

Univerzitet u Beogradu

Medicinski fakultet

Dr Jelena Roganović

**MODULATORNA ULOGA AZOT MONOKSIDA U
MUSKARINSKOJ VAZODILATACIJI I SEKRECIJI
PAROTIDNE ŽLEZDE KUNIĆA SA DIJABETESOM**

Doktorska disertacija

Mentor:

prof. dr Miroslav Radenković

Komentor:

prof. dr Dragica Stojić

Beograd, 2011.

SADRŽAJ

SAŽETAK	5
SUMMARY	6
UVOD	8
FIZIOLOŠKI I PATOFIZIOLOŠKI ASPEKTI MODULATORNE ULOGE AZOT MONOKSIDA U KRVNIM SUDOVIMA	9
NO KAO NEUROMODULATOR U PLJUVAČNIM ŽLEZDAMA	14
NO I VAZODILATACIJA	14
NO I SEKRECIJA PLJUVAČKE	17
NO I PLJUVAČNE ŽLEZDE U DIJABETESU	22
CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
MATERIJAL I METOD	27
EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE I INDUKCIJA DIJABETESA	28
EKSPERIMENTALNI PROTOKOL	28
<i>IN VIVO</i> EKSPERIMENTI	28
<i>IN VITRO</i> EKSPERIMENTI	29
<i>IZOMETRIJSKA MERENJA PROMENA U REAKTIVNOSTI PAROTIDNE ARTERIJE IZAZVANE DIJABETESOM I PRIMENOM VAZOAKTIVNIH SUPSTANCI</i>	29
<i>KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE mRNK iNOS PRIMENOM REAL-TIME RT-PCR U IZOLOVANIM PAROTIDNIM ARTERIJAMA I ŽLEZDAMA</i>	31
<i>ODREĐIVANJE BAZALNIH KONCENTRACIJA cGMP U TKIVU PAROTIDNE ARTERIJE I ŽLEZDE IMUNOESEJSKOM TEHNIKOM (ELISA)</i>	34
OBRADA REZULTATA	34
SUPSTANCE	36
REZULTATI	38

VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA NA IZOLOVANOJ PAROTIDNOJ ARTERIJI KUNIĆA	39
VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA NA KONTROLNIM ARTERIJSKIM SEGMENTIMA PREKONTRAHOVANIM FENILEFRINOM	39
<i>VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU INHIBITORA NO SINTAZE</i>	39
<i>VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU INDOMETACINA I VISOKIH KONCENTRACIJA KALIJUMA</i>	40
<i>VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU SELEKTIVNIH ANTAGONISTA MUSKARINSKIH RECEPTORA</i>	41
VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA NA ARTERIJAMA PREKONTRAHOVANIM FENILEFRINOM KOD KUNIĆA SA DIJABETESOM	43
<i>VAZOKONTRAKTILNI EFEKT FENILEFRINA NA IZOLOVANOJ PAROTIDNOJ ARTERIJI KUNIĆA SA DIJABETESOM</i>	43
<i>VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU INHIBITORA NO SINTAZE NA ARTERIJAMA KUNIĆA SA DIJABETESOM</i>	43
<i>VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU INDOMETACINA I VISOKIH KONCENTRACIJA KALIJUMA NA ARTERIJAMA KUNIĆA SA DIJABETESOM</i>	45
<i>INHIBITorni EFEKTI ANTAGONISTA NA VAZORELAKSACIJI IZAZVANOJ ACETILHOLINOM U DIJABETESU</i>	46
<i>VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU SELEKTIVNIH ANTAGONISTA MUSKARINSKIH RECEPTORA NA ARTERIJAMA KUNIĆA SA DIJABETESOM</i>	47
SEKRETORNA AKTIVNOST PAROTIDNE PLJUVAČNE ŽLEZDE KUNIĆA	51
SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PAROTIDNOJ ŽLEZDI KONTROLNIH KUNIĆA	51
<i>SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PRISUSTVU INHIBITORA NO SINTAZE</i>	51
<i>SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PRISUSTVU SELEKTIVNIH ANTAGONISTA MUSKARINSKIH RECEPTORA</i>	52
<i>EFEKTI SELEKTIVNIH MUSKARINSKIH ANTAGONISTA NA PAROTIDNU SEKRECIJU IZAZVANU KARBAHOLOM (1μmol/kg)</i>	54
SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PAROTIDNOJ ŽLEZDI KUNIĆA SA DIJABETESOM	55
<i>SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PRISUSTVU INHIBITORA NO SINTAZE KOD KUNIĆA SA DIJABETESOM</i>	55
<i>INHIBITorni EFEKTI INHIBITORA NO SINTAZE NA PAROTIDNOJ SEKRECIJI IZAZVANOJ KARBAHOLOM U DIJABETESU</i>	57
<i>SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PRISUSTVU SELEKTIVNIH ANTAGONISTA MUSKARINSKIH RECEPTORA KOD KUNIĆA SA DIJABETESOM</i>	58
<i>EFEKTI SELEKTIVNIH MUSKARINSKIH ANTAGONISTA NA PAROTIDNU</i>	

<i>SEKRECIJU IZAZVANU KARBAHOLOM (1μmol/kg) KOD KUNIĆA SA DIJABETESOM</i>	59
mRNK iNOS U IZOLOVANOJ PAROTIDNOJ ARTERIJI I PAROTIDNOJ ŽLEZDI KONTROLNIH I KUNIĆA SA DIJABETESOM	61
VALIDACIJA KONSTITUTIVNIH GENA ZA ENDOGENE KONTROLE	61
EKSPRESIJA mRNK iNOS U PAROTIDNOJ ARTERIJI I PAROTIDNOJ ŽLEZDI	61
BAZALNE KONCENTRACIJE cGMP U IZOLOVANOJ PAROTIDNOJ ARTERIJI I PAROTIDNOJ ŽLEZDI KONTROLNIH I KUNIĆA SA DIJABETESOM	63
DISKUSIJA	64
ZAKLJUČCI	76
LITERATURA	79

SAŽETAK

Cilj ovog rada je bio da se na eksperimentalnom modelu kunića ispita uticaj dijabetes melitusa tipa 1, izazvanog jednom intravenskom injekcijom aloksana (100mg/kg), na vaskularni tonus parotidne arterije, koja ishranjuje parotidnu žlezdu i sekretornu aktivnost ove žlezde, izazvane stimulacijom holinergičkih muskarinskih receptora (acetilholinom –ACh, odnosno karbaholom).

Vazorelaksantni efekt je registrovan izometrijskim promenama u tonusu arterijskih prstenova, a protok pljuvačke je registrovan sakupljanjem pljuvačke posle intravenske primene karbahola.

Takođe, u tkivu parotidne arterije i žlezde kvantifikovana je: ekspresija mRNK iNOS, metodom Real-time RT-PCR, i bazalna koncentracija cGMP, imunoesejskom metodom (ELISA).

Dobijeni rezultati pokazuju da ACh izaziva koncentracijski i endotelno-zavisnu relaksaciju parotidne arterije koja je značajno manja na arterijama kunića sa dijabetesom u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Šildova analiza efekta ACh, u prisustvu selektivnih muskarinskih antagonista, pokazuje da su samo M₃ receptori uključeni u ovaj efekt ACh, i to kako kod kontrolnih tako i kod kunića sa dijabetesom. Inhibitorni efekti indometacina, neselektivnog inhibitora COX, i visokih koncentracija kalijuma na vazorelaksantnom dejstvu ACh rastu, a efekt L-NOARG, neselektivnog inhibitora NOS, se smanjuje na parotidnim arterijama kunića sa dijabetesom. Takođe, primena SMT, selektivnog inhibitora iNOS, značajno smanjuje vazorelaksantni efekt ACh samo na parotidnim arterijama kunića sa dijabetesom. Karbahol prouzrokuje dozno-zavisno povećanje sekrecije parotidne pljuvačke, koja je značajno smanjena u dijabetesu. Funkcionalna ispitivanja primenom selektivnih muskarinskih antagonista pokazuje učešće samo M₃ receptora u parotidnoj sekreciji, izazvanoj karbaholom, i to kako kod kontrolnih tako i kod kunića sa dijabetesom. Takođe, u tkivu parotidne arterije i žlezde kunića sa dijabetesom značajno se povećava ekspresija mRNK iNOS kao i bazalne koncentracije cGMP. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da smanjenje vazorelaksantnog efekta ACh na parotidnoj arteriji, i sekretornog efekta karbahola na parotidnoj žlezdi kunića sa dijabetesom su posledica poremećaja u signalnim transdukcionim mehanizmima vezanim za aktivaciju holinergičkih M₃ receptora: poremećene ravnoteže između aktivnosti pojedinih NOS izoformi, a nisu posledica promena na nivou afiniteta i broja M₃ muskarinskih receptora.

MODULATORY ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE MUSCARINIC RECEPTOR-INDUCED VASODILATION AND SECRETION IN THE PAROTID GLAND OF DIABETIC RABBIT

SUMMARY

The aim of this study was to assess, on the experimental model of rabbit, the effect of type 1 diabetes mellitus (induced by a single intravenous injection of 100 mg kg⁻¹ of alloxan) on vascular tonus of parotid artery, feeding artery for parotid gland, and secretory activity of this gland, induced by stimulation of cholinergic muscarinic receptors (by acetylcholine -ACh and carbachol, respectively). Vasorelaxant effect was investigated by isometric force measurements in parotid artery rings while salivary flow was registered collecting the saliva after iv application of carbachol. Quantification of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression was made in rabbit parotid artery and gland by Real-time RT-PCR. Also, basal tissue concentrations of cGMP in parotid artery and gland were determined by ELISA.

Acetylcholine induced concentration- and endothelium-dependent vasorelaxation that was significantly decreased in parotid artery rings from diabetic rabbit compared to controls. Schild analysis of the ACh vasorelaxant effect, in the presence of selective muscarinic receptor antagonists, revealed involvement of the M₃ receptor subtype in parotid artery rings from both control and diabetic rabbits, with no change in antagonist affinity constants. The inhibitory effects of indomethacin, a non-selective inhibitor of cyclooxygenase, and of high potassium, an inhibitor of hyperpolarization, on ACh vasorelaxation were increased. The effect of L-NOARG, a non-selective inhibitor of NOS, was decreased in diabetic parotid artery while SMT, a selective inhibitor of iNOS, significantly reduced ACh vasorelaxation only in parotid artery rings from diabetic rabbits. Carbachol induced dose-dependent increase in parotid gland secretion, being significantly reduced in the diabetic rabbits. Functional studies with the selective muscarinic receptor antagonists revealed involvement of the solely M₃ receptor subtype in carbachol-induced

parotid gland secretion from both control and diabetic rabbits. Inhibitory effects of N^G , a selective inhibitor of nNOS, as well as of L-NOARG and SMT on carbachol-induced parotid secretion were increased in diabetes. Also, up-regulation of iNOS mRNA expression and basal cGMP concentration were detected in parotid artery rings and glands from diabetic rabbits. These results suggest that decreased vasorelaxant effect of ACh in parotid artery and sialogogue effect of carbachol in parotid gland of diabetic rabbits are the consequence of impaired signal transduction mechanisms related to activation of cholinergic M_3 receptors: disturbed balance between different NOS isoforms, but not a consequence of altered affinity and number of M_3 receptors.

UVOD

FIZIOLOŠKI I PATOFIZIOLOŠKI ASPEKTI MODULATORNE ULOGE AZOT MONOKSIDA U KRVNIM SUDOVIMA

Azot monoksid (NO) učestvuje u velikom broju kako fizioloških tako i patoloških procesa, u različitim biološkim sistemima. Pored presudne uloge u kontroli vaskularne hemodinamike, NO je i neurotransmiter ili neuromodulator u centralnom i perifernom nervnom sistemu, kao i modulalator u nespecifičnim mehanizmima imunološke odbrane organizma. Pored ovih značajnih fizioloških uloga, NO je uključen u patogenezu brojnih inflamatornih i autoimunih bolesti kao i kancerogenezu (Michel i Vanhoutte, 2010; Singh i Gupta, 2011; Pate i sar., 2010).

U kontroli vaskularne hemodinamike, NO reguliše tonus krvnih sudova i procese angiogeneze. U regulaciji tonusa krvnih sudova, pored NO učestvuje niz faktora poreklom iz endotela, i to vazorelaksantnog i antikoagulantnog dejstva, kao što su prostaciklin (Pgi_2) i endotelni hiperpolarišući faktor (EDHF), ali i vazokonstriktornog i prokoagulantnog dejstva, među kojima su najznačajniji endotelin 1, tromboksan A_2 i kiseonični radikali. U fiziološkom stanju, postoji ravnoteža između ovih vazorelaksantnih i vazokonstriktornih faktora koja doprinosi održavanju optimalnog dijametra krvnog suda i adekvatne perfuzije tkiva, dok u vaskularnoj bolesti, ravnoteža u stvaranju endotelnih faktora je narušena zbog poremećene funkcije endotela. Disfunkcija endotela je stanje koje karakteriše poremećaj u stvaranju vazorelaksantnih i vazokonstriktornih endotelnih faktora, tako da dominantni postaju mehanizmi vazokonstrikcije, povećane permeabilnosti krvnih sudova i agregacije trombocita. Ovakve funkcionalne promene su osnov za strukturalno "remodelovanje" zidova krvnog suda, paralelno sa ubrzanim procesima ateroskleroze i povećanim rizikom od ishemičnih komplikacija organa čija je makro-i mikrocirkulacija narušena ovim procesima (Spinetti i sar., 2008).

Poznato je da pored endotelnih ćelija, u regulaciji protoka krvi značajnu ulogu imaju i cirkulišuće endotelne progenitorne ćelije, poreklom iz koštane srži. Pošto je njihova osnovna uloga vezana za procese neovaskularizacije i reendotelizacije, smatra se da smanjenje njihovog broja ili funkcije negativno utiče na regeneraciju i životni vek endotelnih ćelija i tako doprinosi disfunkciji endotela (Urbich i Dimmeler, 2004). Najraniji znak i značajan marker endotelne disfunkcije je smanjenje bioaktivnosti NO, usled smanjenog stvaranja i/ili povećane razgradnje NO u prisustvu slobodnih kiseoničnih radikala, kao i pojave rezistencije vaskularnog glatkog mišića prema normalnoj ili povećanoj sintezi endotelnog NO (Bojunga i sar., 2004).

NO se sintetiše iz L-arginina u prisustvu molekularnog kiseonika, pod dejstvom NO sintaze (NOS) u reakciji koja zavisi od NADPH i kofaktora, flavin adenin dinukleotida (FAD), flavin adenin mononukleotida (FMN) i tetrahidrobiopterina. Prema izvoru razlikuju se tri izoforme NOS: endotelna, neuralna i inducibilna. Endotelna NOS (eNOS ili NOS 3) se nalazi u endotelnim ćelijama, trombocitima i neuronima i sintetiše NO kao odgovor na povećanje intraćelijske koncentracije kalcijuma izazvano stimulacijom receptora (Michel i Feron, 1997). Neuralna NOS (nNOS ili NOS 1) je prisutna u neuronima, skeletnim mišićima i epitelnim ćelijama i njena aktivnost, takođe zavisi od koncentracije kalcijuma u ćeliji (Michel i Vanhoutte, 2010). Inducibilna NOS (iNOS ili NOS 2) se stvara u makrofagima, monocitima i endotelnim ćelijama pod dejstvom citokina i bakterijskih endotoksina, i za njenu aktivaciju nije potrebno prisustvo Ca^{2+} (Michel i Vanhoutte, 2010). Savremena istraživanja ukazuju da kvantitativno određivanje ekspresije gena za ove enzime pruža dobar uvid u molekularni nivo fizioloških i patofizioloških mehanizama kompleksnog dejstva NO u velikom broju sistema organa (Kleinert i sar., 2004). eNOS i nNOS su konstitutivno eksprimirani enzimi koji sintetišu NO periodično, dok se ekspresija iNOS indukuje u odgovoru na citokine, kao što su bakterijski lipopolisaharid, interferon γ i interleukini, i tada, sintetiše velike količine NO satima, ili čak, i danima (Kleinert i

sar., 2004.). Faktori koji inhibišu ekspresiju iNOS su faktor transformacije rasta β (transforming growth factor- β , ili TGF- β), ali i imunosupresivni lekovi kao što su glikokortikoidi i ciklosporin. Značajan regulator ekspresije iNOS je i gen supresije tumora- p53, koji u slučaju povećane ćelijske koncentracije NO inhibiše iNOS mehanizmom negativne povratne sprege, i tako sprečava porast koncentracije NO iznad kritične vrednosti koja bi delovala stimulatorno na rast tumora (Singh i Gupta, 2011). Treba napomenuti da je kod ljudi, iNOS konstitutivno eksprimirana u epitelu gornjeg respiratornog trakta, keratinocitima kože, ali i u izvodnim kanalima pljuvačnih žlezda, a pretpostavlja se da produženo stvaranje NO, aktivacijom iNOS u ovim tkivima u fiziološkim uslovima, doprinosi nespecifičnoj odbrani od mikroorganizama (Brennan i sar., 2003). U nekim patološkim stanjima, kao što je, na primer, dijabetes, iNOS, iako značajno doprinosi endotelnoj disfunkciji, ima i zaštitnu ulogu u očuvanju kardiovaskularne i renalne funkcije jer se suprotstavlja hipertenzivnim efektima aktiviranog renin-angiotenzin sistema (Nagareddy i sar., 2005). S druge strane, pojačano stvaranje NO posredstvom iNOS je uključeno u nastanak i pogoršanje velikog broja inflamatornih i autoimunih bolesti čoveka, kao što su astma, artritis, multipla skleroza, kolitis, psorijaza, neurodegenerativne bolesti i tumori (Bogdan, 2001; Kroncke i sar., 1998), a jedan od najverovatnijih patofizioloških mehanizama kojim iNOS učestvuje u nastanku ovih bolesti je oksidativni stres (Kleinert i sar., 2004).

Hemijska struktura NO, kao veza jednog atoma azota i jednog atoma kiseonika, karakteriše se postojanjem jednog nesparenog elektrona, što molekul NO čini visoko reaktivnim kiseoničkim radikalom. Reaktivni kiseonični radikali, kao derivati molekularnog kiseonika, su rezultat aerobnih procesa u ćelijama i brzo se inaktiviraju u prisustvu superoksid dizmutaza, katalaza ili glutathion peroksidaza, enzima koji čine antioksidativnu zaštitu. U slučaju narušene ravnoteže između stvaranja reaktivnih kiseoničnih radikala i aktivnosti antioksidativnih enzima, dolazi do oksidativnog stresa, koji se smatra osnovnim patofiziološkim mehanizmom nastanka

vaskularne bolesti. Kritičan momenat u ovom procesu je stvaranje peroksinitrita, iz superoksidnih anjona i NO, a koji je veoma toksičan za ćelijsku DNK (Ding i Triggle, 2005). Takođe, peroksinitritni anjon inhibiše ekspresiju eNOS i sintezu prostaciklina što doprinosi daljem poremećaju u funkciji endotela i pogoršanju vaskularne bolesti (Zou i sar., 2004).

