

*Originalni naučni rad*

## **Uloga pola i endotela u relaksantnom efektu pinacidila na izolovanim krvnim sudovima normotenzivnih i spontano hipertenzivnih pacova**

Dragana Drakul<sup>1</sup>, Dragana Sokolović<sup>1</sup>, Nataša Miletić<sup>1</sup>, Milan Kulić<sup>1</sup>, Stevanka Đorđević<sup>1</sup>, Vladimir Lj. Jakovljević<sup>2</sup>, Slobodan R. Milovanović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medicinski fakultet Foča, Univerzitet u Istočnom Sarajevu, Foča, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup>Institut za fiziologiju, Medicinski fakultet Kragujevac, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

### **Kratak sadržaj**

**Uvod.** Podtip, ekspresija, distribucija i funkcija K<sup>+</sup> kanala u glatkim mišićima krvnih sudova su promjenljivi i vjerovatno zavise od očuvanosti endotela, azot monoksida (NO) i patoloških stanja kao što je hipertenzija. Ispitali smo uticaj modulatora kalijumskih kanala i njihove interakcije sa NO na krvne sudove. Ovo ispitivanje je značajno za pronalaženje novih terapijskih koncepta u liječenju poremećaja kontraktilnosti krvnih sudova. Cilj rada je bio da se ispita uloga pola, endotela i hipertenzije u relaksantnom efektu pinacidila na izolovane mezenterične i renalne arterije, uzete od normotenzivnih (NT) i spontano hipertenzivnih (HT) pacova.

**Metode.** Eksperimenti su izvedeni na izolovanim mezenteričnim i renalnim arterijama uzetim od mužjaka i ženki NT i HT Wistar pacova. Arterije su inkubirane 30 min u kupatilu za izolovane organe sa Krebs-Ringerovim rastvorom, na 36°C i aerisane smješom 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>. Kontrakcije izolovanih krvnih sudova su izazivane fenilefrinom (10<sup>-6</sup> mol), a na stabilan tonus je dodavan pinacidil (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-4</sup>M). Funkcionalni integritet endotela je potvrđivan acetilholinom (10<sup>-5</sup> mol).

**Rezultati.** Pinacidil je koncentracijski zavisno relaksirao mezenterične arterije, bez obzira da li su arterije uzete od mužjaka ili ženki pacova. Relaksantni efekat pinacidila je bio veoma izražen na segmentima arterija sa endotelom. Značaj endotela je bio manje izražen na krvnim sudovima uzetim od HT, nego od NT životinja. Stepenn relaksacije je bio veći kod mezenteričnih, nego kod renalnih arterija.

**Zaključak.** Pinacidil (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-4</sup> mol) je prouzrokovao koncentracijski i endotel zavisnu relaksaciju izolovanih renalnih i mezenteričnih arterija pacova, uzetih od NT i HT pacova bez obzira na pol.

**Ključne riječi:** pinacidil, renalna arterija, mezenterična arterija, endotel, hipertenzija

*Adresa autora:  
Dr Dragana Drakul,  
Njegoševa 20, 73300 Foča,  
dragister@gmail.com*

## Uvod

Hipertenzija predstavlja veliki medicinski problem današnjice sa prevalencom od 40 % među osobama starijim od 25 godina [1]. Pored velikog broja antihipertenziva i razvijene svijesti da kontrola hipertenzije dovodi do smanjenja komplikacija ove bolesti i troškova liječenja, procjenjuje se da prevalenca rezistentne hipertenzije iznosi između 20% i 30% [2].

Primjenom antihipertenzivnih lijekova iz grupe otvarača kalijumovih kanala (OKK) može da se reguliše krvni pritisak kod 70-85% pacijenata sa sistemskom hipertenzijom [3]. Kod većine pacijenata efikasnost ove grupe lijekova je slična efikasnosti drugih konvencionalnih antihipertenzivnih lijekova, ali njihova potencijalna vrijednost je još veća kod pacijenata sa rezistentnom hipertenzijom. Pored dobrog antihipertenzivnog učinka treba dodati da predstavnici ove grupe lijekova imaju kardioprotektivne i antiishemijske efekte, pozitivno dejstvo na metabolizam glukoze i lipida, kao i da relaksiraju bronhijalnu muskulaturu [3]. Pinacidil je OKK iz grupe cijanogvanidina. Odavno je poznato da dovodi do relaksacije glatkih mišića krvnih sudova, ali mehanizam njegovog djelovanja još uvijek nije potpuno razjašnjen. Pretpostavlja se da vazodilatacija nastaje usljed hiperpolarizacije membrane vaskularnog glatkog mišića. U proces relaksacije su vjerovatno uključeni  $K_{ATP}$  kanali. Međutim, postoje pretpostavke da pinacidil u svom djelovanju uključuje, ne samo otvaranje ove vrste kalijumskih kanala, već i drugih vrsta  $K^+$  kanala, ali i signalne puteve NO [4].

