23):2578-9. PubMed PMID: 25744011; PubMed Central PMCID: PMC4874808.

Prentice DJ, Kelly MD, Ledent C, Hourani SM. Relaxation of the mouse isolated aorta and carotid artery in response to adenosine analogues in genetically-modified mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002 Aug;366(2):127-33. Epub 2002 Jun 6. PubMed PMID: 12122499.

Pérez NG, Villa-Abrille MC, Aiello EA, Dulce RA, Cingolani HE, Camilión de Hurtado MC. A low dose of angiotensin II increases inotropism through activation of reverse Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchange by endothelin release. *Cardiovasc Res.* 2003 Dec 1;60(3):589-97. PubMed PMID: 14659804.

Qu YY, Hui J, Wang LM, Tang N, Zhong H, Liu YM, Li Z, Feng Q, He F. Reduced Expression of the Extracellular Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Is Associated with

Activation of the Renin-Angiotensin System (RAS) to Promote Vascular Remodeling in the Pathogenesis of Essential Hypertension. *PLoS One*. 2016 Jul 8;11(7):e0157456. doi: 10.1371/journal.pone.0157456. eCollection 2016. PubMed PMID: 27391973; PubMed Central PMCID: PMC4938397.

Radenković M, Grbović L, Pesić S, Stojić D. Isolated rat inferior mesenteric artery response to adenosine: possible participation of Na⁺/K⁺-ATPase and potassium channels. *Pharmacol Rep*. 2005 Nov-Dec;57(6):824-32. PubMed PMID: 16382203.

Radenković M, Radunović N, Momcilov P, Grbović L. Altered response of human umbilical artery to 5-HT in gestational diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep*. 2009 May-Jun;61(3):520-8. PubMed PMID: 19605952.

Radenković M, Stojanović M, Topalović M. Contribution of thromboxane a_2 in rat common carotid artery response to serotonin. *Sci Pharm*. 2010 Jul-Sep;78(3):435-43. doi: 10.3797/scipharm.1004-04. Epub 2010 Jun 15. PubMed PMID: 21179356; PubMed Central PMCID: PMC3002812.

Radenković M, Stojanović M, Janković R, Topalović M, Stojiljković M. Effects of diabetes and vascular occlusion on adenosine-induced relaxant response of rat common carotid artery. *Pharmacol Rep*. 2013;65(3):632-41. PubMed PMID: 23950584.A

Radenković M, Stojanović M, Potpara T, Prostran M. Therapeutic approach in the improvement of endothelial dysfunction: the current state of the art. *Biomed Res Int*. 2013;2013:252158. doi: 10.1155/2013/252158. Review. PubMed PMID: 23509696; PubMed Central PMCID: PMC3581156. B

Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016 Mar-Apr;78:13-31. doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.004. Epub 2015 Nov 17. Review. PubMed PMID: 26596652. A

Radenkovic M, Stojanovic M, Prostran M. Endothelial Dysfunction in Renal Failure: Current Update. *Curr Med Chem*. 2016;23(19):2047-54. Review. PubMed PMID: 26718795. B

Radenkovic M, Stojanović M, Nešić IM, Prostran M. Angiotensin receptor blockers & endothelial dysfunction: Possible correlation & therapeutic implications. *Indian J Med*

Res. 2016 Aug;144(2):154-168. doi: 10.4103/0971-5916.195022. Review. PubMed PMID: 27934794; PubMed Central PMCID: PMC5206866. B

Raicu M, Florea S. Deleterious effects of nifedipine on smooth muscle cells implies alterations of intracellular calcium signaling. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001 Dec;15(6):387-92. PubMed PMID: 11860526.

Reffellmann T, Kloner RA. Effects of adenosine and verapamil on anatomic no-reflow in a rabbit model of coronary artery occlusion and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 Apr;43(4):580-8. PubMed PMID: 15085070.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*. 1998 Feb 10;97(5):425-8. PubMed PMID: 9490235.

Roberts DH, Tsao Y, Linge K, McLoughlin GA, Breckenridge A. Double-blind comparison of captopril with nifedipine in hypertension complicated by intermittent claudication. *Angiology*. 1992 Sep;43(9):748-56. PubMed PMID: 1514711.

Rodella LF, Filippini F, Bonomini F, Bresciani R, Reiter RJ, Rezzani R. Beneficial effects of melatonin on nicotine-induced vasculopathy. *J Pineal Res*. 2010 Mar;48(2):126-32. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00735.x. Epub 2009 Dec 30. PubMed PMID: 20050989.

Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss L, Golzarian J, Gornik HL, Jaff MR, Moneta GL, Olin JW, Stanley JC, White CJ, White JV, Zierler RE; American College of Cardiology Foundation Task Force.; American Heart Association Task Force.. Management of patients with peripheral artery disease (compilation of 2005 and 2011 ACCF/AHA Guideline Recommendations): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Apr 9;61(14):1555-70. doi: 10.1016/j.jacc.2013.01.004. PubMed PMID: 23473760; PubMed Central PMCID: PMC4492473.

Roon KI, Maassen Van Den Brink A, Ferrari MD, Saxena PR. Bovine isolated middle cerebral artery contractions to antimigraine drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1999 Nov;360(5):591-6. PubMed PMID: 10598799.

Ruan CH, Dixon RA, Willerson JT, Ruan KH. Prostacyclin therapy for pulmonary arterial hypertension. *Tex Heart Inst J*. 2010;37(4):391-9. Review. PubMed PMID: 20844610; PubMed Central PMCID: PMC2929860.

Sabouni MH, Mustafa SJ. Effects of adenosine analogs and ouabain on rhythmicity in human coronary artery. *Eur J Pharmacol*. 1989 Sep 22;168(3):271-6. PubMed PMID: 2583237.

Sato A, Terata K, Miura H, Toyama K, Loberiza FR Jr, Hatoum OA, Saito T, Sakuma I, Gutterman DD. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Apr;288(4):H1633-40. PubMed PMID: 15772334.

Samsel M, Dzierzbicka K. Therapeutic potential of adenosine analogues and conjugates. *Pharmacol Rep*. 2011;63(3):601-17. Review. PubMed PMID: 21857072.

Searls YM, Loganathan R, Smirnova IV, Stehno-Bittel L. Intracellular Ca²⁺ regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia. *Cardiovasc Diabetol*. 2010 Feb 1;9:8. doi: 10.1186/1475-2840-9-8. PubMed PMID: 20122173; PubMed Central PMCID: PMC2829469.

Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation*. 2004 Aug 10;110(6):738-43. PubMed PMID: 15262830.

Senol S, Es MU. Is serotonin a valuable parameter in peripheral arterial disease? *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2015 Mar;23(3):289-91. doi: 10.1177/0218492314546908. Epub 2014 Aug 10. PubMed PMID: 25114324.

Sheikh AQ, Hurley JR, Huang W, Taghian T, Kogan A, Cho H, Wang Y, Narmoneva DA. Diabetes alters intracellular calcium transients in cardiac endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e36840. doi: 10.1371/journal.pone.0036840. Epub 2012 May 9. PubMed PMID: 22590623; PubMed Central PMCID: PMC3348895.

Shi Y, Ku DD, Man RY, Vanhoutte PM. Augmented endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxations attenuate endothelial dysfunction in femoral and mesenteric, but not in carotid arteries from type I diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Jul;318(1):276-81. Epub 2006 Mar 24. PubMed PMID: 16565165.

Silva SA, Marques FB, Fontes Ribeiro CA. Characterization of the human basilar artery contractile response to 5-HT and triptans. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007 Jun;21(3):265-72. PubMed PMID: 17521295.

Smajilovic S, Yano S, Jabbari R, Tfelt-Hansen J. The calcium-sensing receptor and calcimimetics in blood pressure modulation. *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(3):884-93. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01317.x. Review. PubMed PMID: 21410453; PubMed Central PMCID: PMC3195912.

Solomon SA, Ramsay LE, Yeo WW, Parnell L, Morris-Jones W. beta blockade and intermittent claudication: placebo controlled trial of atenolol and nifedipine and their combination. *BMJ*. 1991 Nov 2;303(6810):1100-4. PubMed PMID: 1747577; PubMed Central PMCID: PMC1671261.

Spengel F, Clément D, Boccalon H, Liard F, Brown T, Lehert P. Findings of the Naftidrofuryl in Quality of Life (NIQOL) European study program. *Int Angiol*. 2002 Mar;21(1):20-7. PubMed PMID: 11941270.

Sugai K, Yaganisawa T, Motohashi O, Suzuki M, Yoshimoto T. Levromakalim decreases cytoplasmic Ca²⁺ and vascular tone in basilar artery of SAH model dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999 Jun;33(6):868-75. PubMed PMID: 10367589.

Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes*. 2001 Apr;50(4):851-60. PubMed PMID: 11289052.

Szentmiklósi AJ, Ujfalusi A, Cseppentő A, Nosztray K, Kovács P, Szabó JZ. Adenosine receptors mediate both contractile and relaxant effects of adenosine in main pulmonary artery of guinea pigs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995 Apr;351(4):417-25. PubMed PMID: 7543187.

TASC Steering Committee., Jaff MR, White CJ, Hiatt WR, Fowkes GR, Dormandy J, Razavi M, Reekers J, Norgren L. An Update on Methods for Revascularization and Expansion of the TASC Lesion Classification to Include Below-the-Knee Arteries: A Supplement to the Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Vasc Med*. 2015 Oct;20(5):465-78. doi: 10.1177/1358863X15597877. Review. PubMed PMID: 26268268.

Thiruvoipati T, Kielhorn CE, Armstrong EJ. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes. *World J Diabetes*. 2015 Jul 10;6(7):961-9. doi: 10.4239/wjd.v6.i7.961. Review. PubMed PMID: 26185603; PubMed Central PMCID: PMC4499529.

Troidl K, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012 Feb;28 Suppl 1:27-9. doi: 10.1002/dmrr.2232. Review. PubMed PMID: 22271719.

Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res*. 2001 Jun 22;88(12):1291-8. PubMed PMID: 11420306.

Verheggen R, Werner I, Lücker A, Brüß M, Göthert M, Kaumann AJ. 5-Hydroxytryptamine-induced contraction of human temporal arteries coexpressing 5-HT_{2A} receptors and wild-type or variant (Phe124Cys) 5-HT_{1B} receptors: increased contribution of 5-HT_{1B} receptors to the total contractile amplitude in arteries from Phe124Cys heterozygous individuals. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Aug;16(8):601-7. Erratum in: *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Aug;17(8):679. PubMed PMID: 16847428.

Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Aug;24(8):1476-85. Review. PubMed PMID: 11473089.

Walther DJ, Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol*. 2003 Nov 1;66(9):1673-80. PubMed PMID: 14563478.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 2003 Jan 3;299(5603):76. PubMed PMID: 12511643.

Wang Y, Baimbridge KG, Mathers DA. Effect of serotonin on intracellular free calcium of rat cerebrovascular smooth muscle cells in culture. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991 Mar;69(3):393-9. PubMed PMID: 2059904.

Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Serotonin potentiates angiotensin II--induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis*. 2001 Dec;159(2):269-79. PubMed PMID: 11730806. A

Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Angiotensin II and serotonin potentiate endothelin-1-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens*. 2001 Apr;19(4):731-9. PubMed PMID: 11330876. B

Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev*. 2012 Apr;64(2):359-88. doi: 10.1124/pr.111.004697. Epub 2012 Mar 8. Review. PubMed PMID: 22407614; PubMed Central PMCID: PMC3310484.

Wigg SJ, Tare M, Tonta MA, O'Brien RC, Meredith IT, Parkington HC. Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jul;281(1):H232-40. PubMed PMID: 11406490.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53. PubMed PMID: 15111519.

Wylam ME, Samsel RW, Schumacker PT, Umans JG. Extracellular calcium and intrinsic tone in the human umbilical artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 Sep;266(3):1475-81. PubMed PMID: 8371151.

Yang SL, Zhu LY, Han R, Sun LL, Li JX, Dou JT. Pathophysiology of peripheral arterial disease in diabetes mellitus. *J Diabetes*. 2017 Feb;9(2):133-140. doi: 10.1111/1753-0407.12474. Review. PubMed PMID: 27556728

Yamada K, Niki H, Nagai H, Nishikawa M, Nakagawa H. Serotonin potentiates high-glucose-induced endothelial injury: the role of serotonin and 5-HT(2A) receptors in promoting thrombosis in diabetes. *J Pharmacol Sci*. 2012;119(3):243-50. Epub 2012 Jun 28. PubMed PMID: 22785018.

Yousif MH, Benter IF, Akhtar S. The role of tyrosine kinase-mediated pathways in diabetes-induced alterations in responsiveness of rat carotid artery. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2005 Apr;25(2):69-78. PubMed PMID: 15757506.

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:367-85. Review. PubMed PMID: 17506640.

Zhang L, Hu XQ. Endothelium-dependent potentiation by cocaine of serotonin-induced contractions in sheep fetal umbilical artery. *J Soc Gynecol Investig.* 1998 Mar-Apr;5(2):72-4. PubMed PMID: 9509384.