U principu, efekti NO se ostvaruju ili, indirektno, aktivacijom transduccionog signala vezanog za cGMP, ili direktnim dejstvom NO na proteinske molekule. Najznačajniji transduccioni signal za efekte NO je stimulacija enzima, solubilne gvanilatne ciklaze i povećanje koncentracije cGMP, koje prati aktivacija cGMP-zavisnih jonskih kanala, cGMP-zavisnih fosfodiesteraza ili cGMP-zavisne protein kinaze (Gewaltig i Kojda, 2002.). Ovaj transduccioni signalni mehanizam prati efekte NO u regulaciji protoka krvi, kao i njegovu modulatornu ulogu u nervnom sistemu (Snyder i Brecht, 1992). S druge strane, NO može i direktno da moduliše aktivnost proteina, procesima direktne nitrozilacije sulfhidril grupa na proteinima i malim molekulima. Pretpostavlja se da je upravo ovaj, cGMP-nezavisni mehanizam, vezan za efekte NO u angiogenezi i njegovu interakciju sa endotelnim faktorom rasta (VEGF) (Lau i Ma, 1996; Gallo i sar., 1998), kao i kompleksnu ulogu NO u kancerogenezi (Gallo i sar., 1998; Thomsen i Miles, 1998).

Prostaciklin (P_{gI}₂) pripada grupi endogenih prostanoida koji nastaje iz arahidonske kiseline u endotelnim ćelijama i ima značajno vazodilatatorno i antiagregaciono dejstvo. Ključni enzim za sintezu endogenih prostanoida je ciklooksigenaza (COX) koja je ili konstitutivno prisutna (COX-1), ili se indukuje u toku zapaljenja (COX-2). Vaskularni efekti prostaciklina su posledica aktivacije receptora na glatkim mišićnim ćelijama krvnog suda, stimulacije adenilatne ciklaze i povećanja koncentracije cAMP, što za posledicu ima relaksaciju glatkog mišića i dilataciju krvnog suda (Mombouli i Vanhoutte, 1999). Međutim, Niwano i sar (2003) su pokazali da prostaciklin povećava ekspresiju eNOS u endotelnim ćelijama goveda i čoveka i da u ovom

efektu učestvuju cAMP i protein kinaza A. Na značajnu interakciju između stvaranja NO i prostaciklina, ukazali su i drugi autori, jer je pokazano da u kulturi endotelnih ćelija, enzimi, NOS i COX, mogu međusobno da modulišu jedna drugoj ekspresiju i stepen aktivnosti (Marcellin-Jimenez i Escalante, 2001; Mollace i sar. 2005). S obzirom da je COX-2 odgovorna za sintezu prostanoida u zapaljenju, i to prostanoida sa najznačajnijim aterogenim potencijalom, prostaglandina E₂, pretpostavilo se da bi selektivni inhibitori COX-2 bili idealni antiinflamatorni lekovi sa antiaterogenim efektima. Međutim, kliničke studije su pokazale da primena selektivnih COX-2 inhibitora ne samo da ne poboljšava vaskularnu disfunkciju, već povećava kardiovaskularni rizik (Mukherjee i sar., 2001; Graham i sar., 2005) što ukazuje na kompleksnu ulogu COX i njenih produkata u održavanju homeostaze kardiovaskularnog sistema. Nedavna istraživanja pokazuju da se u toku vaskularne disfunkcije, u endotelnim ćelijama, glatkim mišićnim ćelijama krvnog suda kao i endotelnim progenitorskim ćelijama indukuje ekspresija COX-2 koji postaje ključni enzim za stvaranje prostaciklina. Na ovaj način, kompenzatorno stvaranje prostaciklina poreklom COX-2 se suprotstavlja aterogenim efektima tromboksana A₂ poreklom COX-1 iz trombocita, i tako sprečava nastanak i progresiju aterogeneze (Kawabe i sar, 2010).

Endotelne ćelije oslobađaju i endotelni hiperpolarizujući faktor (EDHF) koji izaziva vazodilataciju usled hiperpolarizacije ćelijske membrane glatkog mišića, direktnim ili indirektnim otvaranjem K⁺ kanala (Ozkor i Quyyumi, 2011). Za sada se još uvek ne zna tačna struktura EDHF ali nekoliko molekula se smatra kandidatima za EDHF : kalijumovi joni, epoksi-jedinjenja - derivati arahidonske kiseline i vodonik peroksid. Postoji i pretpostavka da EDHF nije hemijski medijator već električni fenomen vezan za transmisiju hiperpolarizacije sa endotelne na ćeliju glatkog mišića krvnog suda posebnim interćelijskim spojevima. Iako u fiziološkim uslovima vazodilatacija izazvana EDHF ne mora biti od primarnog značaja, u mnogim krvnim

sudovima, kada je smanjeno stvaranje NO, EDHF postaje primarni endotelni relaksantni faktor (Bauersachs i sar., 1996). Međutim, u zavisnosti od ispitivanog krvnog suda, smanjena EDHF vazodilatacija može da bude i uzrok endotelne disfunkcije i nastanka vaskularne bolesti, kao što je pokazano na mezenteričnim arterijama pacova sa dijabetesom (Wigg i sar., 2001).

NO KAO NEUROMODULATOR U PLJUVAČNIM ŽLEZDAMA

NO I VAZODILATACIJA

Odnos između protoka krvi u pljuvačnim žlezdama i sekrecije je od velikog značaja ako se zna da vazodilatacija u pljuvačnim žlezdama značajno doprinosi salivaciji. Oba fiziološka procesa su pod kontrolom nervnih, hormonalnih i lokalnih mehanizama koji održavaju adekvatni protok krvi i sekreciju pljuvačke.

Neurovaskularna kontrola pljuvačnih žlezda je kompleksna i obuhvata interakciju tri različita neuronska sistema: simpatičkog, koji deluje posredstvom transmitera i kotransmitera, noradrenalina i NPY, parasimpatičkog, koji deluje preko acetilholina, kao transmitera, i VIP-a i NO, kao kotransmitera, i trigeminalnog senzornog, u čiji dvojni efekt, senzorni i efektorni, su uključeni peptidi kao supstanca P ili neurokinini.

Široka rasprostranjenost NOS-imunoreaktivnih neurona u blizini krvnih sudova u parenhimu velikih pljuvačnih žlezda pacova, mačke, lasice i čoveka (Ceccatelli i sar., 1994; Lohinai i sar., 1995; Alm i sar., 1997; Soinila i sar., 2006) govori u prilog pretpostavci o značajnoj ulozi NO u regulaciji vaskularne funkcije u pljuvačnim žlezdama. Funkcionalne studije su pokazale da bazalno oslobađanje NO značajno doprinosi regulaciji vaskularnog otpora i protoka krvi u submandibularnoj žlezdi mačke (Edwards i Garrett, 1992) i pacova (Vág i sar.,

1998). Učešće NO u vazodilataciji, izazvanoj stimulacijom parasimpatičkih nerava, je ispitivano u *in vivo* uslovima merenja protoka krvi u prisustvu L-NAME, neselektivnog inhibitora NOS. Pokazano je da primena L-NAME značajno smanjuje vazodilataciju, a u manjoj meri, i submandibularnu salivaciju izazvanu stimulacijom parasimpatičkih neurona mačke (Edwards i Garrett, 1993). Pošto je u prisustvu L-NAME, vazodilatatorni efekt redukovao za 75% dok je redukcija sekrecije manja, i iznosi 39%, isti autori su zaključili da je NO značajniji u parasimpatičkoj regulaciji protoka krvi nego sekrecije u submandibularnoj žlezdi mačke (Edwards i Garrett, 1993.). Treba dodati i da su upoređivanjem vrednosti protoka krvi u submandibularnoj i parotidnoj žlezdi mačke, u prisustvu neselektivnog inhibitora NOS, Lohinai i sar. (1996) pokazali značajnije smanjenje protoka u submandibularnoj nego u parotidnoj žlezdi. Ovakav rezultat govori o većem značaju NO u regulaciji protoka krvi u submandibularnoj nego u parotidnoj žlezdi mačke, a kao razlog, Lohinai i sar. (1996) navode verovatnu veću osetljivost glatkog mišića krvnog suda na NO u submandibularnoj u odnosu na parotidnu žlezdu. Poznato je da na velikom broju izolovanih krvnih sudova ACh prouzrokuje endotelno-zavisnu vazodilataciju, posredovanu endotelnim vazodilatatorima: NO, prostaciklinom ili EDHF (Angus i Cocks, 1989; Vane i sar., 1990). Naša istraživanja na izolovanoj glandularnoj grani facijalne arterije koja ishranjuje submandibularnu žlezdu (submandibularnoj arteriji) su pokazala da ACh izaziva endotelno-zavisnu vazorelaksaciju, posredovanu endotelnim faktorima, NO i prostanooidima, ali ne i EDHF (Stojić i sar., 2003). Analogna ispitivanja na humanoj submandibularnoj arteriji su, takođe, pokazala istu endotelnu zavisnost i značajno učešće samo NO i prostaciklina u vazorelaksantnom efektu ACh (Stojić i sar., 2007). Stoga, naši rezultati ukazuju na značaj submandibularne arterije kunića kao dobrog eksperimentalnog modela za analizu vaskularnih efekata ACh kod čoveka, kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima (Stojić i sar., 2007). Naime, koristeći ovaj animalni model pokazali smo da se u uslovima akutne

okluzije karotidne arterije značajno smanjuje vazodilatatorni efekt ACh, prvenstveno zbog smanjenog stvaranja NO poreklom iz endotela. Istovremeno uz smanjenje stvaranja NO iz endotela, raste stvaranje prostanoida u submandibularnoj arteriji kunića u uslovima ishemije izazvane akutnom okluzijom karotidne arterije, dok učešće EDHF nije značajno za vazodilataciju ove arterije ni u kontrolnim ni u uslovima akutne ishemije (Roganović i sar., 2010).

Pored uticaja na holinergičku komponentu, NO utiče i na peptidergičku komponentu parasimpatičke vazodilatacije jer je pokazano da primena L-NAME smanjuje vazodilatatorni efekat VIP-a u submandibularnoj žlezdi mačke (Edwards i Garrett, 1993) i svinje (Modin i sar., 1994). Uloga NO je u ovom procesu kompleksna, i obuhvata regulaciju kako na presinaptičkom tako i na postsinaptičkom nivou u pljuvačnim žlezdama. Naime, Modin i sar. (1994) su pokazali da primena L-NAME smanjuje oslobađanje VIP-a iz parasimpatičkih nervnih završetaka u submandibularnoj žlezdi svinje. Isti autori su pretpostavili da je ova presinaptička modulacija efekta VIP-a u pljuvačnim žlezdama, najverovatnije, posledica modulacije protoka Ca^{2+} kroz ćeliju i egzocitoze sinaptičkih vezikula od strane NO. Na postsinaptičkom nivou, značajna je interakcija između osnovnih signalnih molekula uključenih u aktivaciju NO i VIP-a, cGMP i cAMP. Naime, posle primene ACh, sledstvenu aktivaciju NOS i porast cGMP prati inhibicija enzima fosfodiesteraze III u glatkom mišiću krvnog suda. Fosfodiesteraza III je enzim koji razgrađuje cAMP, i inhibicija njenog dejstva za posledicu ima nagomilavanje cAMP i relaksaciju glatkog mišića krvnog suda. Ako se ima u vidu da aktivaciju receptora za VIP na glatkim mišićnim ćelijama prati stvaranje cAMP, kao sekundarnog glasnika, i relaksacija krvnog suda, jasno je da NO, preko cGMP, utiče na vazorelaksaciju izazvanu VIP-om, i postsinaptički, na nivou sekundarnog glasnika (Modin i sar., 1994).

Pored NO, i drugi endotelni vazodilatatori, prostaciklin i EDHF, mogu značajno da doprinesu parasimpatičkoj vazodilataciji u pljuvačnim žlezdama, kao što je pokazano u

submandibularnoj žlezdi pacova (Anderson i sar., 2006). Naime, merenjem protoka krvi kroz submandibularnu žlezdu, u prisustvu inhibitora NOS i COX, L-NAME i indometacina, pokazano je da kod muških jedinki, prostaciklin, a kod ženskih, EDHF, značajno doprinose parasimpatičkoj vazodilataciji u pljuvačnoj žlezdi, što je ukazalo na polne razlike u endotelnoj funkciji krvnih sudova u pljuvačnim žlezdama, bar kada je u pitanju pacov. Takođe, isti autori su pokazali da u uslovima smanjenog stvaranja NO, povećanje stvaranja EDHF postaje osnovni kompenzatorni mehanizam u očuvanju vaskularne funkcije u submandibularnoj žlezdi pacova.

Simpatička stimulacija, takođe, ima za posledicu vazodilataciju u pljuvačnim žlezdama. Naime, kontinuiranu i periodičnu stimulaciju simpatičkih neurona prate periodi vazodilatacije za koju je odgovorno oslobađanje NO. Danas se zna da je ovaj efekt posledica oslobađanja noradrenalina sa simpatičkih nervnih završetaka, aktivacije β receptora i stvaranja NO u endotelnim ćelijama (Edwards, 1998). Perivaskularni senzorni neuroni u pljuvačnim žlezdama sadrže peptide, kao što su supstanca P, calcitonine gene-related peptide (CGRP) i neurokinini, koji imaju vazodilatatorne efekte (Morris i sar., 1995). Pokazano je da se u prisustvu L-NAME, značajno smanjuje vazodilatatorni efekt supstance P u submandibularnoj žlezdi pacova, što upućuje na značaj NO i u regulaciji trigeminalne senzorne kontrole funkcije pljuvačnih žlezda (Kerezoudis i sar., 1993).

NO I SEKRECIJA PLJUVAČKE

Sekrecija pljuvačke je prvenstveno pod autonomnom kontrolom, i svaka od velikih pljuvačnih žlezda (parotidna, submandibularna i sublingvalna), u različitoj meri doprinosi količini i sastavu ukupne pljuvačke, u zavisnosti od histoloških i biohemijskih osobina. U submandibularnoj i sublingvalnoj žlezdi se stvara mešovita, mukusna i serozna, a u parotidnoj

čista serozna pljuvačka. Ove različitosti u pogledu sekretornog odgovora u različitim pljuvačnim žlezdama, u velikoj meri, su rezultat tipa i podtipa receptora koji se aktivira kao i specifičnog signalnog transduccionog mehanizma (Rosignoli i Perez-Leiros, 2002). Oslobođanje ACh iz parasimpatičkih nervnih završetaka prati stvaranje veće količine serozne pljuvačke, bogate vodom i solima, dok oslobođanje noradrenalina vodi stvaranju male količine viskozne pljuvačke, bogate proteinima. Holinergički izazvana salivacija se prvenstveno pripisuje aktivaciji muskarinskih M_3 receptora, što su potvrdila imunohistohemijska i funkcionalna ispitivanja u parotidnoj žlezdi (Dai i sar., 1991) i kulturi parotidnih acinusnih ćelija (Bockman i sar., 2001) pacova. S druge strane, u noradrenergičku kontrolu mukusne salivacije su uključeni i α_1 podtip adrenoceptora, odgovoran za sintezu sekreta bogatog mucinom (Bruchas i sar., 2008), i β adrenoceptori, uključeni u egzocitozu i oslobođanje amilaze (Soltoff i Hedden, 2010). Aktivacija M_3 muskarinskih receptora, kao i α_1 adrenoceptora, za rezultat ima povećanje inozitol 1,4,5-trifosfata (IP_3) koji stimuliše povećanje intraćelijskog Ca^{2+} , kojim započinje sekretorni proces ali i aktivacija Ca^{2+} -zavisne NOS, i stvaranje NO (Looms i sar, 2002). Aktivaciju β adrenoceptora prati povećanje cAMP i aktivacija protein kinaze A, koja učestvuje u održavanju homeostaze Ca^{2+} , ali treba napomenuti, i da aktivacija beta receptora, takođe, ima za posledicu stvaranje NO (Tritsaris i sar 2000). Interesantno je da su Rosignoli i Perez-Leiros (2002) pokazale da postoji značajna međusobna regulacija aktivnosti muskarinskog M_3 receptora i enzima NOS u sekretornim procesima u parotidnoj žlezdi pacova, kao i da, na taj način, promene u aktivnosti NOS mogu da utiču na receptorni signalni mehanizam, a samim tim i na promene u funkciji pljuvačnih žlezda. Takođe, istraživanja pokazuju da aktivacija β receptora u acinusnim ćelijama submandibularne i parotidne žlezde pacova deluje aditivno sa aktivacijom muskarinskih receptora, u smislu ukupnog povećanja intraćelijske koncentracije Ca^{2+} (Soltoff i Hedden, 2010).

Uloga NO u sekreciji pljuvačnih žlezda još uvek nije sasvim razjašnjena. Pokazano je da postoje značajne razlike u učešću NO u sekreciji između različitih životinjskih vrsta ali i različitih pljuvačnih žlezda iste vrste. Tako na primer, Mitsui i sar. (1997) su mereći aktivnost Ca^{2+} -zavisne NOS nakon holinergičke stimulacije u parotidnim i submandibularnim žlezdama najčešće korišćenih laboratorijskih animalnih modela: pacova, miša, kunića i zamorca, pokazali da je NOS aktivnost najviša u parotidnoj i submandibularnoj žlezdi kunića. Stoga, isti autori potenciraju značaj ovih pljuvačnih žlezda u odnosu na žlezde drugih ispitanih sisara, kao najprikladnijih modela za ispitivanje mehanizama uključenih u aktivaciju i efekte NOS. S druge strane, funkcionalne studije su potvrdile značajnu ulogu NO u sekreciji izazvanoj stimulacijom parasimpatičkih nerava u submandibularnoj, ali negiraju značaj NO za sekreciju u sublingvalnoj žlezdi pacova (Takai i sar., 1999).

Značaj NO za holinergičku sekreciju u pljuvačnim žlezdama je potvrđen u prisustvu inhibitora NOS, u *in vivo* ispitivanjima sekrecije kada je pokazano da prisustvo L-NAME smanjuje sekreciju izazvanu stimulacijom parasimpatičkih nerava u submandibularnoj žlezdi pacova, mačke i lasice (Takai i sar., 1999; Edwards i sar., 1996; Tobin i sar., 1997). *In vitro* istraživanja, u parotidnim acinusima pacova i kunića su otišla dalje u identifikaciji NOS izoforme uključene u sekretorne procese, i razjašnjavanju uloge NO u ovim procesima. Tako su Ishikawa i sar. (2002) Western blot analizom pokazali da je nNOS eksprimirana u izolovanim parotidnim acinusima pacova i da je aktivacija ovog enzima značajna za proces sekrecije amilaze. S druge strane, istraživanja Tsunode i sar. (2003) u parotidnim acinusima kunića su pokazala da uloga NO u sekretornim procesima nije direktna, već indirektna, modulacijom neurotransmitera. Ovi autori su pokazali da primena L-NAME ima efekt samo na preparatu acinusnih ćelija u prisustvu nervnog tkiva, ali ne i u odsustvu istog, čime su ukazali na mogućnost da NO presinaptički modulira oslobađanje neurotransmitera uključenih u sekreciju amilaze (Tsunoda i sar., 2003).