Jasno je da razvoj specifičnijeg i efektivnijeg antihipertenzivnog agensa ostaje važan zadatak i vjerujemo da će modulatori funkcije kalijumskih kanala i NO i/ili njihova interakcija tu naći svoje mesto. U tom kontekstu, ispitivanje uticaja modulatora kalijumskih kanala i njihove interakcije sa NO na krvne sudove je značajno, kako za ispitivanje fiziologije i patofiziologije hipertenzije, tako i za pronalaženje novih terapijskih koncepata u liječenju poremećaja kontraktilnosti krvnih sudova.

Kalijumovi kanali su prisutni u svim ćelijama sisara i imaju važnu ulogu u regulaciji ekscitabilnosti membrana. Mutacije gena koji kodiraju  $K^+$  kanale ili same promjene funkcije ovih kanala povezane su sa bolestima srca, bubrega, pankreasa, kao i poremećajima u

CNS-u. Osim toga, patološka stanja kao što su hipertenzija, dijabetes, ishemijska povreda mozga, sepsa, mogu izmijeniti funkciju  $K^+$  kanala. U posljednje dvije decenije su neka od urođenih oboljenja dovedena u vezu sa abnormalnostima proteina koji grade  $K^+$  kanale. Otkrivena je direktna veza između grupe LQT sindroma i mutacija na nivou Kir kanala [5]. Nekoliko studija je pokazalo da insuficijencija i hipertrofija miokarda dovode do smanjenog protoka jona kroz  $K_v$  kanale [6-9]. U ispitivanjima na spontano hipertenzivnim pacovima, Ghosh i sar. [10] su našli da je protok kroz  $K_{ATP}$  kanale u ćelijama aorte smanjen u odnosu na iste kanale normotenzivnih pacova, što je osnova pretpostavci da hipertenzija dovodi do smanjene funkcije ili ekspresije  $K_{ATP}$  kanala u krvnim sudovima. Međutim, funkcija BKCa kanala može da bude pojačana kod ljudi sa hipertenzijom [11].

Vaskularni endotel je unutrašnji sloj zida krvnih sudova, ali i jedan od najvažnijih endokrinih organa u organizmu. Medijatori ili faktori koje oslobađa endotel obično se dijele prema njihovom efektu na kontrakciju krvnog suda. U relaksantne faktore endotelnog porijekla spadaju: NO, prostaciklin (PGI<sub>2</sub>), PGE<sub>2</sub>, endotelni hiperpolarizujući faktor (EDHF), peptidi kao što su C-natriuretski peptid i adrenomedulin. Od kontraktilnih supstanci koje oslobađa endotel najvažnije su: endotelin-1 (ET-1), superoksidni anjon, prostaglandini sa vazokontraktilnim dejstvom (PGF<sub>27</sub>, PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>), tromboksan A<sub>2</sub> i angiotenzin II.

Cilj rada je bio da se ispita uloga pola, endotela i hipertenzije u relaksantnom efektu pinacidila na izolovane mezenterične i renalne arterije uzete od NT i HT pacova.

## Metode rada

U eksperimentima su korišteni normotenzivni (NT) i spontano hipertenzivni (HT) pacovi oba pola, soja *Wistar*, tjelesne mase od 250 do 300 grama. Hipertenzija kod ovih pacova je čisto nasljedna i genetski determinisana, zbog čega je uporediva sa primarnom hipertenzijom kod ljudi [12].

Sve životinje su držane u standardnim laboratorijskim uslovima, pri sobnoj temperaturi, dnevno-noćnom ritmu osvjetljenja, uz pojenje i hranu ad libitum. Svi propisi za korišćenje

pacova su odobreni od strane lokalnog etičkog komiteta za eksperimente na životinjama, koji su u skladu sa međunarodnim propisima.

Izolovane su mezenterična i obje renalne arterije i skraćivane na segmente dužine 3-5 mm. Na pojedinim preparatima je mehanički uklanjan endotelni sloj krvnog suda. Potom su preparati inkubirani u vodenom kupatilu u Krebs-Ringerovom-bikarbonatnom rastvoru (mmol/L: NaCl, 118,3; KCl, 4,7; CaCl<sub>2</sub>, 2,5; Mg-SO<sub>4</sub>, 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; glukoza, 11,1), na 36°C u trajanju od 30 minuta. Rastvor je kontinuirano oksigenisan smješom 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>. Preparati su postepeno istezani do 2g. Kontrakcije izolovanih krvnih sudova izazivane su fenilefrinom (10<sup>-6</sup> mol) i registrovane izometrijskim transdjuserom (Ugo Bazile). Za farmakološku provjeru integriteta endotelnog sloja koristili smo acetilholin (10<sup>-5</sup>M). Na stabilan tonus postignut fenilefrinom dodavan je pinacidil (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-4</sup>M) u kumulativnom maniru.