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

ADMA – asimetrični dimetilarginin

VCAM-1 – vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1

DM – dijabetes melitus

ED – endotelna disfunkcija

IL-6 – interleukin-6

IP3 – inozitol tri fosfat

KB – kardiovaskularni

AUC – oblast ispod krive

ПАБ – periferna arterijska bolest

CRP – C-reaktivni protein

TNF- α – faktor nekroze tumora alfa

TPH – triptofan hidroksilaza

CCL5 – hemokin (C-C motiv) ligand 5

vWF – von Willebrand factor

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Марко Стојановић, рођен 03.02.1987. године у Београду, где је похађао основну школу и гимназију.

Медицински факултет, универзитета у Београду уписао је 2005. године, где 2011. године стиче диплому доктора медицине, са просечном оценом 9,46. Специјалистичке академске студије из уже научне области Клиничка фармакологија и терапија започео је школске 2011. године, а успешно их језавршио 2013. године одбраном завршног рада под називом „Клиничка фармакологија лекова у терапији инфекција узрокованим вирусом хепатитиса Б“.

Докторске студије на Медицинском факултету универзитета у Београду уписује школске 2012/2013 године, а основну здравствену специјализацију из Клиничке фармакологије школске 2013/2014 године.

Од јула 2012. године ради у звању сарадника у настави на Институту за фармакологију, клиничку фармакологију и токсикологију. Септембра 2014. године биран је у звање асистента.

До сада је објавио 30 радова у страним часописима, домаћим и иностраним конгресима, од чега је 12 радова објављено у часописима са JCR листе.

Усавршавао се у Хамбургу на универзитетској клиници Епендорф. Био је стипендиста Немачке владе, службе за академску размену (DAAD). Члан је домаћих али и иностраних пројеката. Током истраживачког боравка у Хамбургу био је укључен, као активни члан, у раду EU FP7-финансираног пројекта *BiomarCaRE (Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment in Europe)*.

Од 2012. године активни је члан European Atherosclerosis Society, а од 2017. године и Српског фармаколошког друштва. Добитник је неколико награда на домаћим и страним конгресима.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марко Стојановић
Број индекса мф-03/12

Изјављујем

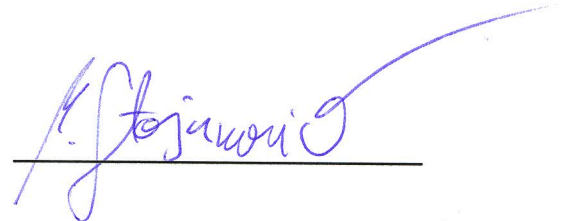
да је докторска дисертација под насловом

ФАРМАКОЛОШКА ДЕЈСТВА СЕРОТОНИНА И АДЕНОЗИНА НА ИЗОЛОВАНОЈ
ФЕМОРАЛНОЈ АРТЕРИЈИ ПАЦОВА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА
ДИЈАБЕТЕСА И ВАСКУЛАРНЕ ОКЛУЗИЈЕ

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

Потпис аутора

У Београду, 29.01.2018.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Марко Стојановић
Број индекса	мф-03/12
Студијски програм	Медицинска фармакологија
Наслов рада	ФАРМАКОЛОШКА ДЕЈСТВА СЕРОТОНИНА И АДЕНОЗИНА НА ИЗОЛОВАНОЈ ФЕМОРАЛНОЈ АРТЕРИЈИ ПАЦОВА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ДИЈАБЕТЕСА И ВАСКУЛАРНЕ ОКЛУЗИЈЕ
Ментор	Проф. др Мирослав Раденковић

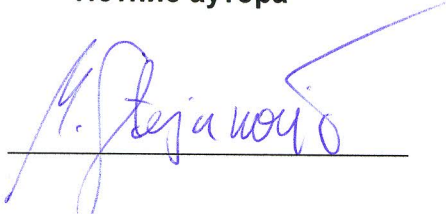
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 29.01.2018.



Изјава о коришћењу

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

ФАРМАКОЛОШКА ДЕЈСТВА СЕРОТОНИНА И АДЕНОЗИНА НА ИЗОЛОВАНОЈ
ФЕМОРАЛНОЈ АРТЕРИЈИ ПАЦОВА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА
ДИЈАБЕТЕСА И ВАСКУЛАРНЕ ОКЛУЗИЈЕ

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 29.01.2018.