Učešće NO u sekreciji izazvanoj stimulacijom simpatikusa je i dalje kontraverzno. Naime, dok je ekspresija NOS u parasimpatičkim neuronima pljuvačnih žlezda veoma značajna, u simpatičkim neuronima je ona neznatna (Alm i sar., 1997, Sojnila i sar., 1996). Takođe, Takai i sar. (1999) su pokazali da L-NAME nema uticaja na simpatički izazvanu submandibularnu sekreciju pacova. Ipak, treba napomenuti da je pokazano da u prisustvu L-NAME dolazi do značajnog smanjenja sekrecije proteina, što upućuje na ulogu NO u kontroli sekrecije proteina pljuvačke (Buckle i sar., 1995).

Pretpostavlja se da je značajan izvor NO u žlezdanom tkivu poreklom iz nervnih završetaka u okolini acinusnih ćelija. Međutim, funkcionalna merenja NO sinteze i ekspresije NOS su ukazala na prisutnost NOS u acinusnim ćelijama, i stoga, otvorila pitanje endogene sinteze NO, u samoj acinusnoj ćeliji (Tritsaris i sar., 2000). Ispitivanja Looms i sar. (2002) su pokazala da stimulaciju noradrenergičkih, ali ne i holinergičkih receptora prati aktivacija stvaranja NO i istovremeni porast koncentracije Ca^{2+} u parotidnim acinusima pacova. Pošto primena agoniste β adrenoceptora, ali ne i α , stimuliše stvaranje endogenog NO, isti autori su zaključili da je endogeno stvaranje NO u parotidnim acinusima pacova pod kontrolom β adrenoceptora. Međutim, mehanizam stvaranja endogenog NO u pljuvačnim žlezdama se, po svemu sudeći, razlikuje od vrste do vrste, jer je pokazano da se aktivacija endogene NOS značajno razlikuje u parotidnim acinusima kunića od one u parotidnim acinusima pacova. Naime, Sugiya i sar. (2001) su pokazali da je aktivacija endogene NOS u parotidnim acinusima kunića posredovana muskarinskim receptorima, i da zavisi od prisustva Ca^{2+} . Karakterizacija izoforme endogene NOS u parotidnim žlezdama kunića primenom imunohistohemijskih metoda je pokazala prisustvo nNOS, jer su samo nNOS-, ali ne i eNOS- antitela reagovala sa detektovanom NOS u žlezdama (Sugiya i sar., 2001).

U pljuvačnim žlezdama, transdukциони signal efekta NO predstavlja porast cGMP i sledstvena aktivacija enzima G kinaze, što za posledicu ima oslobađanje jona kalcijuma iz IP_3 - i rianodin-osetljivih intraćelijskih depoa u parotidnim acinusima pacova (Tritsaris i sar., 2000). Značajno je napomenuti da je porast koncentracije Ca^{2+} , u odgovoru na NO, značajno manji u odnosu na odgovor na stimulaciju muskarinskih i adrenergičkih receptora (Looms i sar, 2002). Stoga, isti autori su prepostavili da je stimulacija receptora neophodna za aktivaciju Ca^{2+} -zavisnog transdukcionog signala uključenog u sekreciju u parotidnoj žlezdi pacova, a da NO ima ulogu u modulaciji ovog efekta, najverovatnije, u širenju Ca^{2+} -signala u sekretornoj ćeliji izazvanog stimulacijom receptora. Na ovaj način, NO utiče na produženje trajanja sekretornog odgovora jer je poznato da je receptor/ IP_3 signal kratkog trajanja s obzirom na brzu razgradnju IP_3 (Looms i sar., 2002).

Treba dodati i da postoji pretpostavka da NO, stvoren u acinusnim ćelijama, difunduje u susedne ćelije, krvne sudove i neurone, gde učestvuje u regulaciji njihove funkcije, najverovatnije kao svojevrsni međućelijski glasnik (Ishikawa i sar., 2002). Tako na primer, tokom simpatičke stimulacije pljuvačnih žlezda pacova, difuzija NO iz acinusa može da doprinese savladavanju simpatički izazvane vazokonstrukcije i održavanju adekvatnog protoka krvi i sekrecije (Tritsaris i sar., 2000). S druge strane, acinusni NO učestvuje u presinaptičkoj modulaciji oslobađanja neurotransmitera i peptida iz nervnih završetaka, i na taj način, omogućuje interakciju parasimpatičke i simpatičke komponente u cilju održavanja adekvatne sekretorne funkcije pljuvačnih žlezda (Garrett i Carpenter, 2007). Takođe, endogeno stvoreni NO utiče i na rast i diferencijaciju vaskularnog i nervnog tkiva u okolini žlezde. U tom smislu značajno je da NO povećava ekspresiju mRNK VEGF u glatkom mišiću krvnog suda, a i efekti VEGF, kao što su proliferacija endotelnih ćelija i angiogeneza, zavise od prisustva NO (Papapetropoulos i sar., 1997). NO je prisutan u pljuvački čoveka gde učestvuje u nespecifičnom imunom odgovoru

organizma na prisustvo bakterija, virusa i protozoa, ali i tumorskih ćelija (Whittle, 1995). Na ovaj način, jedna od uloga NO u sekreciji pljuvačnih žlezda je i borba protiv mikroorganizama koji ulaze kroz oralnu šupljinu.

NO I PLJUVAČNE ŽLEZDE U DIJABETESU

Dijabetes je jedna od najznačajnijih bolesti današnjice sa velikim posledicama po opšte i oralno zdravlje. Medicinske komplikacije vezane za dijabetes uključuju: nefropatiju, neuropatiju, retinopatiju, perifernu vaskulopatiju i koronarnu bolest srca (Golden, 2011). Komplikacije vezane za oralno zdravlje su kserostomija, gingivitis, parodontopatija, gubitak zuba, odontogeni apscesi i aftozni stomatitis (Moore i sar., 2001). Kserostomija se karakteriše subjektivnim osećajem suvih usta i povezana je sa smanjenim lučenjem pljuvačke. Pošto je pljuvačka od izuzetnog značaja za održavanje oralne homeostaze kao i za funkcije govora, gutanja i varenja, otkrivanje uzroka i lečenje ovog simptoma značajno bi poboljšalo kvalitet života pacijenata sa dijabetesom.

Histološka ispitivanja uzoraka tkiva parotidnih pljuvačnih žlezda ljudi sa dijabetesom su pokazala niz morfoloških promena, kao što su povećan broj sekretornih granula, promene u intragranularnoj strukturi i hiperplazija izvodnih kanala (Piras i sar., 2010). U eksperimentalnom dijabetesu, izazvanom streptozotocinom, Caldeira i sar. (2005) su pratili efekte tretmana insulinom na strukturne promene u parotidnoj i submandibularnoj žlezdi miša, i zaključili da ove promene koje se, pre svega, ogledaju u ćelijskoj atrofiji, promenama u organizaciji biomembrana kao i u prisustvu inflamatornih ćelija, ostaju značajne i pored dugotrajne primene insulina. Takođe, u parotidnoj i submandibularnoj žlezdi pacova je pokazano da dijabetes utiče na

značajno smanjenje koncentracija proteina i katjona u acinusnim ćelijama (Changrani i sar., 2006), ali i sadržaj i aktivnost funkcionalnih enzima, kakva je cAMP zavisna protein kinaza (Mednieks i sar., 2009). Značajno je istaći da su studije na animalnim modelima sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom pokazale da poremećaji na ćelijskom nivou, u velikoj meri, zavise od dužine trajanja dijabetesa. Tako na primer, Nicolau i sar. (2009) su utvrdili da se već nakon 4 nedelje streptozotocinom izazvanog dijabetesa, u submandibularnoj žlezdi pacova opaža značajno smanjenje koncentracije kalmodulina, proteina za koji se vezuje Ca^{2+} , značajnog signalnog melekula u sekretornom procesu. Na značaj poremećaja transdukcionog signala vezanog za Ca^{2+} u sekretornim procesima u toku dijabetesa, ukazali su i Fedirko i sar. (2006). Ovi autori su u *in vitro* ispitivanjima u acinusnim ćelijama submandibularne žlezde pacova, posle 6 nedelja od streptozotocinom izazvanog dijabetesa, pokazali da je na ćelijskom nivou poremećaj funkcije vezan za prekomerno stimulisano oslobađanje Ca^{2+} , aktivnošću muskarinskih, ali ne i adrenergičkih receptora, kao i smanjenu funkciju Ca^{2+} -ATP-aze i smanjenog sadržaja Ca^{2+} u endoplazmatskom retikulumu (Fedirko i sar., 2006).

Pored morfoloških i funkcionalnih promena u pljuvačnim žlezdama, u dijabetesu se javljaju i značajne promene u protoku krvi kroz žlezde. Anderson i Garrett (2004) su pokazali da posle tri nedelje eksperimentalnog dijabetesa dolazi do značajnih promena u regulaciji protoka krvi kroz submandibularnu žlezdu pacova, kao i da te promene utiču na i parasimpatičku i simpatičku komponentu autonomne kontrole protoka krvi kroz žlezdu. Naime, na ovom eksperimentalnom modelu, dijabetes nije uticao na vazokonstriktorne efekte izazvane simpatičkom stimulacijom, ali je endotelno-zavisna vazodilatacija, kao rezultat i parasimpatičke i simpatičke stimulacije, bila značajno smanjena (Anderson i Garrett, 2004).

Značajan je podatak Witcher-a i sar. (2010) da se smanjena parasimpatička vazodilatacija u submandibularnoj žlezdi pacova u dijabetesu ne razlikuje značajno između polova. Ipak, razlika

postoji u učešću endotelnih faktora u ovom efektu. Naime, autori su pokazali da je kod muških jedinki za nastanak endotelne disfunkcije značajnije smanjenje NO, a kod ženskih smanjenje EDHF (Witcher i sar., 2010).

Imajući u vidu da su dosadašnja istraživanja u vitalnim organima, mozgu, srcu, bubrezima i jetri pokazala da je oksidativni stres osnovni patofiziološki mehanizam nastanka i progresije dijabetičnih komplikacija (Golden, 2011), od značaja su nedavni rezultati koji govore u prilog ovog mehanizma i u pljuvačnim žlezdama. Naime, u pljuvački pacijenata sa dijabetesom su izmerene značajno veće koncentracije biomarkera oksidativnog stresa: lipida i produkata lipidne peroksidacije (Al-Rawi, 2011), kao i enzima glutation peroksidaze (Arana i sar., 2006). Takođe, upravo objavljeni rezultati Turner i sar. (2011) su pokazali da se već posle 10 dana eksperimentalnog dijabetesa u submandibularnoj žlezdi pacova opaža značajan oksidativni stres i da je disbalans u stvaranju reaktivnih kiseoničnih radikala i antioksidativnih enzima odgovoran za poremećaj funkcije pljuvačnih žlezda.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Nedostatak podataka o uticaju dijabetesa na reaktivnost arterija koje ishranjuju pljuvačne žlezde, kao i ekspresiji i ulozi iNOS u dijabetesu, kako u krvnim sudovima koji ishranjuju pljuvačne žlezde tako i u samim pljuvačnim žlezdama, pruža razumnu osnovu za postavljanje sledećih ciljeva:

1. Ispitati efekte i transdukcione mehanizme dejstva acetilholina na izolovanoj glandularnoj grani spoljne karotidne arterije koja vaskularizuje parotidnu pljuvačnu žlezdu (parotidnoj arteriji) kunića, u fiziološkim uslovima i u dijabetesu
2. Utvrditi i analizirati učešće pojedinih podtipova muskarinskih receptora u vaskularnim efektima ACh na izolovanoj parotidnoj arteriji, u fiziološkim uslovima i dijabetesu
3. Utvrditi i analizirati učešće pojedinih podtipova muskarinskih receptora u sekretornim efektima holinergičkog agoniste, karbahola, u parotidnoj žlezdi kunića, u fiziološkim uslovima i dijabetesu
4. Odrediti bazalni nivo cGMP u izolovanoj parotidnoj arteriji i žlezdi, u fiziološkim uslovima i dijabetesu
5. Odrediti veličinu ekspresije mRNK iNOS u izolovanoj parotidnoj arteriji i žlezdi, u fiziološkim uslovima i dijabetesu

MATERIJAL I METOD

EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE I INDUKCIJA DIJABETESA

U eksperimentima su korišćeni kunići, Chincilla soja, starosti 3 meseca, oba pola i težine 2.8-3.3 kg. Jednoj grupi životinja indukovan je dijabetes primenom jedne intravenske injekcije aloksana (100 mg/kg) rastvorenog u fiziološkom rastvoru (eksperimentalna grupa). Druga grupa kunića je dobila jednu intravensku injekciju fiziološkog rastvora (kontrolna grupa) i sve životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi, tokom narednih šest nedelja. Posle šest nedelja, životinjama je izmerena glikemija i samo one sa vrednošću većom od 11 mmol/l (Guminieczek i sar., 2002) su uključene u eksperimentalnu grupu.

EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

***IN VIVO* EKSPERIMENTI**

Kunići iz obe grupe su anestetisani uretanom (1g/ kg) i zatim im je izolovana i kanilirana spoljna ušna vena u svrhu intravenske primene lekova, kao i izvodni kanal parotidne pljuvačne žlezde u svrhu prikupljanja parotidne pljuvačke, izazvane primenom karbahola. U prvoj seriji eksperimenata, intravenski su aplikovane rastuće doze karbahola (0.3-30.0 $\mu\text{mol/kg}$) u cilju formiranja kontrolne dozno-zavisne krive. Parotidna sekrecija je sakupljana i merena u toku 5 min, a između date i naredne doze karbahola postojao je vremenski interval od 15 min. U narednoj seriji eksperimenta, dozno-zavisna kriva karbahola je formirana u prisustvu inhibitora NO sintaze: N^{G} -nitro-L-arginine (L-NOARG, 10 mg/kg), neselektivnog inhibitora NO sintaze, L- N^{O} -nitroarginine-2,4-L-diaminobutyric-amide (N^{O} , 10 mg/kg), selektivnog inhibitora neuralne NO sintaze, i, S-methylisothiurea (SMT, 10 mg/kg), selektivnog inhibitora inducibilne NO sintaze, kao i u prisustvu selektivnih inhibitora muskarinskih receptora: pirenzepina (1-1000 $\mu\text{mol/kg}$), selektivnog antagoniste M_1 receptora, metoktramina (1-1000 $\mu\text{mol/kg}$),

selektivnog antagoniste M_2 receptora i p-fluoro-hexahydro-sila-difenidol (pFHHSiD, 1-1000 nmol/kg), selektivnog antagoniste M_3 receptora. Protokol je podrazumevao da su se rastuće doze karbahola dodavale 15 min nakon primene antagoniste. U trećoj seriji eksperimenata, pratio se efekt karbahola u dozi $1\ \mu\text{mol/kg}$, u prisustvu rastućih koncentracija selektivnih antagonista muskarinskih receptora. Da bi se isključili efekti aktivacije adrenoceptora, eksperimenti su izvođeni u prisustvu fentolamina i propranolola ($3.2\ \mu\text{mol/kg}$), inhibitora α i β adrenoceptora. Na kraju svakog eksperimenta, parotidne žlezde su pažljivo odstranjene i izmerene. Sekretorni efekt karbahola je izražavan kao μl po gramu tkiva žlezde u minuti ($\mu\text{l/g min}$).

***IN VITRO* EKSPERIMENTI**

Pre izvođenja ovih eksperimenata životinje su bile žrtvovane primenom visoke doze anestetika (uretan, 20g/kg) i potom su segmenti parotidne arterije (deo spoljne karotidne arterije koja vaskularizuje parotidnu žlezdu) i parotidne žlezde pažljivo odstranjeni. Parotidne arterije su, neposredno po žrtvovanju, bile postavljane u kupatila za izolovane organe da bi se obavila merenja izometrijskih promena reaktivnosti krvnog suda u odgovoru na različite lekove, ili su se trenutno zamrzavale u tečnom azotu, i zajedno sa trenutno zamrznutim žlezdama, čuvali na -80°C , za eksperimente kvantifikacije metodama ELISA i Real-time RT-PCR.

IZOMETRIJSKA MERENJA PROMENA U REAKTIVNOSTI PAROTIDNE ARTERIJE IZAZVANE DIJABETESOM I PRIMENOM VAZOAKTIVNIH SUPSTANCI

Eksperimenti su izvedeni na izolovanim prstenovima parotidne arterije koja snabdeva krvlju parotidnu žlezdu kunića. Protokol je bio usklađen sa kriterijumima dobre laboratorijske prakse (Good Laboratory Practice, GLP). Arterije su pažljivo odvajane od okolnog perivaskularnog tkiva i, odsečene od stabla spoljne karotidne arterije, isecane u segmente-prstenove dužine 2-3 mm. Iz jednog arterijskog stabla izolovan je samo jedan prstenasti segment.

Na pojedinim preparatima, mehanički je uklanjani endotelni sloj krvnog suda pažljivim okretanjem prstena arterije oko žice od nerđajućeg čelika na filter hartiji natopljenom Krebs-Ringer-bikarbonatnim rastvorom. Preparat je zatim postavljen na stakleni nosač za krvni sud i uranjan u kupatilo za izolovane organe ispunjeno sa 60 ml Krebs-Ringer bikarbonatnog rastvora sledećeg sastava: NaCl (118.3mM), KCl (4.7mM), CaCl₂ (2.5mM), MgSO₄ (1.2mM), KH₂PO₄ (1.2mM), NaHCO₃ (25mM), glukoza (11.1mM). Rastvor je kontinuirano oksigenisan mešavinom 95% O₂ i 5% CO₂. Temperatura je održavana na 37⁰C i pH je iznosio 7,4. Izometrijske promene u tonusu krvnog suda su kontinuirano registrovane pisačem. Period adaptacije izolovanog segmenta arterije u kupatilu za izolovane organe iznosio je 60 min, a tokom sledećih 30 min, preparati su postepeno istezani do tačke zatezanja koja je za ovu arteriju, na osnovu preliminarnih eksperimenata, 2 grama. Na početku svakog eksperimenta utvrđivan je integritet mišićnog i endotelnog sloja krvnog suda tako što su preparati u razmacima od 20 minuta, u tri navrata bili podvrgnuti submaksimalnoj kontrakciji (EC₈₀) prstena arterije primenom fenilefrina (1μM) i relaksaciji acetilholinom (1μM). Relaksacija >80% u odnosu na prekontrakciju izazvanu fenilefrinom ukazivala je na prisustvo intaktnog endotela. Relaksacioni efekt <20% smatran je dokazom za uklonjeni endotelni sloj. Koncentracijski zavisne krive za relaksantno dejstvo ACh-a (0.01-30μM), dobijene su kumulativnim postupkom dodavanja rastućih koncentracija na submaksimalno prekontraovanom krvnom sudu fenilefrinom (1 μM). Veća koncentracija ispitivane vazoaktivne supstance dodavana je u kupatilo tek kada je prethodna, niža koncentracija, ostvarila maksimalni efekt. Eksperimenti su imali dizajn multiplih krivi obzirom da su preliminarni rezultati pokazali da ne postoji značajna razlika u efektima ovih supstanci posle 60 minuta. Protokol je, stoga, uključivao: tri probe za utvrđivanje funkcionalnog stanja mišićnog i endotelnog sloja krvnog suda, formiranje prve kumulativno koncentracijski zavisne

krive za ACh (0.01-30 μM), inkubacija antagoniste: inhibitora NO sintaze (L-NOARG, N^{w} i SMT, u koncentracijama od 10 μM), inhibitora ciklooksigenaze (indometacina, 10 μM) i selektivnih antagonista muskarinskih receptora (pirenzepina i metoktramina, u koncentraciji 0.1-1 μM , i pFHHSiD u koncentraciji 10-100 nM), a potom i formiranje druge kumulativno zavisne krive za ACh. Relaksantni efekt je u eksperimentima izražavan kao % maksimalne kontrakcije izazvane fenilefrinom. U seriji eksperimenata, umesto fenilefrinom, arterijski segmenti su bili prekontrahovani Krebs-bikarbonatnim rastvorom sa visokom koncentracijom jona kalijuma (KCl=65 mM) koja dovodi do inhibicije hiperpolarizacije u glatkom mišiću krvnog suda.