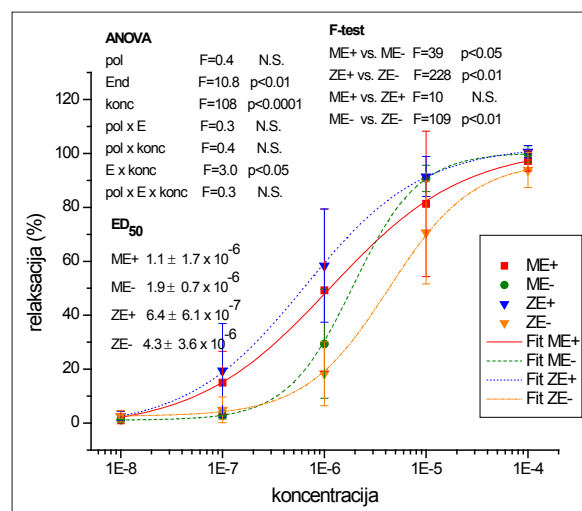
Statistička obrada rezultata je urađena saglasno protokolima opisanim kod Hinkle-a i saradnika [13] i Manley-a [14]. Svi rezultati su izražavani kao srednja vrijednost ± SD procenta relaksacije u odnosu na kontrolu. Trendovi i razlike između ekperimentalnih grupa su procjenjivane pomoću višefaktorske analize varijanse (ANOVA), sa značajnošću p<0,05 kao graničnom i *post hoc* testovima koji su detaljnije opisivali vrstu razlike dobijenu analizom varijanse.

## Rezultati

### Efekat pinacidila na mezenterične arterije uzete od mužjaka i ženki normotenzivnih pacova

Kako smo u našim eksperimentima koristili i mužjake i ženke pacova Wistar soja, morali smo statistički da procijenimo i eventualne razlike u efektu pinacidila u zavisnosti od pola. Poređenje koje smo uradili na mezenteričnim arterijama potvrdilo je našu pretpostavku da polne razlike ne utiču na efekat pinacidila. Pinacidil koncentracijski zavisno relaksira mezenterične arterije (Slika 1), bez obzira da li su arterije uzete od mužjaka ili ženki pacova (trofaktorska analiza varijanse, nema statistički

značajnog ANOVA efekta pola). Za koncentracijski zavisnu relaksaciju pinacidila u oba slučaja je važno prisustvo endotela, pri čemu je i F-test pokazao da kod arterija sa očuvanim endotelom (E+) nema značaja od jedinki kog pola su arterije uzete. Polne razlike postoje kod arterija bez endotela, ali se ogledaju u blago drugačijoj kinetici relaksacije (F-test, p<0,01), ali nema statistički značajnih razlika u srednjim



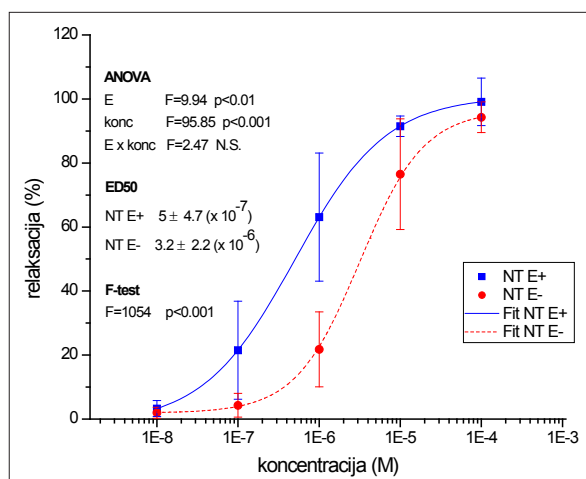
Slika 1. Efekat rastućih koncentracija pinacidila na izolovane mezenterične arterije sa endotelom (E+) i bez endotela (E-) uzete od mužjaka (M) normotenzivnih pacova (kriva ME+ i kriva ME-) i ženki (Z) pacova (kriva ZE+ i kriva ZE-). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD procenta relaksacije. Kao kontrola je korišćen tretman sa 10<sup>-4</sup> M papaverinom (uzet kao 100%). Statistička značajnost je testirana trofaktorskom analizom varijanse (three-way ANOVA) sa polom, prisustvom endotela i koncentracijom pinacidila kao faktorima na logaritamski transformisanim podacima. ED<sub>50</sub> vrijednosti su date kao srednje vrijednosti ± SD i poređene su jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i Tukey HSD t-testom. Krive relaksacije se statistički značajno sigmoidalno usklađuju (fituju) (Chi<sup>2</sup>/DoF p<0,05), a njihovo poređenje je urađeno F-testom (F i p vrijednosti date na slici).

efektivnim vrijednostima (ED<sub>50</sub>).

### Dejstvo pinacidila na izolovane mezenterične arterije uzete od normotenzivnih i spontano hipertenzivnih pacova sa i bez endotela

Testiranje dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) je pokazalo da pinacidil u *in vitro* uslovima izaziva koncentracijski zavisnu relaksaciju mezenterične arterije uzete i od NT i od