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE mRNK iNOS PRIMENOM REAL-TIME RT-PCR U IZOLOVANIM PAROTIDNIM ARTERIJAMA I ŽLEZDAMA

Real-time RT-PCR je metoda izbora u kvantitativnom određivanju ekspresije gena. U poređenju sa tradicionalnim metodama merenja genske ekspresije, Real-time PCR je osetljivija i pouzdanija, pogotovu ako se koristi mala količina uzorka. Potencijalne greške u toku merenja se mogu korigovati normalizovanjem vrednosti ekspresije gena koji se ispituje sa vrednostima ekspresije konstitutivnih gena, tzv. endogenih kontrola. Izbor endogene kontrole je kritičan trenutak u ispitivanju genske ekspresije metodom Real-time PCR. Naime, veliki broj studija je ukazao na značajne varijacije u ekspresiji konstitutivnih gena između polova, različitih vrsta tkiva kao i patoloških stanja u kome se ispituju (Derks i sar. 2008; Radonić i sar. 2004). Stoga, u našim istraživanjima, u toku preliminarnih eksperimenata, primenom TaqMan Real-time RT-PCR, izvršili smo selekciju najboljih endogenih kontrola za oba tipa tkiva među sledećim konstitutivnim genima za: GAPDH (Gliceralehid-3- fosfat dehidrogenazu), FLNB (filamin B, beta), alfa aktin and HPRT-1 (Hipoksantin- fosforiboziltransferazu 1).

Zamrznuti uzorci tkiva kunića iz kontrolne i eksperimentalne grupe su homogenizovani u Trizolu, prema uputstvu proizvođača, u cilju ekstrakcije RNK. U principu, 100 mg tkiva se homogenizuje u 1 ml Trizola. Separacija faze sa RNK se odvija u prisustvu 0.2 ml hloroforma, a potom se RNK precipitira dodavanjem 0.5 ml izopropanola. Posle ispiranja precipitata RNK u 1 ml 75% etanola, uzorci su centrifugovani i rastvarani. Po 2 µg RNK svakog uzorka je prevedeno u cDNK koristeći High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Po 4 µl stvorenog cDNK se je korišćeno u reakciji ukupne zapremine od 25 µl koja je sadržala 1x of TaqMan Universal PCR Master Mix i 1x TaqMan gene expression assay. PCR reakcije su izvedene u triplikatu, u ABI 7500 Real-time PCR mašinskom sistemu na 50°C u trajanju od 2 min, 95 °C u trajanju od 10 min, praćeni sa 40 ciklusa na 95 °C u trajanju od 15 s, i 60°C u trajanju od 1 min. Nivo ekspresije mRNK iNOS je bio normalizovan u odnosu na endogene kontrole, koje su izabrane u posebnoj seriji eksperimenata primenom različitih softvera za validaciju: GeNorm i NormFinder. Sekvence prajmera i proba Takman genskih eseja (Taqman gene expression assays, Applied Biosystems) su sledeće:

iNOS		
Forward Primer Seq:	Reverse Primer Seq	Proba
5'- CCTCACCTACTT CCTGGACATCA-3'	3'- GCGGGCCAGC TTGTG-5'	5'- FAMCTACCCCTCCCACCCA GC-3'

GAPDH		
Forward Primer Seq:	Reverse Primer Seq	Proba
5'- CCTCACCTACTT CCTGGACATCA-3'	3'- GCGGGCCAGC TTGTG-5'	5'- FAMCTACCCCTCCCACCCA GC-3'

ALPHA ACTIN		
Forward Primer Seq:	Reverse Primer Seq	Proba
5'- TGGTGTGATGGTTGGTAT GG-3'	3'- CTTCTCTCTGTTGG CCTTGG-5'	5'-FAM CTATGTTGGTGTGAGGCC C-3'

HPRT-1		
Forward Primer Seq:	Reverse Primer Seq	Proba
5'- GACCAGTCAACAGGGGA CAT-3'	3'- CCTGACCAAGGAA AGCAAAG-3'	5'-FAM ACACTGGCAAACAATGC AG-3'

FLNB		
Forward Primer Seq:	Reverse Primer Seq	Proba
5'- CCCATCCCAAATAGTCCC TT -3'	3'- AACAGTTATGCCA AGCCCAC-5' -	5'-FAM ACCAGGATTGAAAGAGGC CT-3'

ODREĐIVANJE BAZALNIH KONCENTRACIJA cGMP U TKIVU PAROTIDNE ARTERIJE I ŽLEZDE IMUNOESEJSKOM TEHNIKOM (ELISA)

Uzorci tkiva prethodno zamrznuti u tečnom azotu su smrvljeni u avanu i izmereni. Zatim su homogenizovani u 10 zapremina 0.1M HCl. Uzorci su potom centrifugirani na 600xg, na sobnoj temperaturi, 10 minuta. U cilju merenja i malih koncentracija cGMP, svi uzorci i standardi su prošli kroz fazu acetilacije. ELISA Kit za direktno određivanje koncentracije cGMP koristi poliklonalno antitelo za cGMP za koje se kompetitivno vezuju cGMP iz uzorka ili iz konjugata cGMP-alkalna fosfataza. Po 100 μ L uzoraka i različito razblaženih standarda cGMP, i po 50 μ l konjugata alkalne fosfataze, i antitela, se dodaju sinhronizovano na pločicu za koju je vezano sekundarno antitelo. Nakon ispiranja i uklanjanja viška reagenasa, dodaje se 200 μ l p-nitrofenilfosfata, supstrata za alkalnu fosfatazu i zbog enzimske reakcije, rastvor dobija boju. Intenzitet boje je u obrnuto srazmernom odnosu sa koncentracijom cGMP, očitava se na spektrofotometru i dobijene optičke gustine se koriste za izračunavanje koncentracija.

OBRADA REZULTATA

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna greška srednje vrednosti (S.E.M.), gde n označava broj eksperimenata. Za sve eksperimentalne krive, primenom nelinearne regresije, za agoniste je određen maksimalni efekt (E_{max}), kao mera efikasnosti agonista, i vrednost srednje efektivne koncentracije, odnosno doze agonista (EC_{50} , u *in vitro*, ED_{50} , u *in vivo* merenjima), kao mere jačine agonista, a za antagoniste-srednja inhibitorna

koncentracija, odnosno doza antagonista (IC_{50} , u *in vitro*, ID_{50} , u *in vivo* merenjima), predstavljene kao vrednosti negativnog logaritma. Da bi se uporedili inhibitorski efekti antagonista primenjenih u kontrolnim i eksperimentalnim uslovima (dijabetesu), rezultati su izraženi kao razlike u površinama ispod koncentracijski- i dozno-zavisnih krivi za ACh i karbahol, dobijenih u prisustvu i odsustvu antagonista (dAUC), kod kontrolnih i kunića sa dijabetesom. Površina ispod krive je dobijena dodavanjem rastućih koncentracija agonista i izračunata je primenom GraphPad Prism Software, USA. Za statističko poređenje dobijenih rezultata korišćen je Studentov t test i jednofaktorska analiza varijanse sa Dunnet' s *post hoc* testom. Statistički značajnom se smatrala $P < 0.05$.

U funkcionalnoj analizi muskarinskih receptora uključenih u holinergičku vazodilataciju, pA_2 vrednosti (-log molarne koncentracije antagoniste koja dvostruko redukuje efekt agoniste) su određivane metodom Arunlekshana i Schilda. Ukratko, izračunavani su koncentracijski odnosi (odnos između EC_{50} za ACh u prisustvu i odsustvu antagoniste) za različite koncentracije antagonista muskarinskih receptora, i na osnovu ovih odnosa, linearnom regresijom su izračunavane pA_2 vrednosti kao mesto preseka regresione linije sa apscisom. Vrednosti negativnog logaritma konstanti disocijacije za različite antagoniste (-log K_B) su izračunate na osnovu koncentracijskih odnosa u uslovima nagiba Šildove krive u vrednosti -1. Za procenu linearnosti Šildove krive regresije korišćena je analiza varijanse, a za procenu značajnosti razlike nagiba Šildove krive korišćen je Studentov t-test.

U cilju odabira endogenih kontrola, poređenje vrednosti Ct je izvršeno u programima: GeNorm 3.5 (<http://medgen.ugent.be>) i NormFinder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) (Andersen i sar. 2004). Ovi programi izračunavaju intra- i intergrupne varijacije i na osnovu srednje vrednosti stabilnosti gena (M) određuju najstabilniji gen ili kombinaciju gena za endogene kontrole. Pri tome, veću stabilnost u ekspresiji gena određuje niža prosečna vrednost

stabilnosti gena (M) (Andersen i sar. 2004). Rezultati ekspresije mRNK iNOS su izračunavani po komparativnom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu, gde je ΔCt razlika u dobijenim prosečnim Ct (cycle threshold number) vrednostima između eksperimentalnih (dijabetičnih) i kontrolnih grupa. Svi rezultati su izražavani u odnosu na kontrolne vrednosti. Za statističko poređenje značajnosti razlike između kontrolne i eksperimentalne grupe je korišćen Studentov t test.

Koncentracije cGMP u uzorcima su izražene kao srednje vrednosti \pm standardna greška srednje vrednosti (S.E.M.), gde n označava broj eksperimenata, u pmol po gramu tkiva (pmol/g). Za statističko poređenje značajnosti razlike između kontrolne i eksperimentalne grupe je korišćen Studentov t test.

SUPSTANCE

Korišćene su sledeće supstance: fenilefrin, acetilholin, karbahol, N^G -nitro-L-arginin, L- N^{ω} -nitroarginine-2,4-L-diaminobutyric-amide, S-methylisothiourea, pirenzepin, metoktramin, p-fluoro-hexahydro-sila-difenidol i indometacin. Svi nabavljeni iz Sigma, St. Louis, USA, i RBI, Natick, MA, USA. Rastvori primenjivanih supstanci su pripremani svakog dana pred početak eksperimenta. Sve su supstance rastvarane u destilovanoj vodi sem indometacina koji je rastvaran u ekvimolarnom rastvoru Na_2CO_3 .

Hemijske supstance koje su se koristile za kvantifikaciju genske ekspresije metodom Real-time RT-PCR su nabavljene iz Applied Biosystems, USA, sem Trizola, nabavljenog iz Invitrogena, USA, kao i hloroforma, izopropanola i etanola, nabavljenih iz SuperLab-a, Srbija.

Za određivanje koncentracije cGMP u uzorcima korišćen je Direct cGMP Enzyme Immunoassay Kit, Sigma-Aldrich, USA, dok je za očitavanje optičkih gustina korišćen LKB ELISA Multiwell plate reader.

REZULTATI

VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA NA IZOLOVANOJ PAROTIDNOJ ARTERIJI KUNIĆA

VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA NA KONTROLNIM ARTERIJSKIM SEGMENTIMA PREKONTRAHOVANIM FENILEFRINOM

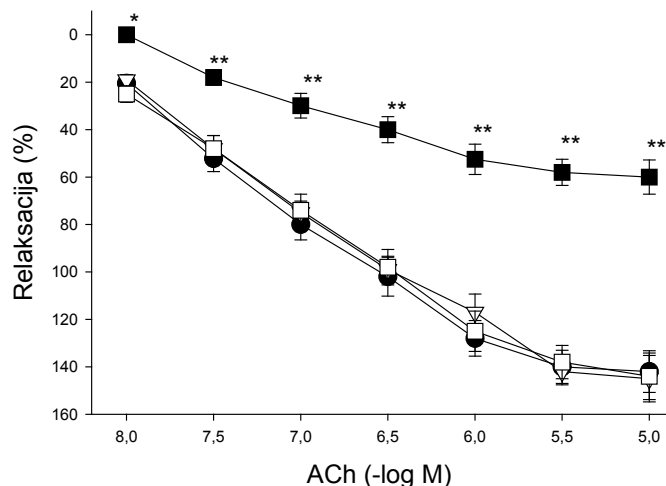
Fenilefrin ($1\mu\text{M}$) izaziva kontrakciju parotidne arterije kunića na preparatima sa endotelom i na preparatima bez endotela gde prouzrokuje značajno veći kontraktilni efekt (*tabela 1*).

Acetilholin u koncentracijama od 0.01 do $30\mu\text{M}$ prouzrokuje koncentracijski zavisnu relaksaciju izolovane parotidne arterije kunića sa očuvanim endotelom. Maksimalni relaksantni efekt iznosi $142.0 \pm 9.3\%$ sa $pEC_{50} = 6.92 \pm 0.12$ (*slika 1*). U istim koncentracijama, acetilholin nema efekta na preparatima ove arterije nakon odstranjivanja endotela (*rezultati nisu prikazani*).

VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU INHIBITORA NO SINTAZE

U prisustvu L-NOARG ($10\mu\text{M}$), neselektivnog inhibitora NO sintaze, relaksantni efekt svih primenjenih koncentracija acetilholina je značajno redukovan u odnosu na efekt ACh na arterijskim preparatima u odsustvu L-NOARG. Tako, na primer, maksimalni efekt ACh u prisustvu L-NOARG iznosi $60.3 \pm 7.0\%$ ($pEC_{50} = 7.03 \pm 0.14$). U prisustvu N^w ($10\mu\text{M}$), selektivnog inhibitora neuralne NO sintaze, kao i u prisustvu SMT ($10\mu\text{M}$), selektivnog inhibitora inducibilne NO sintaze, relaksantni efekt ACh se ne menja značajno: maksimalni efekt

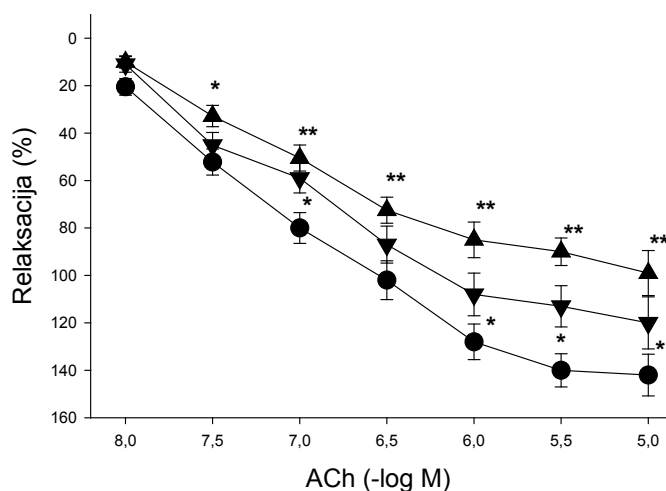
ACh u prisustvu N^w iznosi 145.4 ± 9.8 % ($pEC_{50} = 6.86 \pm 0.15$) a u prisustvu SMT: 139.3 ± 10.0 % ($pEC_{50} = 6.81 \pm 0.13$). (slika 1).



Slika 1. Kumulativno koncentracijski zavisne krive za acetilholin na preparatima izolovane parotidne arterije kunića sa očuvanim endotelom, bez prisustva (●) i u prisustvu L-NOARG (■), Nw (▽) i SMT (□). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. ($n=5-7$). Vrednosti su izražene kao procenat relaksacije u odnosu na maksimalnu prekontrakciju izazvanu fenilefrinom ($1\mu M$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u prisustvu inhibitora u odnosu na kontrolu.

VAZORELAKSANI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU INDOMETACINA I VISOKIH KONCENTRACIJA KALIJUMA

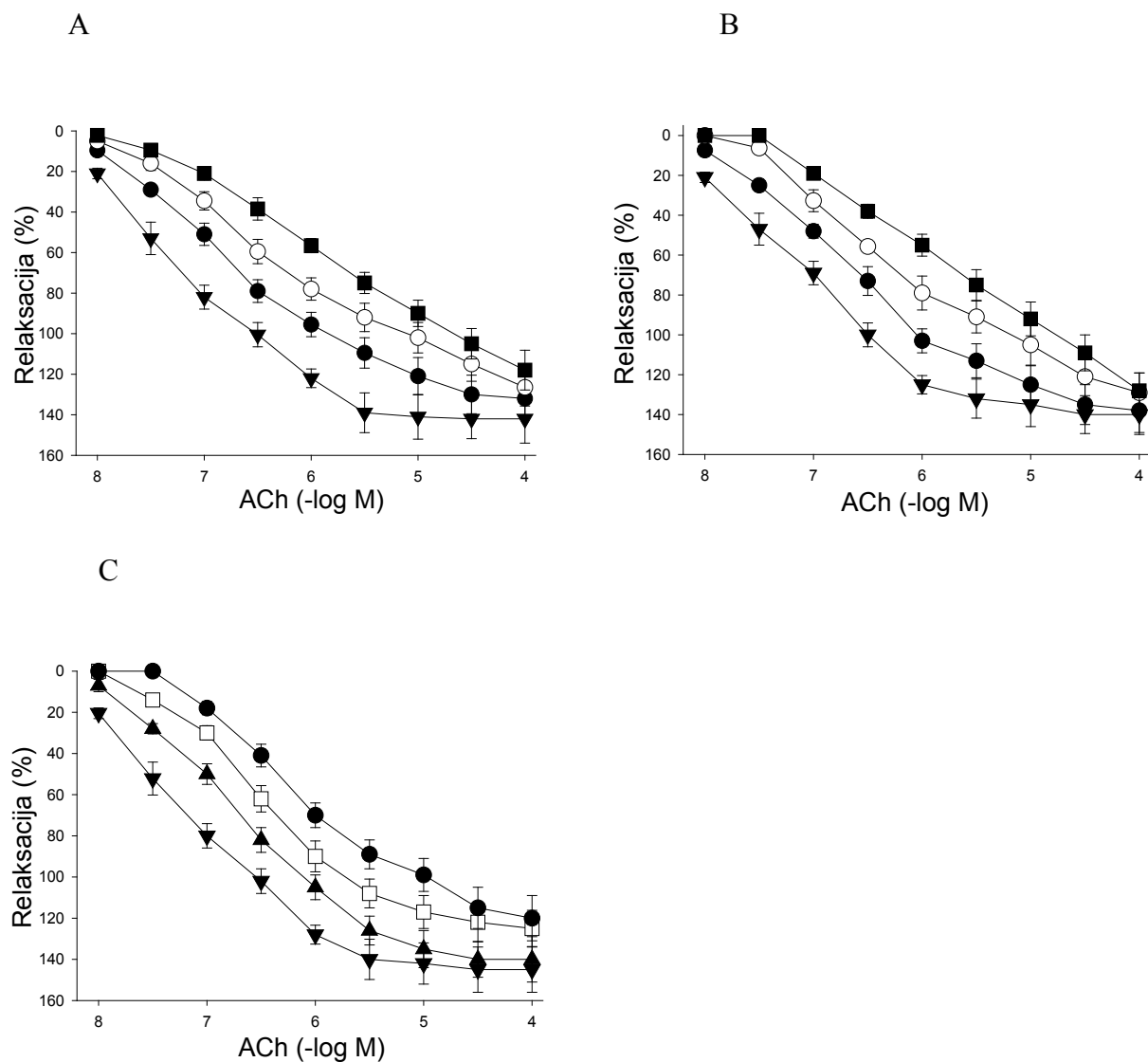
U prisustvu indometacina ($10 \mu M$), neselektivnog inhibitora ciklooksigenaze, relaksantni efekt acetilholina je značajno redukovano u odnosu na efekt ACh na arterijskim preparatima u odsustvu indometacina, i maksimalni efekt ACh u prisustvu indometacina je redukovano na 99.2 ± 9.0 % ($pEC_{50} = 7.03 \pm 0.11$). U prisustvu Krebs-Ringerovog rastvora sa visokom koncentracijom kalijuma ($65mM$), upotrebljen za prekontrakciju arterije umesto fenilefrina, vazorelaksantni efekt ACh je značajno smanjen i maksimalni efekt iznosi 118.5 ± 8.5 % ($pEC_{50} = 6.99 \pm 0.14$), (slika 2).