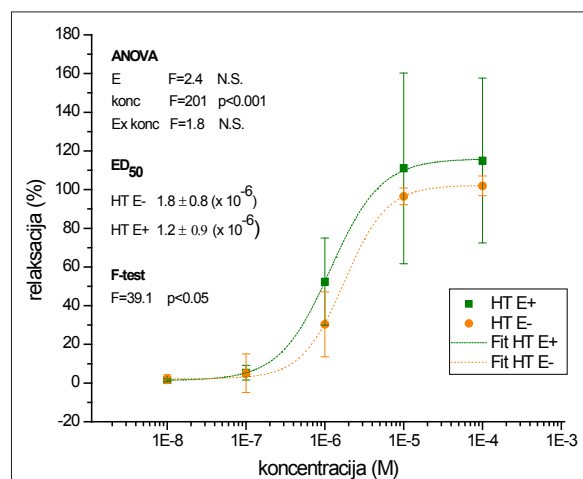
HT pacova (efekat koncentracije pinacidila,  $p < 0,001$ ). Međutim, kod NT pacova njegov efekat zavisi od prisustva endotela (statistički značajan efekat endotela  $p < 0,01$ ) (Slika 2). Kod HT pacova, u ovom eksperimentalnom modelu, naprotiv, endotel ima daleko manji značaj na efekat pinacidila (Slika 3). Uticaj endotela je ispitan i potvrđen i preko  $ED_{50}$  vrijednosti. Naime, kod NT pacova,  $ED_{50}$  vrijednosti se razlikuju za oko 10 puta, te je ta razlika i statistički značajna. To nije slučaj kod HT jedinki, kod kojih su  $ED_{50}$  približne. Kinetika koncentracijski dozno zavisnog dejstva pinacidila na mezenterične arterije i NT i HT pacova je slična (krive se statistički značajno sigmoidalno fituju -  $\chi^2/\text{DoF}$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,05$ , respektivno). Njihovo poređenje F-testom je ponovo pokazalo da postoje statistički značajne razlike efekata pinacidila u odnosu na prisustvo endotela, s tim što je uticaj endotela kod NT pacova veoma visok ( $p < 0,001$ ) u odnosu na HT pacove kod kojih je na granici značajnosti ( $p < 0,05$ ).



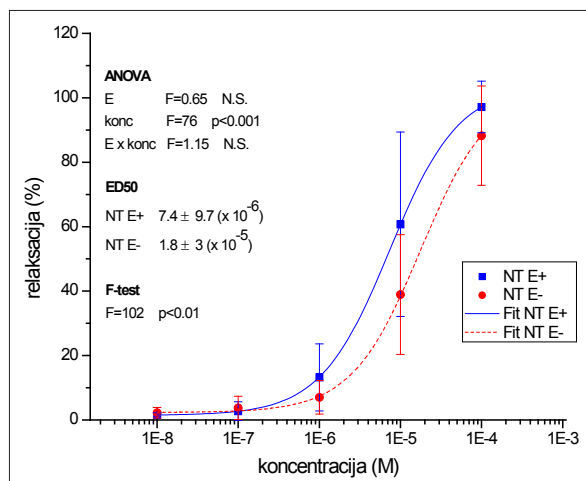
**Slika 2.** Kumulativne koncentracijski zavisne krive prikazuju efekat rastućih koncentracija pinacidila na izolovane mezenterične arterije sa endotelom (E+) i bez endotela (E-) uzete od normotenzivnih (NT) pacova (kriva NT E+ i kriva NT E-). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SD procenta relaksacije u odnosu na kontrolu (100%). Statistička značajnost je testirana dvofaktorskom analizom varijanse (dvosmjerna ANOVA) sa prisustvom endotela (E+ sa i E- bez endotela) i koncentracijom pinacidila kao faktorima na logaritamski transformisanim podacima.  $ED_{50}$  vrijednosti su date kao srednje vrijednosti  $\pm$  SD i poređene su t-testom (razlika je statistički značajna,  $p < 0,001$ ). Krive se statistički značajno sigmoidalno fituju ( $\chi^2/\text{DoF}$   $p < 0,01$ ), a poređenje krivih F-testom je pokazalo statistički značajne razlike između njih ( $p < 0,001$ ).

### Dejstvo pinacidila na izolovane renalne arterije normotenzivnih pacova i spontano hipertenzivnih pacova sa i bez endotela

Testiranje dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) je pokazalo da pinacidil koncentracijski zavisno izaziva relaksaciju renalne arterije in vitro i kod NT i HT (efekat koncentracije pinacidila,  $p < 0,001$ ) jedinki. Međutim, kod NT pacova njegov efekat zavisi od prisustva endotela (statistički značajno različite  $ED_{50}$  vrijednosti i različitost krivih testiranih F-testom,  $p < 0,01$ , slika 4) tako što prisustvo endotela smanjuje efektivne koncentracije pinacidila potrebne za relaksaciju. Kod HT pacova, u ovom eksperimentalnom modelu, naprotiv, endotel nema značaj u tretmanu pinacidilom (nema statistički značajnih ANOVA razlika za efekat endotela za opseg koncentracija koji je korišćen, slika 5). Kinetika koncentracijski zavisnog dejstva pinacidila na renalne arterije NT pacova je klasičnog opisa (kriva se statis-



**Slika 3.** Relaksantni efekat pinacidila na izolovane mezenterične arterije sa endotelom (E+) i bez endotela (E-) uzete od spontano hipertenzivnih (HT) pacova (kriva HT E+ i kriva HT E-). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SD procenta relaksacije u odnosu na kontrolu (100%). Statistička značajnost je testirana dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA) sa prisustvom endotela (E+ sa i E- bez endotela) i koncentracijom pinacidila kao faktorima na logaritamski transformisanim podacima.  $ED_{50}$  vrijednosti su date kao srednje vrijednosti  $\pm$  SD i poređene su t-testom (razlika nije statistički značajna). Krive se statistički značajno sigmoidalno fituju ( $\chi^2/\text{DoF}$   $p < 0,05$ ), a poređenje krivih F-testom je pokazalo da postoji statistička značajnost razlike između njih, ali na granici signifikantnosti ( $p < 0,05$ ).