Slika 2. Kumulativno koncentracijski zavisne krive za acetilholin na preparatima izolovane parotidne arterije kunića sa očuvanim endotelom, bez prisustva (●) i u prisustvu indometacina (▲) i K⁺ (▼). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± S.E.M. (n=5-7). Vrednosti su izražene kao procenat relaksacije u odnosu na maksimalnu prekontraksiju izazvanu fenilefrinom (1μM) ili hiperpolarišućim rastvorom (65mM K⁺). * p<0.05** p<0.01, u prisustvu inhibitora u odnosu na kontrolu.

VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU SELEKTIVNIH ANTAGONISTA MUSKARINSKIH RECEPTORA

U prisustvu pirenzepina (0.1-1μM), selektivnog antagoniste M₁ muskarinskih receptora, metoktramina (0.1-1μM), selektivnog antagoniste M₂ muskarinskih receptora i pFHHSiD (10-100nM), selektivnog inhibitora M₃ muskarinskih receptora, koncentracijski-zavisne krive ACh su pomerene udesno, bez promene u maksimalnom vazorelaksantnom efektu (p>0.05) (slika 3 A, B, C). U svim eksperimentima, nagibi Šildove krive nisu bili značajno različiti od 1 (slika 8, tabela 2), sa pA₂ vrednostima datim u tabeli 2.



Slika 3. Kumulativno koncentracijski zavisne krive za acetilholin na preparatima izolovane parotidne arterije kunića sa očuvanim endotelom, bez prisustva (\blacktriangledown) i u prisustvu $0.1 \mu\text{M}$ (\bullet), $0.3 \mu\text{M}$ (\circ) i $1 \mu\text{M}$ (\blacksquare) pirenzepina (A) i metoktramina (B), kao i u prisustvu 10nM (\blacktriangle), 30nM (\square) i 100nM (\bullet) pFHHSiD (C). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. ($n=5-7$). Vrednosti su izražene kao procenat relaksacije u odnosu na maksimalnu prekontrakciju izazvanu fenilefrinom ($1 \mu\text{M}$). Oznake statističke značajnosti nisu prikazane zbog bolje preglednosti

VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA NA ARTERIJAMA PREKONTRAHOVANIM FENILEFRINOM KOD KUNIĆA SA DIJABETESOM

VAZOKONTRAKTILNI EFEKT FENILEFRINA NA IZOLOVANOJ PAROTIDNOJ ARTERIJI KUNIĆA SA DIJABETESOM

Fenilefrin (1 μ M) izaziva kontrakciju parotidne arterije kunića na preparatima sa endotelom i na preparatima bez endotela gde prouzrokuje značajno veći kontraktilni efekt. Na dijabetičnim segmentima sa endotelom, fenilefrin izaziva značajno veći kontraktilni efekt u odnosu na kontrolne segmente sa očuvanim endotelom. Vazokontraktilni efekt fenilefrina na segmentima bez endotela ne pokazuje značajne razlike između nedijabetičnih i dijabetičnih arterija (*tabela 1*).

Tabela 1. Vazokontraktilni efekt fenilefrina na parotidnoj arteriji kunića

	Kontrolni	dijabetični
Segmenti sa očuvanim endotelom	17.2 \pm 4.3	27.5 \pm 4.5*
Segmenti bez endotela	24.4 \pm 3.5†	29.0 \pm 5.6

*p<0.05 , dijabetični segmenti sa endotelom u odnosu na kontrolne sa endotelom

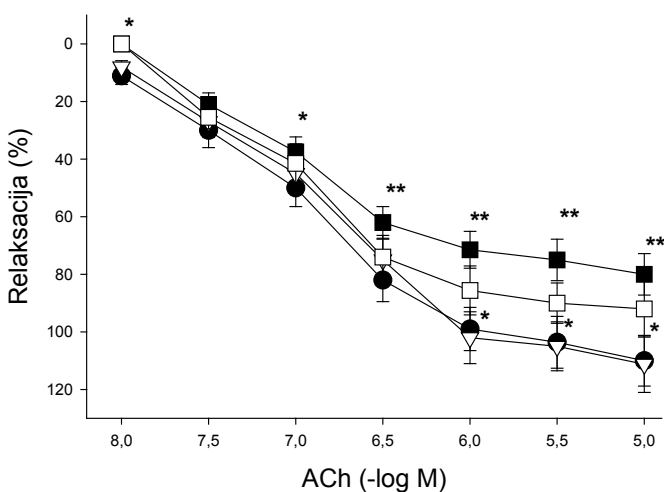
† p<0.05 , kontrolni segmenti bez endotela u odnosu na kontrolne sa endotelom

VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU INHIBITORA NO SINTAZE NA ARTERIJAMA KUNIĆA SA DIJABETESOM

Na arterijskim preparatima parotidne arterije kunića sa dijabetesom, vazorelaksantni efekt acetilholina (0.01-30 μ M) je značajno smanjen u odnosu na vazorelaksantni efekt ACh na

kontrolnim arterijskim segmentima, i maksimalni relaksantni efekt iznosi $110.0 \pm 8.8 \%$ sa $pEC_{50} = 6.86 \pm 0.09$ (slika 4). Uklanjanje endotela je u potpunosti blokiralo dejstvo acetilholina i na segmentima dijabetične parotidne arterije kunića (rezultati nisu prikazani).

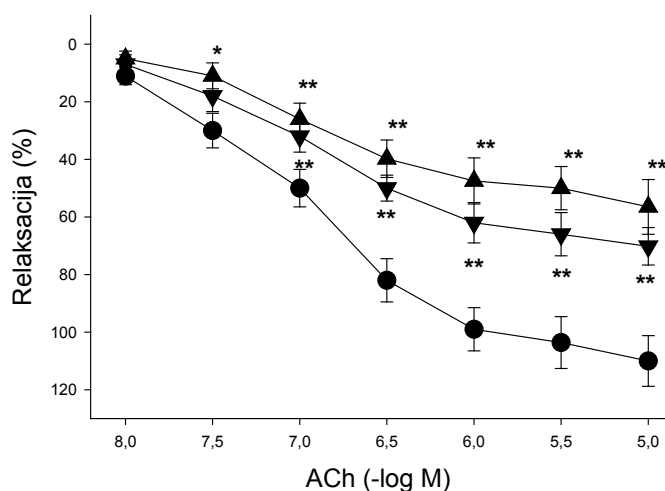
U prisustvu L-NOARG ($10 \mu\text{M}$), neselektivnog inhibitora NO sintaze, na parotidnim arterijama kunića sa dijabetesom, relaksantni efekt acetilholina je značajno redukovan u odnosu na efekt ACh na dijabetičnim preparatima u odsustvu L-NOARG, i maksimalni efekt ACh u prisustvu L-NOARG iznosi $80.0 \pm 7.5 \%$ ($pEC_{50} = 7.01 \pm 0.09$). U prisustvu SMT ($10 \mu\text{M}$), selektivnog inhibitora iNOS relaksantni efekt ACh na dijabetičnim arterijama se značajno smanjuje i maksimalni efekt ACh u prisustvu SMT iznosi $90.7 \pm 8.2 \%$ ($pEC_{50} = 7.04 \pm 0.19$). S druge strane, primena selektivnog inhibitora nNOS, N^W , ne utiče značajno na vazorelaksaciju izazvanu acetilholinom ni na dijabetičnim parotidnim arterijama, i maksimalni efekt ACh u prisustvu N^W iznosi $111.2 \pm 9.0 \%$ ($pEC_{50} = 6.82 \pm 0.07$) (slika 4).



Slika 4. Kumulativno koncentracijski zavisne krive za acetilholin na preparatima izolovane parotidne arterije kunića sa očuvanim endotelom, bez prisustva (●) i u prisustvu L-NOARG (■), N^W (▽) i SMT (□). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. ($n=5-7$). Vrednosti su izražene kao procenat relaksacije u odnosu na maksimalnu prekontrakciju izazvanu fenilefrinom ($1\mu\text{M}$). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, u prisustvu inhibitora u odnosu na kontrolu.

VAZORELAKSANI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU INDOMETACINA I VISOKIH KONCENTRACIJA KALIJUMA NA ARTERIJAMA KUNIĆA SA DIJABETESOM

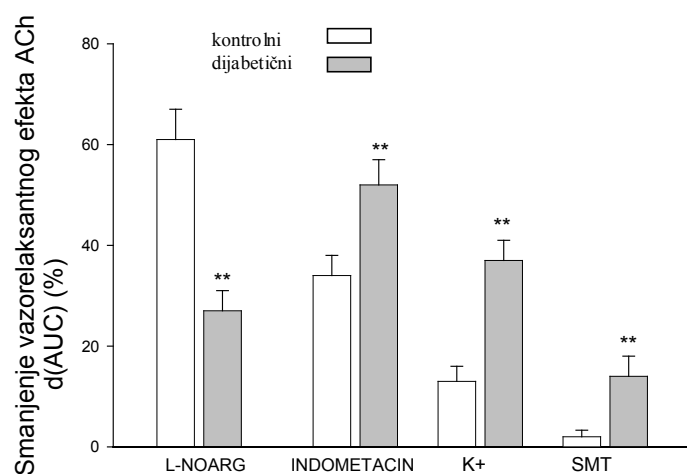
Na dijabetičnim parotidnim arterijama kunića, u prisustvu indometacina (10 μ M), neselektivnog inhibitora ciklooksigenaze, relaksantni efekt acetilholina je značajno ($p < 0.01$) redukovan u odnosu na efekt ACh na dijabetičnim arterijskim preparatima u odsustvu indometacina, i maksimalni efekt ACh iznosi 56.5 ± 6.4 % ($pEC_{50} = 6.92 \pm 0.09$). U prisustvu Krebs-Ringerovog rastvora sa visokom koncentracijom kalijuma (65mM) za prekontrakciju dijabetične arterije umesto fenilefrina, vazorelaksantni efekt ACh je značajno smanjen ($p < 0.01$) i maksimalni efekt iznosi 70.2 ± 6.4 % ($pEC_{50} = 6.88 \pm 0.08$) (slika 5).



Slika 5. Kumulativno koncentracijski zavisne krive za acetilholin na preparatima izolovane parotidne arterije kunića sa dijabetesom, sa očuvanim endotelom, bez prisustva (●) i u prisustvu indometacina (▲) i K^+ (▼). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. ($n=5-7$). Vrednosti su izražene kao procenat relaksacije u odnosu na maksimalnu prekontrakciju izazvanu fenilefrinom (1 μ M) ili hiperpolarišućim rastvorom (65mM K^+) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, u prisustvu inhibitora u odnosu na kontrolu.

INHIBITORNI EFEKTI ANTAGONISTA NA VAZORELAKSACIJI IZAZVANOJ ACETILHOLINOM U DIJABETESU

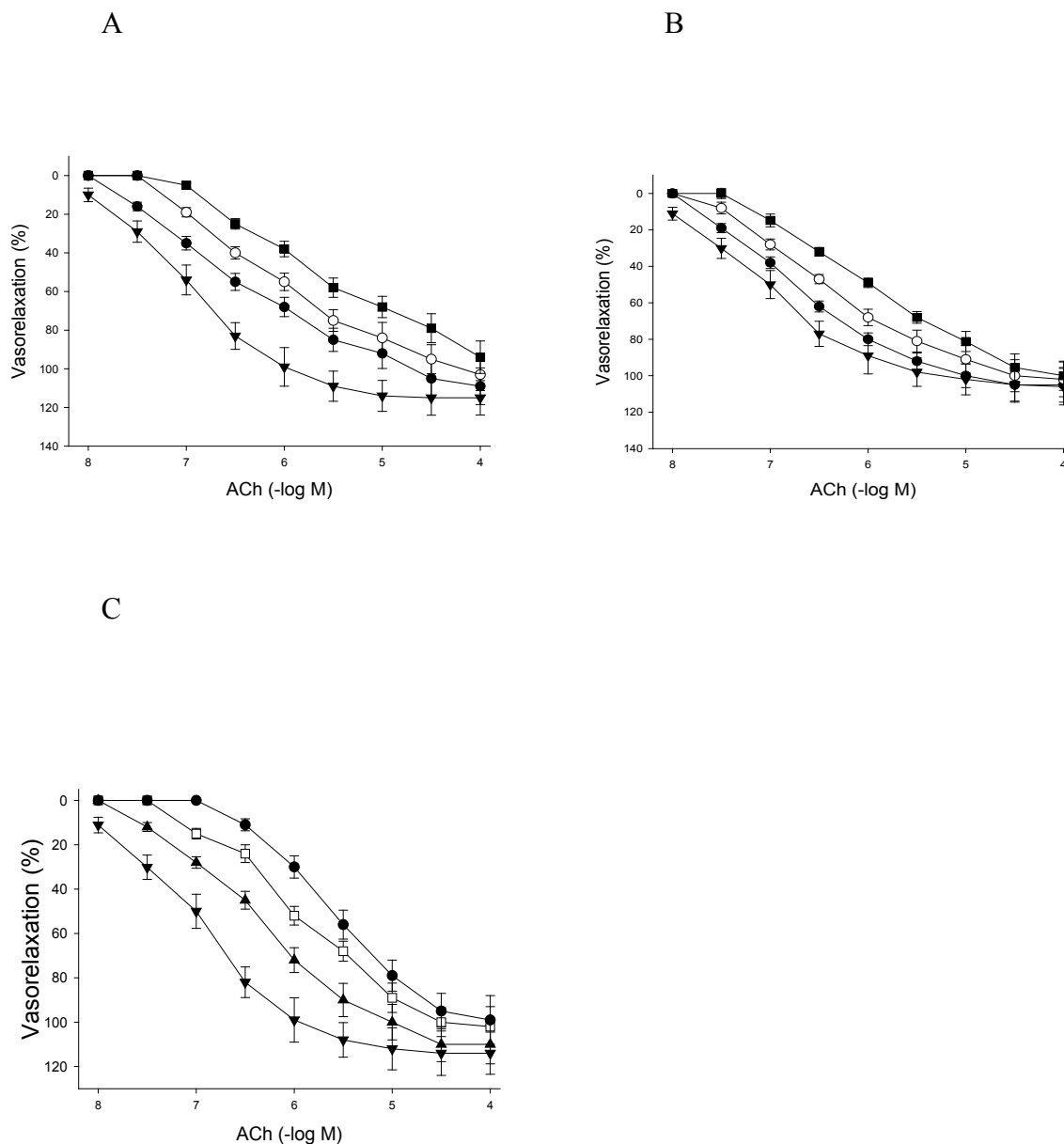
Poređenjem inhibitornih efekata (vrednosti dAUC) antagonista: L-NOARG, SMT, indometacina i K^+ na vazorelaksantnom efektu ACh, pokazano je da inhibitorni efekti SMT, indometacina i K^+ rastu, dok se inhibitorni efekt L-NOARG smanjuje u dijabetičnim arterijskim segmentima (*slika 6*).



Slika 6. Smanjenje vazorelaksantnog efekta ACh na izolovanoj parotidnoj arteriji kontrolnih i kunića sa dijabetesom (izračunato kao % razlike između površina ispod koncentracijski-zavisnih kriva za ACh). Svaka kolona predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. (n=6). **p<0.01, kunići sa dijabetesom u odnosu na kontrolne.

VAZORELAKSANTNI EFEKT ACETILHOLINA U PRISUSTVU SELEKTIVNIH ANTAGONISTA MUSKARINSKIH RECEPTORA NA ARTERIJAMA KUNIĆA SA DIJABETESOM

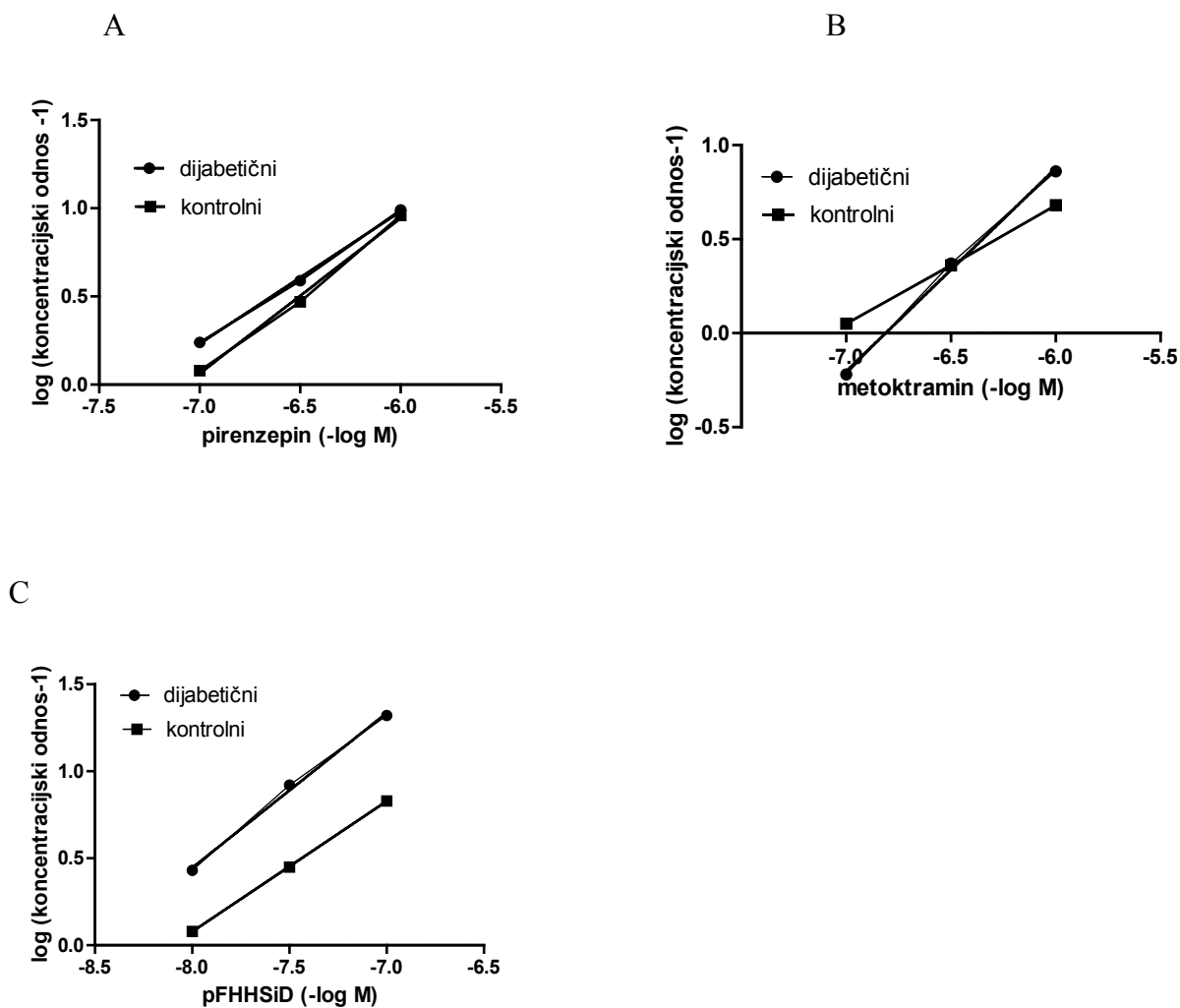
Na dijabetičnoj parotidnoj arteriji, u prisustvu pirenzepina (0.1-1 μ M), selektivnog antagoniste M₁, metoktramina (0.1-1 μ M), selektivnog antagoniste M₂ i pFHHSiD (10-100nM), selektivnog antagoniste M₃ muskarinskih receptora, koncentracijski-zavisna kriva ACh je pomerenjena udesno, bez promene u maksimalnom vazorelaksantnom efektu (*slika 7 A, B, C*). I u ovim eksperimentima, nagibi Šildove krive nisu bili značajno različiti od 1 (*slika 8, tabela 2*), sa pA₂ vrednostima, koji nisu značajno različiti od pA₂ vrednosti za iste antagoniste na kontrolnim arterijama (*tabela 2*).



Slika 7. Kumulativno koncentracijski zavisne krive za acetilholin na preparatima izolovane parotidne arterije kunića sa dijabetesom, sa očuvanim endotelom, bez prisustva (\blacktriangledown) i u prisustvu 0.1 μM (\bullet), 0.3 μM (\circ) i 1 μM (\blacksquare) pirenzepina (A) i metoktramina (B), kao i u prisustvu 10nM (\blacktriangle), 30nM (\square) i 100nM (\bullet) pFHHSiD (C). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. (n=5-7). Vrednosti su izražene kao procenat relaksacije u odnosu na maksimalnu prekontraksiju izazvanu fenilefrinom (1 μM). Oznake statističke značajnosti nisu prikazane zbog bolje preglednosti.

Tabela 2. pA_2 vrednosti, vrednosti nagiba Šildove krive, koeficijenti korelacije i konstante afiniteta ($-\log K_B$) za ispitivane antagoniste muskarinskih receptora na izolovanoj parotidnoj arteriji kod kontrolnih i kunića sa dijabetesom.

	Pirenzepin		Metoktramin		pFHHSiD	
	kontrolni	dijabetični	kontrolni	dijabetični	kontrolni	dijabetični
pA_2	7.07 ± 0.06	7.18 ± 0.08	7.07 ± 0.07	6.80 ± 0.10	8.06 ± 0.08	8.20 ± 0.06
nagib	0.89 ± 0.05	0.75 ± 0.02	0.65 ± 0.03	1.08 ± 0.05	0.70 ± 0.01	0.81 ± 0.07
Koeficijent korelacije	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
$-\log K_B$	7.01 ± 0.05	7.10 ± 0.05	6.96 ± 0.08	6.83 ± 0.06	7.95 ± 0.08	8.10 ± 0.07



Slika 8. Šildove krive odnosa log (koncentracijski odnos) prema $-\log$ koncentracije muskarinskih antagonista, pirenzepina (A), metoktramina (B) i pFHHSiD (C) kod kontrolnih i kunića sa dijabetesom. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ($n=5-7$).

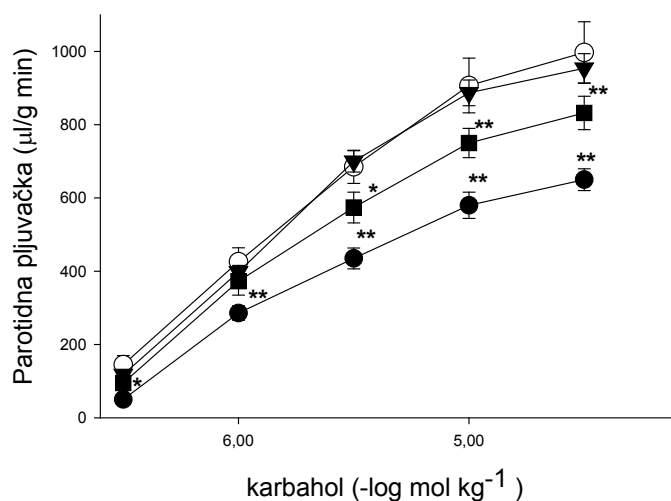
SEKRETORNA AKTIVNOST PAROTIDNE PLJUVAČNE ŽLEZDE KUNIĆA

SEKRETORNI EFEKT KARBHOLA U PAROTIDNOJ ŽLEZDI KONTROLNIH KUNIĆA

Karbahol (0.3-30 $\mu\text{mol/kg}$) izaziva dozno-zavisno povećanje parotidne sekrecije sa maksimalnom vrednošću od $997.0 \pm 84.0 \mu\text{L/g min}$ ($\text{pED}_{50} = 5.80 \pm 0.05$) (*slika 9*).

SEKRETORNI EFEKT KARBHOLA U PRISUSTVU INHIBITORA NO SINTAZE

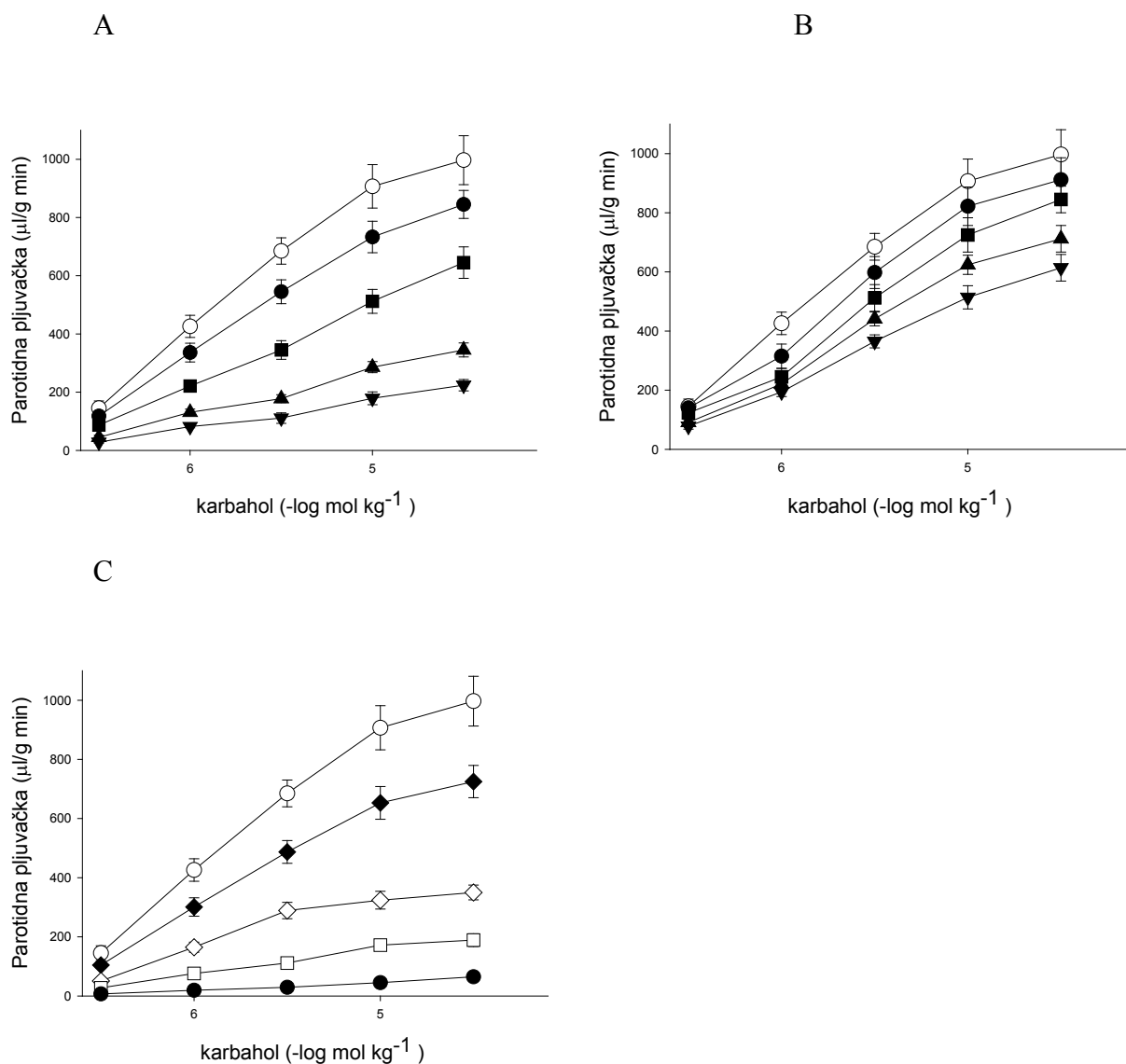
U prisustvu L-NOARG (10 mg/kg), neselektivnog inhibitora NO sintaze, dolazi do značajnog smanjenja sekretornog efekta karbahola tako da maksimalni sekretorni efekt iznosi $498.5 \pm 29.8 \mu\text{L/g min}$. U prisustvu N^{w} (10 mg/kg), selektivnog inhibitora nNOS, sekretorni efekt karbahola je takođe značajno smanjen, i maksimalni sekretorni efekt iznosi $650.0 \pm 45.7 \mu\text{L/g min}$. Primena SMT (10 mg/kg), selektivnog inhibitora iNOS, ne utiče značajno na parotidnu sekreciju izazvanu karbaholom (*slika 9*).



Slika 9. Parotidna pljuvačka izazvana karbaholom u odsustvu (○) i prisustvu L-NOARG (●), Nw (■) i SMT (▼). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± S.E.M. (n=5-7). * p<0.05, **p<0.01, u prisustvu inhibitora u odnosu na kontrolu.

SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PRISUSTVU SELEKTIVNIH ANTAGONISTA MUSKARINSKIH RECEPTORA

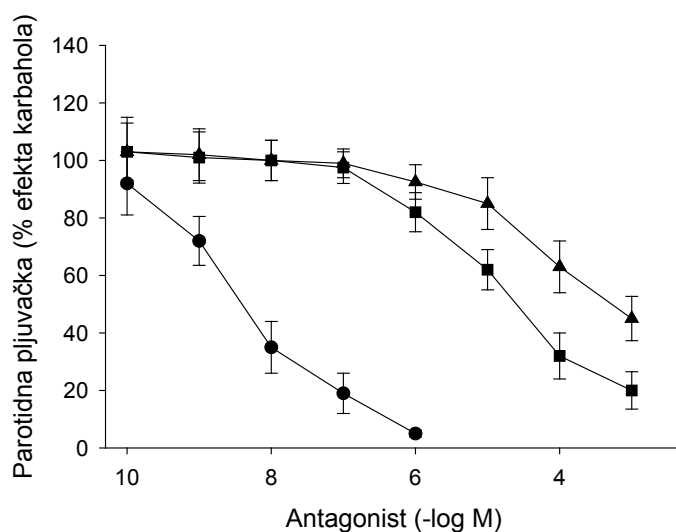
U prisustvu selektivnog inhibitora M₁ receptora, pirenzepina (1-1000 µmol/kg), opaža se značajno smanjenje sekretornog efekta karbahola, u svim primenjenim dozama. Tako, na primer, sekretorni efekat karbahola (1 µmol/kg) u prisustvu maksimalne primenjene doze pirenzepina iznosi 82.0 ± 4.5 µl/g min. Metoktramin, selektivni M₂ značajno smanjuje sekretorni efekat karbahola samo primenjen u najvećim dozama, 100 and 1000 µmol/kg. Sekretorni efekat karbahola (1 µmol/kg) u prisustvu maksimalne primenjene doze metoktramina iznosi 194.0 ± 15.5 µl/g min. pFHHSiD (1-100 nmol/kg), selektivni inhibitor M₃ receptora značajno smanjuje sekretorni efekat karbahola, primenjen u svim dozama i sekretorni odgovor karbahola (1 µmol/kg) u prisustvu maksimalne primenjene doze pFHHSiD iznosi 19.2 ± 4.0 µl/g min. (slika 10 A, B i C).



Slika 10. Sekretorni efekt karbahola u parotidnoj žlezdi kunića u odsustvu (○) i prisustvu $1\mu\text{mol/kg}$ (●), $10\mu\text{mol/kg}$ (■), $100\mu\text{mol/kg}$ (▲) i $1000\mu\text{mol/kg}$ (▼) pirenzepina (A) I metoktramina (B), kao i u prisustvu 1nmol/kg (◆), 10nmol/kg (◇), 100nmol/kg (□) i 1000nmol/kg (●) pFHHSiD (C). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. ($n=5-7$). Oznake značajnosti nisu prikazane radi bolje preglednosti.

EFEKTI SELEKTIVNIH MUSKARINSKIH ANTAGONISTA NA PAROTIDNU SEKRECIJU IZAZVANU KARBAHOLOM (1 μ mol/kg)

pFHHSiD značajno smanjuje sekretorni efekt karbahola (1 μ mol/kg) već u dozi od 1nmol/kg, i smanjenje iznosi 28.0 ± 8.0 %, dok pirenzepin tek u dozi 1 μ M, a metoktramin u dozi 10 μ M, dovode do značajnog smanjenja sekrecije izazvane ovom dozom karbahola (za 18.0 ± 6.8 % i 15.0 ± 6.0 %). Poređenjem vrednosti pID₅₀ za antagoniste (*tabela 3*) dolazi se do zaključka o visoko značajnom inhibitornom efektu pFHHSiD i manje izraženim inhibitornim efektima pirenzepina i metoktramina. (*slika 11*).



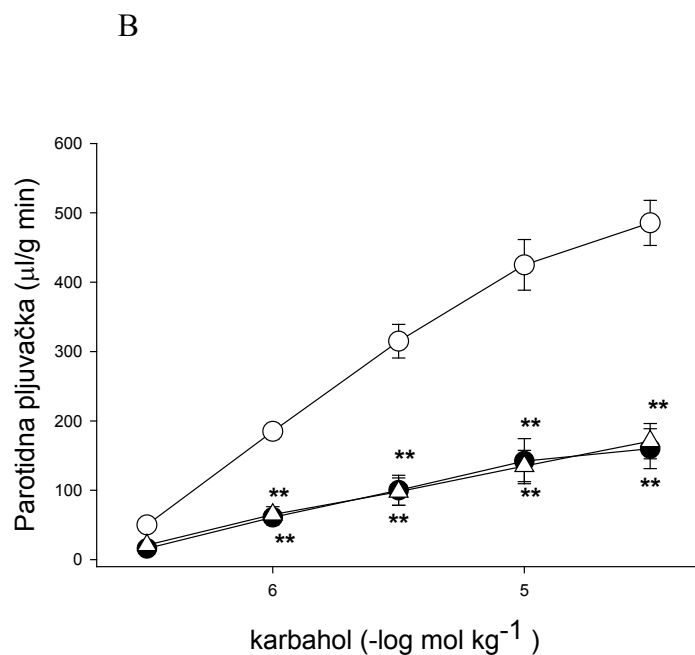
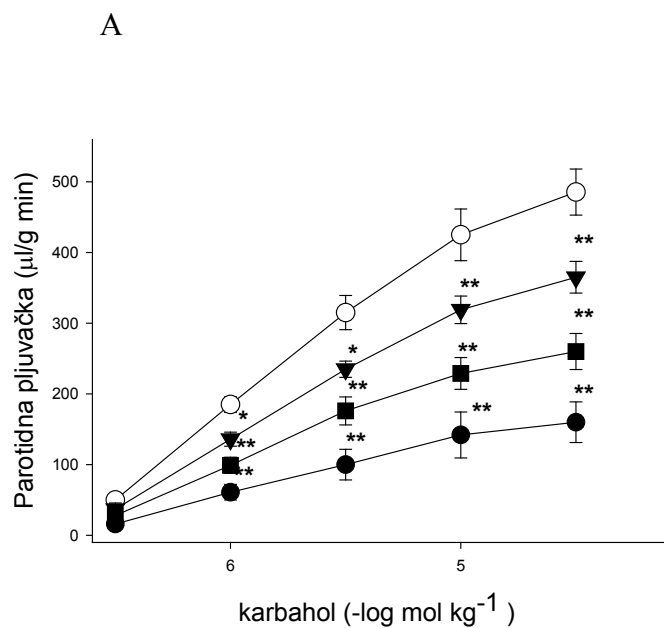
Slika 11. Parotidna pljuvačka kunića izazvana karbaholom (1 μ mol/kg) u prisustvu rastućih doza pirenzepina (■), metoktramina (▲) i pFHHSiD (●). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. (n=5-7).

SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PAROTIDNOJ ŽLEZDI KUNIĆA SA DIJABETESOM

Sekretorni efekt karbahola ($0.3-30 \mu\text{mol/kg}$) značajno je manji kod dijabetičnih u odnosu na sekretorni efekt kod kontrolnih kunića, sa maksimalnom vrednošću od $505.0 \pm 32.5 \mu\text{L/g min}$. Međutim, nije bilo značajne razlike u pED_{50} vrednostima za karbahol između kontrolnih i kunića sa dijabetesom ($\text{pED}_{50} = 5.80 \pm 0.05$ kod kontrolnih u odnosu na $\text{pED}_{50} = 5.75 \pm 0.09$ kod kunića sa dijabetesom).

SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PRISUSTVU INHIBITORA NO SINTAZE KOD KUNIĆA SA DIJABETESOM

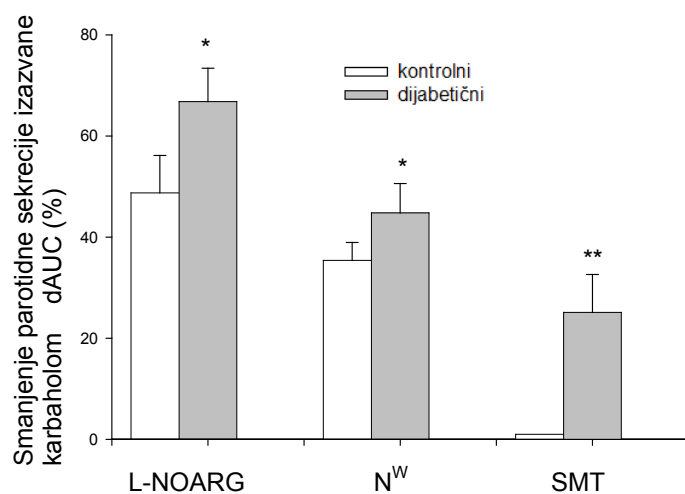
Kod dijabetičnih kunića opaža se značajno smanjenje sekretornog efekta karbahola u prisustvu: L-NOARG (10 mg/kg , $E_{\text{max}} = 165.0 \pm 28.7 \mu\text{L/g min}$), N^{w} (10 mg/kg , $E_{\text{max}} = 260.0 \pm 25.5 \mu\text{L/g min}$) i SMT (10 mg/kg , $E_{\text{max}} = 365.5 \pm 22.4 \mu\text{L/g min}$) (*slika 12A*). Istovremenom primenom N^{w} (10 mg/kg) i SMT (10 mg/kg) postiže se isti inhibitorski efekt kao posle primene L-NOARG (10 mg/kg) (*slika 12B*).