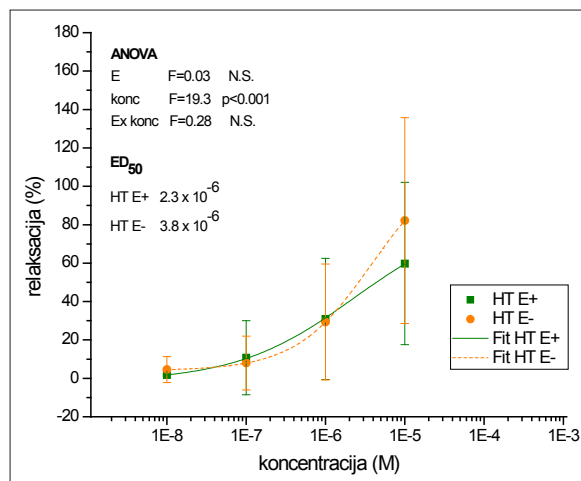


**Slika 4.** Kumulativne koncentracijski zavisne krive prikazuju efekat rastućih koncentracija pinacidila na izolovane venalne arterije sa endotelom (E+) i bez endotela (E-) uzete od normotenzivnih (NT) pacova (kriva NT E+ i kriva NT E-). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SD procenta relaksacije u odnosu na kontrolu (100%). Statistička značajnost je testirana dvofaktorskom analizom varijanse (dvosmjerna ANOVA) sa prisustvom endotela (E+ sa i E- bez endotela) i koncentracijom pinacidila kao faktorima na logaritamski transformisanim podacima. ED<sub>50</sub> vrijednosti su date kao srednje vrijednosti  $\pm$  SD i poređene su t-testom (razlika je statistički značajna,  $p < 0,001$ ). Krive se statistički značajno sigmoidalno fituju ( $\chi^2/\text{DoF}$   $p < 0,01$ ), a poređenje krivih F-testom je pokazalo statistički značajne razlike između njih ( $p < 0,001$ ).

tički značajno sigmoidalno fituje -  $\chi^2/\text{DoF}$ ,  $p < 0,01$ ). Međutim, vrijednosti za krivu efekta pinacidila kod HT pacova su velikog opsega, a i jedna manje koncentracija je korišćena u eksperimentu, te model nije statistički značajan. Poređenje ED<sub>50</sub> vrijednosti i krivih F-testom je pokazalo da ne postoje statistički značajne razlike efekata pinacidila u odnosu na prisustvo endotela kod HT pacova. Kod HT pacova, s obzirom da osnovni model krive nije značajan i da je upotrijebljena koncentracija pinacidila manja, poređenje ne može biti potpuno, iako krive pokazuju različitost u obliku. Stoga se ne može precizno definisati uloga endotela, iako rezultati ukazuju da ne postoji značajan efekat.

## Diskusija

Uopšteno rečeno, otvarači kalijumovih kanala, povećanjem permeabilnosti membrane za K<sup>+</sup> jone, dovode do efluksa K<sup>+</sup> iz ćelije i hiperpolarizacije. Na taj način, stvaraju se uslovi za pomjeranje membranskog potencijala od



**Slika 5.** Relaksantni efekat pinacidila na izolovane renalne arterije sa endotelom (E+) i bez endotela (E-) uzete od spontano hipertenzivnih (HT) pacova (kriva HT E+ i kriva HT E-). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SD procenta relaksacije u odnosu na kontrolu (100%). Statistička značajnost je testirana dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA) sa prisustvom endotela (E+ sa i E- bez endotela) i koncentracijom pinacidila kao faktorima na logaritamski transformisanim podacima. ED<sub>50</sub> vrijednosti su date kao srednje vrijednosti (SD nije bilo moguće izračunati zbog velikih odstupanja u efektima pojedinačnih koncentracija). Krive se ne mogu statistički značajno sigmoidalno fitovati ( $\chi^2/\text{DoF}$  nije značajan), te poređenje F-testom nije ni dato.

praga mirovanja ka negativnim vrijednostima, što pokreće kaskadu događaja koji za krajnju posljedicu imaju smanjenje koncentracije intracelularnog Ca<sup>2+</sup> i relaksaciju glatkih mišića [15]. Kaskadna reakcija koja dovodi do relaksacije uključuje najprije zatvaranje voltažno zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala (vjеровatno T tipa) i time smanjenje ulaska Ca<sup>2+</sup> u ćeliju. Naredni korak je smanjeno stvaranje inozitol-trifosfata (IP3) i inhibicija oslobađanja Ca<sup>2+</sup> iz IP3 osjetljivih Ca<sup>2+</sup> depoa, uz smanjenje osjetljivosti kontraktilnih elemenata za Ca<sup>2+</sup> i povećanje frakcije Ca<sup>2+</sup> vezanog za membranu. Pretposljednja stepenica je aktiviranje Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> pumpe i smanjenje jona Ca<sup>2+</sup> u ćeliji, a posljednja aktiviranje sarko/endoplazmatski retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATP-aza (SERCA) pumpe i povratak jona Ca<sup>2+</sup> iz citoplazme u endoplazmatski retikulum [16,17].