Slika 12. Parotidna pljuvačka dijabetičnih kunića izazvana karbaholom u odsustvu (○) i prisustvu L-NOARG (●), N^W (■) i SMT (▼) (A), i N^W +SMT(△) (B). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. (n=5-7). * p<0.05, **p<0.01, u prisustvu inhibitora u odnosu na kontrolu.

**INHIBITORNI EFEKTI INHIBITORA NO SINTAZE NA PAROTIDNOJ SEKRECIJI
IZAZVANOJ KARBAHOLOM U DIJABETESU**

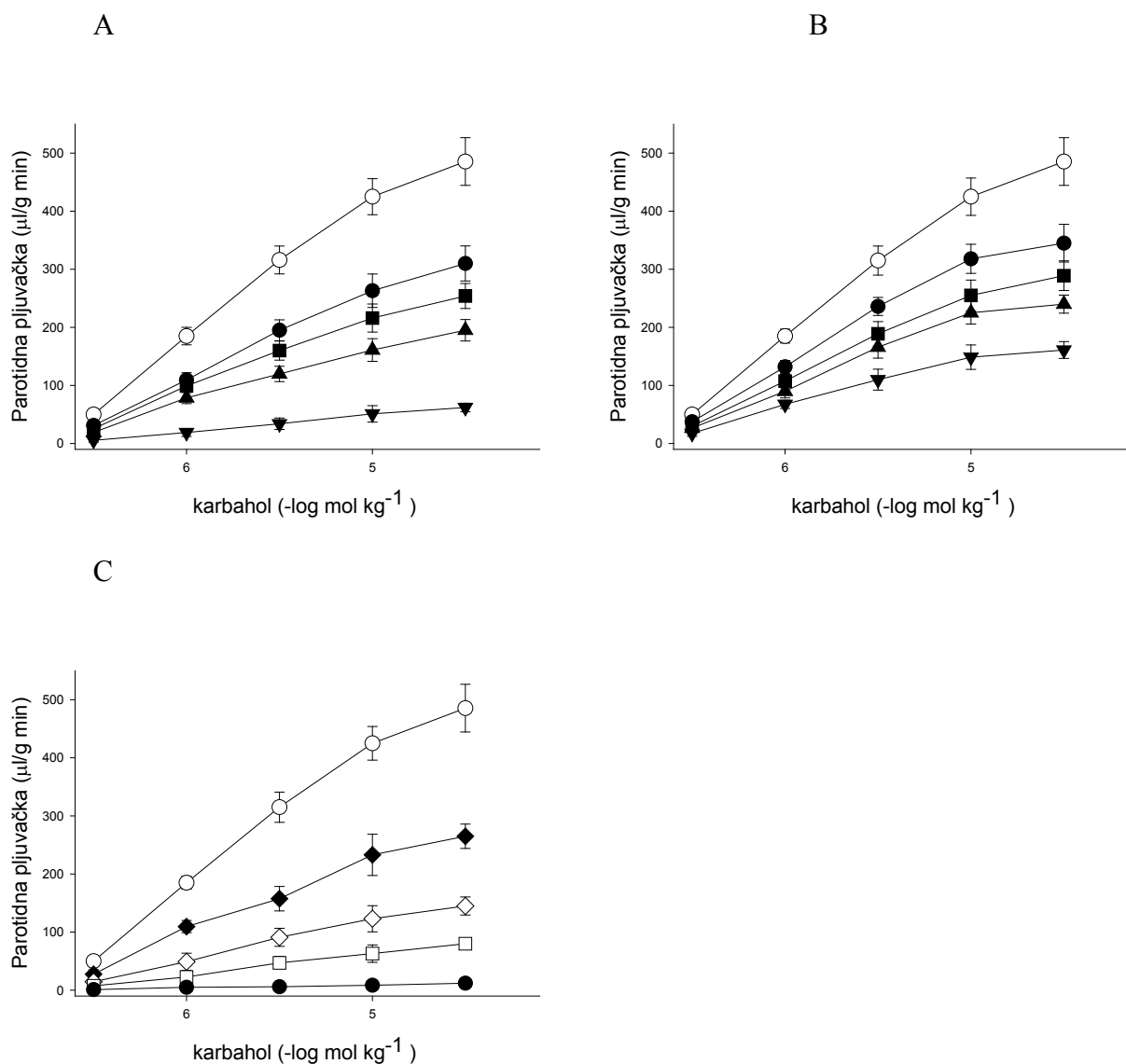
Poređenjem inhibitornih efekata (vrednosti dAUC) antagonista: L-NOARG, SMT i N^w na sekretornom efektu karbahola, pokazano je da inhibitorni efekti svih primenjenih antagonista NOS rastu u dijabetesu (*slika 13*).



Slika 13. Smanjenje sekretornog efekta karbahola u parotidnoj žlezdi kontrolnih i dijabetičnih kunića (izračunato kao % razlike između površina ispod dozno-zavisnih kriva za karbahol) u prisustvu L-NOARG, N^w i SMT. Svaka kolona predstavlja srednju vrednost ± S.E.M. (n=6). * p<0.05, **p<0.01, kunići sa dijabetesom u odnosu na kontrolne

***SEKRETORNI EFEKT KARBAHOLA U PRISUSTVU SELEKTIVNIH ANTAGONISTA
MUSKARINSKIH RECEPTORA KOD KUNIĆA SA DIJABETESOM***

U prisustvu svih primenjenih selektivnih inhibitora muskarinskih receptora, opaža se se značajno smanjenje sekretornog efekta karbahola, u svim primenjenim dozama. Tako, na primer, sekretorni efekt karbahola ($1 \mu\text{mol/kg}$) u prisustvu maksimalne primenjene doze pirenzepina iznosi $18.9 \pm 6.8 \mu\text{l/g min}$, u prisustvu maksimalne primenjene doze metoktramina iznosi $67.5 \pm 7.0 \mu\text{l/g min}$, a u prisustvu maksimalne primenjene doze pFHHSiD iznosi $5.0 \pm 2.2 \mu\text{l/g min}$ (slika 14 A, B I C).

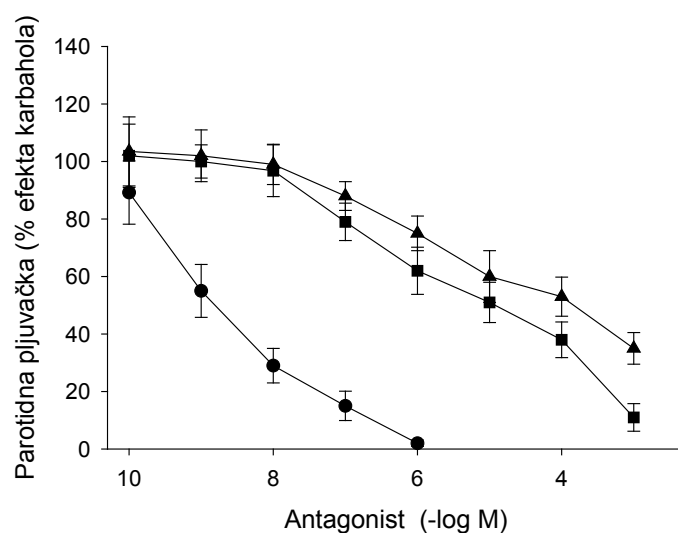


Slika 14. Sekretorni efekt karbahola u parotidnoj žlezdi dijabetičnog kunića u odsustvu (0) i prisustvu 1 μmol/kg (●), 10 μmol/kg (■), 100 μmol/kg (▲) i 1000 μmol/kg (▼) pirenzepina (A) i metoktramina (B), kao i u prisustvu 1 nmol/kg (◆), 10 nmol/kg (◇), 100 nmol/kg (□) i 1000 nmol/kg (●) pFHHSiD (C). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± S.E.M. (n=5-7). Oznake značajnosti nisu prikazane radi bolje preglednosti.

EFEKTI SELEKTIVNIH MUSKARINSKIH ANTAGONISTA NA PAROTIDNU SEKRECIJU IZAZVANU KARBAHOLOM (1 μmol/kg) KOD KUNIĆA SA DIJABETESOM

I kod dijabetičnih kunića, najznačajniji inhibični efekt ostvaruje pFHHSiD, koji značajno smanjuje sekretorni efekt karbahola (1 μmol/kg) već u dozi od 1 nmol/kg, i to za $45.0 \pm 9.2\%$.

Pirenzepin i metoktramin, tek u dozi od $0.1 \mu\text{M}$ dovode do značajnog smanjenja sekrecije izazvane ovom dozom karbahola (za $21.0 \pm 5.0 \%$ i za $12.0 \pm 5.5 \%$). Poređenjem vrednosti pID_{50} za antagoniste kod dijabetičnih kunića (tabela 3), dolazi se do zaključka o visoko značajnom inhibitornom efektu pFHHSiD i manje izraženim inhibitornim efektima pirenzepina i metoktramina (slika 15).



Slika 15. Parotidna pljuvačka izazvana karbaholom ($1\mu\text{mol/kg}$) kod dijabetičnih kunića, u prisustvu rastućih doza pirenzepina (■), metoktramina (▲) i pFHHSiD (●). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. (n=5-7).

Tabela 3. pID_{50} vrednosti za ispitivane antagoniste muskarinskih receptora na parotidnoj sekreciji izazvanoj karbaholom ($1\mu\text{mol/kg}$) kod kontrolnih i kunića sa dijabetesom

(pID_{50})	pFHHSiD	Pirenzepin	Metoktramin
Kontrolna grupa	8.4 ± 0.2	5.0 ± 0.1	4.4 ± 0.2
Dijabetična grupa	8.8 ± 0.3	5.9 ± 0.4	5.8 ± 0.3

mRNK iNOS U IZOLOVANOJ PAROTIDNOJ ARTERIJI I PAROTIDNOJ ŽLEZDI KONTROLNIH I KUNIĆA SA DIJABETESOM

VALIDACIJA KONSTITUTIVNIH GENA ZA ENDOGENE KONTROLE

Analiza (programi: GeNorm i NormFinder) je pokazala da su u arterijama, GAPDH, a u žlezdama FLNB i α aktin, geni sa najmanjim vrednostima stabilnosti (*tabela 4*).

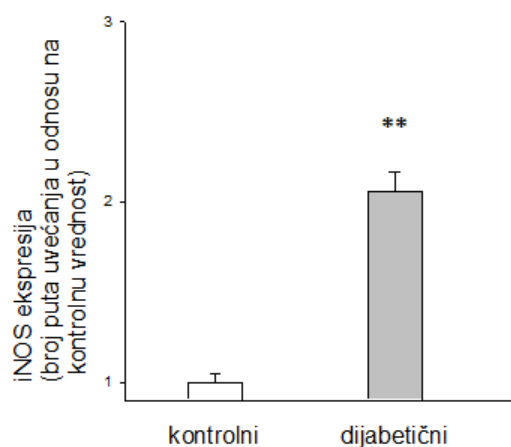
EKSPRESIJA mRNK iNOS U PAROTIDNOJ ARTERIJI I PAROTIDNOJ ŽLEZDI

Kvantitativno određivanje ekspresije mRNK iNOS, primenom Real-time RT-PCR je pokazalo da je u kontrolnim uslovima, u oba tipa tkiva, nivo ekspresije mRNK iNOS jedva merljiv. Dijabetes značajno povećava ekspresiju mRNK iNOS u tkivima, i ona je značajnija u parotidnim žlezdama nego u parotidnim arterijama (35.8 puta u odnosu na 2.06 puta povećanu ekspresiju) kunića sa dijabetesom (*slike 16 i 17*).

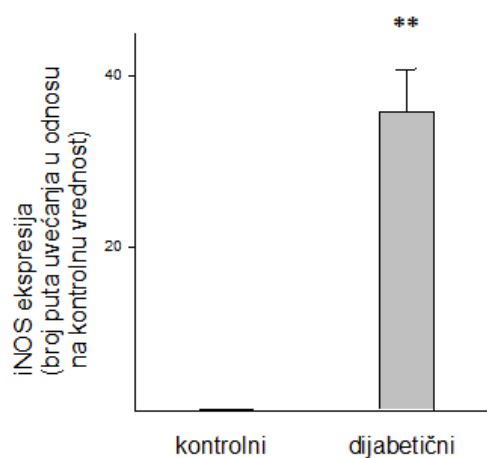
Tabela 4. Stepen stabilnosti ekspresije potencijalnih endogenih kontrola u parotidnoj arteriji i žlezdi kunića

Gen	Vrednost stabilnosti (M) u arterijama	Vrednost stabilnosti (M) u žlezdama
GAPDH	0.128	0.280
FLNB	0.413	0.085
ALFA ACTIN	0.216	0.087
HPRT1	0.226	0.112

Visok stepen stabilnosti ekspresije gena odgovara niskoj vrednosti stabilnosti (M) izračunate korišćenjem programa GeNorm i NormFinder.



Slika 16. Kvantifikacija mRNK iNOS ekspresije u kontrolnim i dijabetičnim parotidnim arterijama kunića. Svaka kolona predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. (n=10-12) **p<0.01, kunići sa dijabetesom u odnosu na kontrolne



Slika 17. Kvantifikacija mRNK iNOS ekspresije u kontrolnim i parotidnim žlezdama kunića sa dijabetesom. Svaka kolona predstavlja srednju vrednost \pm S.E.M. (n =12-15) **p<0.01, kunići sa dijabetesom u odnosu na kontrolne

BAZALNE KONCENTRACIJE cGMP U IZOLOVANOJ PAROTIDNOJ ARTERIJI I PAROTIDNOJ ŽLEZDI KONTROLNIH I KUNIĆA SA DIJABETESOM

Merenje bazalnih koncentracija cGMP je pokazalo značajno povećanje koncentracije cGMP u parotidnoj arteriji i žlezdi kunića sa dijabetesom u odnosu na kontrolne (*tabela 5*).

Tabela 5. Vrednosti bazalnih koncentracija cGMP u parotidnoj arteriji i žlezdi kontrolnih i kunića sa dijabetesom

cGMP (pmol/g)	KONTROLNI KUNIĆI	KUNIĆI SA DIJABETESOM
PAROTIDNA ARTERIJA	275.5 ± 14.5 (n= 7)	382.2 ± 25.0* (n= 6)
PAROTIDNA ŽLEZDA	132.5 ± 16.0 (n= 7)	222.5 ± 18.0* (n= 6)

*p<0.05 kunići sa dijabetesom u odnosu na kontrolne

DISKUSIJA

Dobijeni rezultati pokazuju da dijabetes izazvan aloksanom (100 mg/kg), u trajanju od šest nedelja, značajno smanjuje acetilholinom izazvanu, endotelno zavisnu relaksaciju parotidne arterije kunića, pri čemu je smanjena efikasnost, ali ne i jačina ACh, kao agoniste. Ovakve promene mogu biti, s jedne strane, rezultat promena na nivou muskarinskog receptora, u smislu afiniteta receptora i/ili njihovog broja, i s druge strane, rezultat nastale disfunkcije endotela.

Imunohistohemijska ispitivanja su pokazala da se na krvnim sudovima velikih pljuvačnih žlezda pacova, miša i ovce, mogu naći svi podtipovi muskarinskih receptora, sem M_2 , (Ryberg i sar., 2008; Tobin i sar., 2009; Berggreen i sar., 2009). Međutim, funkcionalna *in vitro* ispitivanja vazodilatacije u submandibularnoj žlezdi pacova, u prisustvu selektivnih inhibitora muskarinskih receptora, su pokazala da su samo M_3 receptori uključeni u vazorelaksantne efekte muskarinskih agonista (Ryberg i sar. 2008). Naši rezultati pokazuju takođe, da muskarinski receptori uključeni u ACh-vazorelaksaciju u parotidnoj arteriji, pripadaju M_3 podtipu, i to kako u fiziološkim uslovima, tako i u dijabetesu. Na ovo ukazuju rezultati da su u parotidnim arterijama kontrolnih i kunića sa dijabetesom, jačina (pA_2) i konstanta afiniteta ($-\log K_B$) antagonist, pFHHSiD (selektivni antagonist M_3 receptora) u opsegu vrednosti koje odgovaraju afinitetu za M_3 receptore (Caulfield i Birdsall, 1998). S druge strane, jačine i konstante afiniteta za pirenzepin (selektivni antagonist M_1) i metoktramin (selektivni antagonist M_2 receptora) su bile značajno niže od vrednosti afiniteta prema M_1 i M_2 receptorima, ali u opsegu njihovih afiniteta prema M_3 receptoru (Caulfield i Birdsall, 1998). Na kompetitivnu prirodu ovog antagonizma ukazuju rezultati da svi pomenuti antagonisti prouzrokuju paralelno udesno pomeranje krive odnosa koncentracije i efekta za ACh, kao i vrednosti nagiba Šildove krive, koji se u svim slučajevima ne razlikuje značajno od jedinice. Kako u našem radu nisu zapažene promene u afinitetu antagonista za M_3 receptore kao ni u osetljivosti M_3 receptora prema ACh, na parotidnim arterijama kunića

sa dijabetesom u odnosu na kontrolne, može se pretpostaviti da smanjena osetljivost parotidne arterije prema ACh u dijabetesu, nije posledica promena na nivou vezivanja agoniste za receptor. Stoga, moguće je da je redukovani vazorelaksantni efekt ACh opažen kod kunića sa dijabetesom, rezultat smanjenog broja M_3 receptora. Mada u našem radu nismo ispitivali broj receptora, rezultati drugih studija jasno ukazuju da se u dijabetesu ekspresija M_3 receptora ili ne menja, kao što je pokazano na aorti miša (Lam i sar., 2006) ili da raste, kao na modelu aorte pacova (Kazuyama i sar., 2009; Shinbori i sar., 2007). Stoga, malo je verovatno da je u uslovima dijabetesa, smanjen broj M_3 receptora na parotidnoj arteriji kunića.

Imajući u vidu ove naše rezultate, kao i pomenute rezultate drugih autora, može se pretpostaviti da smanjenje vazorelaksantnog efekta ACh na parotidnoj arteriji kunića sa dijabetesom, najverovatnije nije posledica promena na receptorskom nivou, već je vezana za poremećaje transdukcionog signala u disfunkcionalnom endotelu. U prilog ovoj pretpostavci govore i naši nalazi da smanjena efikasnost ACh nije specifična samo za M_3 receptore u endotelu, jer je i vazorelaksantni efekt bradikinina, koji je inače endotelno-zavisan i ostvaruje se aktivacijom bradikininskih receptora (Genaro i sar., 2000), takođe, značajno smanjen u parotidnoj arteriji sa očuvanim endotelom kod kunića sa dijabetesom. Šta više, naš rezultat da se vazorelaksantni efekt SNP, donora NO, značajno ne menja na parotidnoj arteriji bez endotela u dijabetesu u odnosu na fiziološke uslove, pokazuje da nema promena u osetljivosti glatkog mišića parotidne arterije kod kunića sa dijabetesom.