Farmakologija pinacidila proučavana je na različitim modelima izolovanih mišića, uključujući srce [18], krvne sudove [3,19,20], traheje [21], bešiku [22], skeletne mišiće [23], kao i neuralnom tkivu [24] i beta ćelijama pankreasa [25].

Pored brojnih studija koje su se bavile efektom pinacidila na krvne sudove, još uvijek nije potpuno razjašnjen mehanizam dejstva ovog otvarača kalijumovih kanala. Ghaleh i saradnici [26] su ispitivali relaksantni efekat pinacidila na koronarne arterije psa. Njihovi rezultati ukazuju da je odgovor na pinacidil endotel zavisian, jer je uklanjanjem endotela efekat pinacidila smanjen na 76%. Nasuprot tome, Gollash i saradnici [27] su u studiji na humanoj koronarnoj arteriji dobili da je efekat pinacidila endotel nezavisian. Takođe, Stojnic i saradnici [4] su ispitivali dejstvo pinacidila na humanoj radijalnoj arteriji i njihovi rezultati ukazuju da pinacidil ima endotel nezavisian mehanizam dejstva. Dosadašnja eksperimentalna istraživanja nisu u dovoljnoj mjeri dala odgovor na pitanje učešća endotela i/ili interakcije endotela sa  $K^+$  kanalima u dilatatornom dejstvu pinacidila na mezenteričnoj i renalnoj arteriji pacova. Imajući u vidu prisutnost  $K^+$  kanala u vaskularnom tkivu i značaj njihove uloge u regulaciji tonusa krvnih sudova, kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima, bilo je od interesa ispitati ulogu endotela u dejstvu pinacidila, otvarača  $K^+$  kanala, na izolovanoj mezenteričnoj i renalnoj arteriji pacova.

Našu studiju smo započeli ispitivanjem dejstva pinacidila na mezenteričnoj i renalnoj arteriji izolovanoj od normotenzivnih, kao i spontano hipertenzivnih pacova. Pokazali smo da pinacidil u *in vitro* uslovima izaziva koncentracijski zavisnu relaksaciju mezenterične i renalne arterije, kako kod normotenzivnih, tako i kod spontano hipertenzivnih pacova. Kod mezenteričnih arterija uzetih od normotenzivnih pacova se pokazalo da efekat pinacidila zavisi od prisustva endotela, dok kod HT pacova, u ovom eksperimentalnom modelu, naprotiv, endotel ima daleko manji značaj za efekat pinacidila. Kinetika koncentracijski zavisnog dejstva pinacidila na mezenterične arterije i NT i HT pacova je slična. Njihovo poređenje F-testom je ponovo pokazalo da postoje statistički značajne razlike efekta pinacidila u odnosu na prisustvo endotela, s tim što je uticaj endotela kod NT pacova veoma visok u odnosu na HT pacove kod kojih je na granici signifikantnosti. Naša ispitivanja efekta pinacidila na renalnim arterijama su dala slične rezultate kao i na mezenteričnim. Naime, i kod renalnih arterija izolovanih od normotenzivnih pacova smo pokazali da uklanjanje endotela

dovodi do statistički značajnog povećavanja efektivne koncentracije pinacidila potrebne za relaksaciju, tj. zaključili smo da je efekat pinacidila na izolovanim renalnim arterijama uzetim od normotenzivnih pacova endotel zavisian. Nešto drugačiji rezultat smo dobili na renalnim arterijama spontano hipertenzivnih pacova. Jedino na ovom modelu, kako naši rezultati ukazuju, endotel nema uticaj na efekat pinacidila, tj. nema statistički značajnih razlika za efekat endotela za opseg koncentracija koji je korišten. Iako rezultati ukazuju da efekat endotela nije značajan, ovaj nalaz treba uzeti sa rezervom, budući da su dobijene vrijednosti za krivu efekta pinacidila velikog opsega, a i jedna manje koncentracija je korištena u eksperimentu, pa tako ni samo statističko poređenje u ovom slučaju nije bilo potpuno.

U ispitivanju dejstva natrijum nitroprusida na izolovane mezenterične arterije uzete od normotenzivnih i spontano hipertenzivnih pacova, Oreščanin i sar. [12] su zaključili da je efekat ovog donora NO-a izraženiji kod NT, nego kod HT pacova.

Smanjenje vazodilatatornog efekta pinacidila u uslovima kada je endotel uklonjen ukazuje da mehanizam djelovanja pinacidila zavisi od endotela. Manji uticaj endotela na efekat pinacidila kod preparata uzetih od HT pacova pretpostavljamo da je posljedica složenog adaptacionog procesa koji se pod uticajem hipertenzije dešava u zidu krvnog suda. Hipertenzija može da indukuje promjene kako u endotelnom sloju krvnog suda, tako i u glatko-mišićnom sloju (tunica media). Nastale promjene vjerovatno mijenjaju mehanizam relaksacije krvnog suda, kao i ukupnu sposobnost dilatacije vaskularnog tkiva.

Kako smo u diskusiji naših rezultata često morali da se osvrnemo na razlike u efektu pinacidila na izolovanu mezenteričnu i renalnu arteriju pacova, bilo je interesantno da i statistički proanaliziramo razliku efekta pinacidila na ova dva preparata. Iz navedene analize smo zaključili da pinacidil koncentracijski zavisno relaksira i mezenterične i renalne arterije, s tim da je generalno stepen relaksacije veći kod mezenteričnih arterija (ANOVA efekat tipa arterije,  $p < 0,001$ ), pri čemu nema razlike u efektima najniže (nema relaksacije) i najviše (potpuna relaksacija) upotrijebljene doze (ANOVA, efekat interakcije,  $p < 0,001$ ). Kinetika relaksacije je slična, krive statistički značajno sigmoidalno

fituju, ali je efekat pinacidila kod mezenteričnih arterija pomjeren ka nižim koncentracijama i većem relaksantnom efektu (F-test,  $p < 0,05$ ). Kada se arterijama odstrani endotel, koncentracijski zavisni efekat pinacidila ostaje (ANOVA, efekat pinacidila  $p < 0,0001$ ), ali je uticaj vrste arterija donekle smanjen (ANOVA, efekat tipa arterije,  $p < 0,05$ , i interakcija  $p < 0,05$ ). Međutim, krive i tada statistički značajno sigmoidalno fituju, a razlika između efikasnosti pinacidila kod mezenteričnih i renalnih arterija ostaje (F-test,  $p < 0,01$ ). Ova razlika ide u prilog pretpostavci da je efekat pinacidila ne samo *species*, već i tkivno specifičan. Moguće je da pored NO, u mehanizmu relaksantnog efekta pinacidila učestvuje i EDHF, pošto se zna da je uloga ovog endotelnog faktora, još uvijek neutvrđene hemijske strukture, veća u mezenteričnim, nego renalnim krvnim sudovima.

## Zaključak

Pinacidil je otvarač kalijumskih kanala koji izaziva koncentracijski zavisnu relaksaciju izolovanih renalnih i mezenteričnih arterija pacova sa i bez endotela, uzetih od normotenzivnih i spontano hipertenzivnih pacova. Relaksacija je izraženija kada je očuvan endotel, a uticaj endotela je manje izražen kod hipertenzivnih, nego kod normotenzivnih životinja. Stepen relaksacije je veći kod mezenteričnih, nego kod renalnih arterija. Polne razlike ne utiču na efekat pinacidila. Pinacidil koncentracijski zavisno relaksira mezenterične arterije, bez obzira da li su arterije uzete iz mužjaka ili ženki pacova.

Autori izjavljuju da nemaju sukob interesa.  
The authors declare no conflicts of interest.

## Literatura

- Al-Ansary LA, Tricco AC, Adi Y, et al. A Systematic Review of Recent Clinical Practice Guidelines on the Diagnosis, Assessment and Management of Hypertension. *Plos ONE* 2013; 8(1): e53744.
- Viera AJ. Resistant Hypertension. *J Am Board Fam Med* 2012;25:487-95.
- Jahangir A, Terzic A. KATP channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39(1):99-112.
- Stojnic N, Gojkovic-Bukarica L, Peric M, et al. Potassium Channel Opener Pinacidil Induces Relaxation of the Isolated Human Radial Artery. *J Pharmacol Sci* 2007;104(2):122-29.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000;52(4):557-94.
- Wickenden AD, Kaprielian R, Parker TG, Jones OT, Backx PH. Effects of development and thyroid hormone on K<sup>+</sup> currents and K<sup>+</sup> channel gene expression in rat ventricle. *J Physiol* 1997;504:271-86.
- Martens JR, Gelband CH. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K<sup>+</sup> channels in genetic and nongenetic mechanisms. *Circ Res* 1996;79:295-301.
- Kim NR, Han J, Kim EY. Altered delayed rectifier K<sup>+</sup> current of rabbit coronary arterial myocytes in isoproterenol-induced hypertrophy. *Korean J Physiol Pharmacol* 2001;5:33-40.
- Wellman GC, Cartin L, Eckman DM, et al. Membrane depolarization, elevated Ca<sup>2+</sup> entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(6):H2559-67.
- Ghosh M, Hanna ST, Wang R, McNeill JR. Altered vascular reactivity and KATP channel currents in vascular smooth muscle cells from deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:525-31.
- Liu Y, Hudetz AG, Knaus HG, Rush NJ. Increased expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in the cerebral microcirculation of genetically hypertensive rats: evidence for their protection against cerebral vasospasm. *Circ Res* 1998;82:729-37.
- Orešćanin Z, Milovanović S, Spasić S, Jones D, Spasić M. Different responses of mesenteric artery from normotensive and spontaneously hypertensive rats to nitric oxide and its redox congeners. *Pharmacol Report* 2007;59:325-32.
- Hinkle ED, Wiersma W, Jurs GS. *Applied Statistics for Behavioral Sciences*. 3rd ed. Boston: Houghton Mifflin; 1994.
- Manley BFJ. *Multivariate Statistical Methods*. London: Chapman & Hall; 1986.
- Bray KM, Quast U. A specific binding site for K<sup>+</sup> channel openers in rat aorta. *J Biol Chem* 1992;267:11689-92.
- Gomez-Viquez L, Guerrero-Serna G, Garcia U, Guerrero-Hernandez A. SERCA pump optimizes Ca<sup>2+</sup> release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells. *Biophys J* 2003;85(1):370-80.
- Sanborn BM, Ku CY, Shlykov S, Babich L. Molecular signaling through G-protein coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12(7):479-87.
- Escande D, Thuringer D, Le Guern S, Courteix J, Laville M, Caverio I. Potassium channel openers act through an activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in guinea-pig cardiac myocytes. *Pflugers Arch* 1989;414(6):669-75.
- Jovanović A, Gojković LJ, Kažić T, Grbović L, Tulic I. Relaxation of human uterine artery in response to

- pinacidil : predominant role for ATP - dependent potassium channels. Arch Int Pharmacodyn Ther 1994;327:344-54.
20. Gojković-Bukarica L, Kažić T. Differential effects of pinacidil and levromakalim on the contractions elicited electrically or by noradrenaline in the portal vein of the rabbit. Fundam Clin Pharmacol 1999;13:527-34.
  21. Allen SL, Boyle JP, Cortijo J, Foster RW, Morgan GP, Small RC. Electrical and mechanical effects of BRL34915 in guinea-pig isolated trachealis. Br J Pharmacol 1986; 89(2):395-405.
  22. Anderson GF, Navarro SP. The response of autonomic receptors to castration and testosterone in the urinary bladder of the rabbit. J Urol 1988; 140(4):885-9.
  23. Weik R, Neumcke B. Effects of potassium channel openers on single potassium channels in mouse skeletal muscle. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1990;342(3):258-63.
  24. Tremblay E, Zini S, Been-Ari Y. Autoradiographic study of the cellular localization of (3H) glibenclamide binding sites in the rat hippocampus. Neurosci Lett 1991;127(1):21-4.
  25. Plant TD, Henquin JC, Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse pancreatic beta- cells. Br J Pharmacol 1990;101(1):115-20.
  26. Ghaleh B, Dubois-Randé JL, Hittinger L, Giudicelli JF, Berdeaux A. Comparison of the effect of nicorandil, pinacidil, nicardipine and nitroglycerin on coronary vessels in the conscious dog: role of endothelium. Br J Pharmacol 1995;114:496-502.
  27. Gollasch M, Bychkov R, Ried C, et al. Pinacidil relaxes porcine and human coronary arteries by activating ATP-dependent potassium channels in smooth muscle cells. J Pharmacol Exp Ther 1995;275:681-92.

## Role of sex and endothelium in the relaxing effect of pinacidil on isolated blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats

Dragana Drakul<sup>1</sup>, Dragana Sokolović<sup>1</sup>, Nataša Miletić<sup>1</sup>, Milan Kulić<sup>1</sup>, Stevanka Djordjević<sup>1</sup>, Vladimir Lj Jakovljević<sup>2</sup>, Slobodan R Milovanović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medicine Foča, University of East Sarajevo, the Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

<sup>2</sup>Institute of Physiology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia

**Introduction.** Subtype, expression, distribution and functioning of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscles are variable and probably depend on endothelium preservation, nitric oxide (NO) and pathological conditions as hypertension. We examined the influence of potassium channel modulators and their interaction with NO on blood vessels. This examination is important for finding new therapeutic opportunities for treatment of contractility blood vessels disturbance. The aim of the study was to examine the role of sex, endothelium and hypertension on pinacidil relaxant effects on the isolated mesenteric and renal arteries, taken from normotensive (NT) and spontaneously hypertensive (HT) rats.

**Methods.** The experiments were performed on mesenteric and renal arteries, isolated from male and female Wistar rats. We used NT and HT rats. Arteries were incubated for 30 minutes in organ bath chambers containing Krebs-Ringer bicarbonate solution, at 36°C, and bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Contractions of blood vessels were caused by phenylephrine (10<sup>-6</sup> mol) and pinacidil (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-4</sup>M) was added on the stable tonus. Functional integrity of the endothelium was confirmed by acetylcholine (10<sup>-5</sup> mol).

**Results.** Pinacidil relaxed mesenteric arteries in a concentration dependant way, regardless of whether the arteries were taken from male or female rats. Relaxing effect of pinacidil was more expressed on artery segments with endothelium. Importance of endothelium was less expressed in blood vessels taken from HT than NT rats. Relaxation degree was higher in mesenteric than renal arteries.

**Conclusion.** Pinacidil (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-4</sup> mol) caused concentration and endothelium dependant relaxation of isolated renal and mesenteric rat arteries, taken from NT and HT rats, regardless of sex.

**Keywords:** pinacidil, renal artery, mesenteric artery, endothelium, hypertension