Endotelna disfunkcija parotidne arterije kunića u dijabetesu se ogleda prvenstveno u smanjenom stvaranju endotelnih vazodilatatora. U prilog ovoj pretpostavci govori naš rezultat da je kod kontrolnih kunića, vazokonstriktorni efekt fenilefrina značajno veći u parotidnim arterijama bez endotela u odnosu na arterije sa intaktnim endotelom, kao i da je maksimalni efekt fenilefrina na preparatima bez endotela, gotovo identičan sa maksimalnim efektima fenilefrina

na arterijama kunića sa dijabetesom. S obzirom da kod kunića sa dijabetesom nisu opažene razlike u maksimalnim vazokonstriktornim efektima fenilefrina između parotidnih arterija sa i bez endotela, može se pretpostaviti da je povećanje vazokonstriktornog efekta fenilefrina na dijabetičnoj parotidnoj arteriji verovatno posledica smanjene sposobnosti endotela da oslobađa vazodilatatore, a ne povećanog oslobađanja endotelnih vazokonstriktora.

U ACh-vazorelaksaciju parotidne arterije kunića uključena su sva tri endotelna vazodilatatorna faktora, endotelni NO, prostaciklin i EDHF. Naime, u parotidnoj arteriji kontrolnih i kunića sa dijabetesom, prisustvo L-NOARG, neselektivnog inhibitora NOS, indometacina, neselektivnog inhibitora COX, i K^+ - hiperpolarizujućeg rastvora, prouzrokuje značajno smanjenje ACh vazorelaksantnog efekta. Poređenjem efekata ovih inhibitora, utvrdili smo da se u dijabetesu, inhibitorski efekt L-NOARG smanjuje, a da inhibitorski efekti indometacina i K^+ rastvora rastu, što ukazuje na značajno smanjenje NO komponente i značajno povećanje prostaciklinske- i EDHF-komponenti endotelno-zavisne vazodilatacije. U tumačenju ovih rezultata, značajno je pomenuti istraživanja koja pokazuju da koncentracija NO ima značajnu ulogu u modulaciji vaskularnih efekata i prostaglandina i EDHF. Naime, Nishikawa i sar. (2000) su pokazali da NO inhibiše EDHF- vazodilataciju u *in vivo* ispitivanjima na koronarnim arteriolama psa u fiziološkim uslovima, dok su *in vitro* ispitivanja u kulturi endotelnih ćelija goveda pokazala da, u fiziološkom stanju, NO ima inhibitorski efekt i na stvaranje prostaglandina (Doni i sar., 1988). S druge strane, u uslovima smanjene sinteze/oslobađanja endotelnog NO, raste učešće EDHF komponente vazodilatacije, kao što je pokazano u karotidnoj arteriji kunića sa hiperholesterolemijom (Najibi i sar., 1994), kao i učešće prostaciklinske vazodilatacije na izolovanim mezenteričnim arterijama miša bez gena za eNOS (Chataigneau i sar., 1999). Imajući u vidu pomenute nalaze, kao i naše rezultate o značajnom smanjenju ACh, endotelno-zavisnog vazorelaksantnog efekta u parotidnoj arteriji kunića sa

dijabetesom, možemo pretpostaviti da je opaženo povećano stvaranje prostanoida i EDHF, kompenzatorni mehanizam za očuvanje vaskularne funkcije parotidne arterije u dijabetesu. Do sličnog zaključka su došli i Nacci i sar.(2009), ispitujući porast aktivnosti ciklooksigenaze u mezenteričnim arterijama miša sa dijabetesom, kao i Meeking i sar.(2000), mereći protok krvi kroz nadlakticu ljudi sa dijabetesom, u prisustvu inhibitora ciklooksigenaze. Važno je napomenuti da je u submandibularnoj žlezdi pacova pokazana značajna međusobna regulacija aktivacije enzima NOS i COX, i sledstvenog stvaranja NO i prostaglandina, na nivou vazoaktivnih medijatora uključenih u sintezu NO i prostanoida (Borda i sar., 2002). Naime, pokazano je da NO, aktivacijom gvanilatne ciklaze i stvaranjem cGMP, stimuliše aktivnost COX, a s druge strane, prostaglandin E2 stvaranjem cAMP utiče na aktivaciju NOS u submandibularnoj žlezdi pacova (Borda i sar., 2002). Imajući ovo u vidu, možemo da pretpostavimo da značajna interakcija između enzima NOS i COX, na nivou krvnih sudova pljuvačnih žlezda postoji i u patološkim stanjima, kao što je dijabetes. Šta više, Li i sar. (2010) su pokazali da u dijabetičnoj aorti pacova raste aktivnost enzima uključenih u zapaljenje, iNOS i COX-2, koji se međusobno aktiviraju i tako, sinergistički utiču na nastanak vaskulopatije. U našim istraživanjima, utvrdili smo značajno povećanje ekspresije i aktivnosti iNOS, pa se čini mogućim da je i porast prostaglandina u dijabetesu rezultat aktivacije enzima ciklooksigenaze u prisustvu iNOS.

Da bi ispitali značaj različitih izoformi NOS za vazorelaksaciju parotidne arterije u fiziološkim uslovima i dijabetesu, pratili smo efekte selektivnih inhibitora NOS na vazorelaksantnom dejstvu ACh. U fiziološkim uslovima, eNOS je od primarnog značaja za vazorelaksaciju parotidne arterije, jer su naši rezultati pokazali da se efekt ACh menja u prisustvu L-NOARG, neselektivnog inhibitora NOS, ali ne i u prisustvu SMT i N^w, selektivnih inhibitora iNOS i nNOS. Takođe, molekularna merenja mRNK iNOS su pokazala da gotovo i nema ove ekspresije u parotidnim arterijama kontrolnih kunića. Ovde je važno napomenuti da je merenje

ekspresije iNOS izuzetno značajno za uvid u njenu funkciju, jer se regulacija iNOS prvenstveno odvija na nivou ekspresije mRNA enzima, i za razliku od većine drugih enzima, kada se jednom eksprimira, iNOS aktivnost nije u velikoj meri regulisana drugim faktorima (Kleinert i sar., 2004). S druge strane, funkcionalna i molekularna ispitivanja na parotidnoj arteriji kunića sa dijabetesom, pokazuju da, dok nNOS nema značajnu ulogu u vazodilataciji ni u fiziološkim uslovima ni u dijabetesu, indukovana iNOS dobija značajnu ulogu u vazodilataciji u dijabetesu. Naime, u prisustvu visoko selektivnog inhibitora iNOS, SMT, vazodilatatorni efekt ACh na parotidnoj arteriji kunića sa dijabetesom je značajno smanjen, a opaženo je i značajno povećanje ekspresije mRNA iNOS u arterijama kunića sa dijabetesom u odnosu na kontrolne. Interesantno je da povećanje ekspresije mRNA iNOS, kao i stvaranje NO poreklom od iNOS, prati smanjenje ukupnog NO, jer se u dijabetesu inhibitorni efekt L-NOARG smanjuje, dok se inhibitorni efekt SMT povećava. Ovakav disbalans u stvaranju NO govori u prilog složenosti odnosa između eNOS i iNOS u parotidnoj arteriji kunića sa dijabetesom. Molekularna ispitivanja ekspresije NOS izoformi u različitim tkivima u dijabetesu pokazuju da se po pravilu, ekspresija eNOS smanjuje a iNOS raste (Bojunga i sar., 2004). Mehanizmi regulacije NOS u dijabetesu nisu razjašnjeni, ali istraživanja pokazuju da hiperglikemija izaziva aktivaciju enzima protein kinaze C u endotelnim ćelijama, i da ovaj enzim ispoljava negativno dejstvo na transkripciju gena za eNOS, dok stimulatorno deluje na iNOS ekspresiju (Hirata i sar., 1995). Takođe, manjak insulina u dijabetesu ima za posledicu smanjenje ekspresije eNOS (Kuboki i sar., 2000). iNOS, kao kritični molekul u nastanku oksidativno/nitrosativnog stresa, već pomenutim mehanizmima (v. uvod), može da ugrozi stvaranje NO poreklom od eNOS. Još jedan važan aspekt u razmatranju interakcije između ovih enzima jeste mogućnost međusobne kompeticije između iNOS i eNOS po pitanju stvaranja NO, jer oba enzima zahtevaju isti supstrat i kofaktore neophodne za stvaranje NO. Ovakav vid interakcije dolazi posebno do izražaja ukoliko su enzimi kolokalizovani, što

jeste i slučaj u našim istraživanjima, na parotidnoj arteriji kunića sa dijabetesom. Naime, naši rezultati su pokazali da se inhibitorni efekt SMT (selektivni inhibitor iNOS) na vazodilataciji izazvanoj ACh opaža kod kunića sa dijabetesom samo na parotidnim arterijama sa očuvanim endotelom, što govori o endotelnoj lokalizaciji iNOS.

Pored pomenutih efekata na funkciju parotidne arterije koja dovodi krv u parotidnu žlezdu, i time na promene u protoku krvi kroz parotidnu žlezdu, dijabetes prouzrokuje i direktno smanjenje sekretorne funkcije ove žlezde. Naime, naša *in vivo* ispitivanja su pokazala da se posle šest nedelja eksperimentalnog dijabetesa značajno smanjuje sekrecija parotidne pljuvačke kunića, izazvane karbaholom, agonistom muskarinskih holinergičkih receptora. Važno je istaći da su Watanabe i sar. (2001), već posle dve nedelje eksperimentalnog dijabetesa, opazili značajno smanjenje sekrecije u submandibularnoj i parotidnoj žlezdi pacova, izazvane pilokarpinom, drugim agonistom muskarinskih holinergičkih receptora. Analizirajući redukovani sijalogogni efekt pilokarpina, ovi autori su primenom metode vezivanja radioaktivno- obeleženog kvinuklinidinil benzilata ([³H]quinuclidinyl benzilate, QNB) pokazali da je kod pacova sa dijabetesom smanjen broj vezivnih mesta za muskarinski receptor u ćelijskim membranama parotidne žlezde, smanjen afinitet muskarinskih receptora u submandibularnoj žlezdi, i smanjena jačina muskarinskih agonista. Međutim, autori nisu analizirali učešće pojedinih podtipova muskarinskih receptora u sijalogognom efektu muskarinskog agoniste. Postoji pretpostavka da se u žlezdama koje sadrže mukusne ćelije, kakve su submandibularna i sublingvalna žlezda, na acinusnim ćelijama nalaze funkcionalni i M₁ i M₃ receptori i da je njihova koaktivacija neophodna za ostvarivanje maksimalnog sekretornog efekta (Tobin i sar., 2006; Culp i sar., 1996). S druge strane, u parotidnoj žlezdi koja sadrži samo serozne sekretorne ćelije, M₃ receptori su dominantni i odgovorni za holinergičku sekreciju (Bockman i sar., 2001; Dai i sar., 1991).

Naša *in vivo* merenja parotidne sekrecije, izazvane karbaholom, u prisustvu selektivnih inhibitora muskarinskih receptora, pokazuju da su M_3 receptori uključeni u holinergički izazvanu sekreciju parotidne pljuvačke kunića, i to kako u fiziološkim uslovima, tako i u dijabetesu. Naime, vrednosti pID_{50} (logaritamske vrednosti srednje inhibitorne doze) za pFHHSiD, selektivni M_3 antagonist, je značajno veći od vrednosti pID_{50} za metoktramin, selektivni M_2 , i pirenzepin, selektivni M_1 antagonist. Takođe, činjenica da se pID_{50} za sva tri primenjena antagonista ne razlikuje značajno između kontrolnih i kunića sa dijabetesom, upućuje na zaključak da su M_3 receptori u parotidnoj žlezdi kunića odgovorni za sekreciju pljuvačke i u dijabetesu. Šta više, naši rezultati pokazuju da se pED_{50} za karbahol takođe, značajno ne menja kod kunića sa dijabetesom u odnosu na kontrolne, što direktno ukazuje na činjenicu da dijabetes ne menja jačinu ovog agoniste u parotidnoj žlezdi, a indirektno, da nije promenjen afinitet receptora.

Imajući u vidu značaj NO, kao signalnog molekula u transdukcionom mehanizmu koji prati aktivaciju muskarinskih receptora i kao neuromodulatora koji učestvuje u sekretornoj funkciji pljuvačnih žlezda (Looms i sar., 2002), od značaja je bilo ispitati učešće različitih NOS izoformi u parotidnoj sekreciji kunića, kako u fiziološkom stanju, tako i u dijabetesu, o čemu do sada nije bilo podataka. Naša ispitivanja sekrecije parotidne žlezde, izazvane karbaholom, u prisustvu selektivnih inhibitora NOS, pokazuju da je u fiziološkim uslovima od primarnog značaja aktivnost nNOS jer je inhibicija sekrecije pljuvačke u prisustvu N^w , selektivnog inhibitora nNOS, malo manja (za 15%) od inhibicije izazvane primenom L-NOARG, neselektivnog inhibitora NOS. Do istog zaključka su došli i Sugiya i sar. (2001) u *in vitro* ispitivanjima u parotidnim acinusima kunića, gde je imunohistohemijska analiza pokazala prisustvo samo nNOS izoforme, koja se aktivira stimulacijom muskarinskog receptora. Iako su merenja imunoreaktivnosti u velikim pljuvačnim žlezdama pacova pokazala prisustvo iNOS i u fiziološkim uslovima (Rettori i sar., 2000), naša funkcionalna ispitivanja na parotidnoj žlezdi

kontrolnih kunića pokazuju da se sekrecija pljuvačke izazvana karbaholom značajno ne menja u prisustvu SMT, selektivnog inhibitora iNOS. Takođe, u parotidnoj žlezdi u fiziološkim uslovima ekspresija mRNK iNOS nije značajna. Nasuprot tome, u parotidnoj žlezdi kunića sa dijabetesom dolazi do značajnih promena u aktivnosti različitih NOS izoformi, uključenih u smanjenu sekretornu aktivnost. Pre svega, naši rezultati pokazuju da u parotidnoj žlezdi kunića sa dijabetesom dolazi do povećanja ukupne aktivnosti NOS, jer raste inhibitorski efekt L-NOARG, neselektivnog inhibitora NOS, na parotidnoj sekreciji. Ovo povećanje aktivnosti NOS se može pripisati povećanoj aktivnosti i neuralne NOS i inducibilne NOS, pošto su inhibitorski efekti selektivnih antagonista nNOS i iNOS, N^w i SMT, značajno veći u parotidnoj žlezdi kunića sa dijabetesom u odnosu na kontrolne. Takođe, ekspresija mRNK iNOS je veća u parotidnim žlezdama kunića sa dijabetesom u odnosu na kontrolne. Imajući u vidu činjenicu da je kod kontrolnih kunića inhibitorski efekt N^w , selektivnog inhibitora nNOS, manji od inhibitorskog efekta L-NOARG, neselektivnog inhibitora NOS, i da pri tome iNOS nije uključena u ovaj efekt, može se pretpostaviti delimično učešće eNOS u fiziološkim procesima sekrecije parotidne pljuvačke kunića. S druge strane, kod kunića sa dijabetesom inhibitorski efekt L-NOARG na parotidnoj sekreciji je skoro identičan sa inhibitorskim efektom koji se postiže istovremenom primenom N^w i SMT. Ovo je u saglasnosti sa nalazima da je eNOS prvenstveno lokalizovana u krvnim sudovima velikih pljuvačnih žlezda pacova i čoveka (Rettori i sar. 2000; Soinila i sar. 2006).

Imajući sve ovo u vidu, naši rezultati pokazuju da u dijabetesu, poremećaj sekrecije parotidne žlezde kunića je, verovatnije, posledica poremećaja transdukcionog signala muskarinskih receptora u žlezdanom tkivu, a manje verovatno da je posledica promena na nivou afiniteta i broja receptora.

Skorašnja istraživanja Turner i sar. (2011) ukazuju na značajnu ulogu oksidativnog stresa u nastanku patoloških promena u pljuvačnim žlezdama u toku eksperimentalnog dijabetesa. Ovi

autori su utvrdili da dijabetes prouzrokuje disbalans u stvaranju reaktivnih kiseoničnih radikala, kao što su vodonik peroksid, superoksidni anjon i NO, i antioksidativnih enzima, s druge strane. Pri tome, među ovim radikalima postoji porast NO i vodonik peroksida i istovremeno smanjenje stvaranja superoksidnog anjona. Takođe, ista studija je pokazala da postoji srazmeran odnos između ekspresije i aktivnosti enzima peroksidaze i iNOS, i obrnuto srazmeran odnos aktivnosti i ekspresije enzima superoksid dizmutaze, kao i da se poremećaj funkcije pljuvačnih žlezda javlja ukoliko duže vreme postoji visok nivo vodonik peroksida uz nizak nivo peroksidaza (Turner i sar., 2011). Imajući u vidu da se jednim od ključnih molekula u oksidativno/nitrosativnom stresu smatra iNOS, kao i da do sada nije bilo podataka o ekspresiji mRNK iNOS u pljuvačnim žlezdama u dijabetesu, naši rezultati daju značajan doprinos u daljem ispitivanju mehanizama odgovornih za nastanak sekretorne hipofunkcije pljuvačnih žlezda u dijabetesu.

Za razmatranje mehanizama uključenih u hipofunkciju pljuvačnih žlezda u dijabetesu, na ćelijskom nivou, veoma značajno je *in vitro* istraživanje Fedirka i sar (2006) u submandibularnoj žlezdi pacova. Naime, ovi autori su pokazali da u dijabetesu dolazi do prekomernog stimulisanog oslobađanja Ca^{2+} , aktivnošću muskarinskih receptora, kao i do smanjene funkcije Ca^{2+} -ATP-aze, što za posledicu ima smanjenje sadržaja Ca^{2+} u endoplazmatskom retikulumu (Fedirko i sar., 2006).

Iako, do sada, nije bilo podataka o značaju autonomne neuropatije u mehanizmima odgovornim za hipofunkciju pljuvačnih žlezda u ranom dijabetesu, istraživanja smanjene funkcije drugih sekretornih organa u dijabetesu, kao što su bubrezi, pokazuju da i u ranom dijabetesu (4-6 nedelja) postoje znaci periferne i autonomne neuropatije (Fushimi i sar., 1988). Najznačajniji mehanizam nastanka poremećaja funkcije neurona u toku dijabetesa je oksidativni stres (Negi i sar., 2011). U našim istraživanjima, pokazali smo da dijabetes izaziva veliku ekspresiju mRNK

iNOS, kao i značajno povećanje aktivnosti iNOS, ali i povećanje aktivnosti nNOS, i stvaranje neuralnog NO koji takođe može da doprinese disbalansu u stvaranju NO i oksidativnom stresu. Imajući u vidu da su ovo prvi rezultati o promenama u aktivnosti nNOS i iNOS u pljuvačnim žlezdama u toku dijabetesa, naknadna istraživanja su neophodna da bi se objasnile pojedinačne uloge iNOS i nNOS u funkciji pljuvačnih žlezda u dijabetesu. Buduća istraživanja bi trebalo da ustanove kako smanjiti patološko povećanje NO, a pri tome ne narušiti fiziološku ulogu NO u sekreciji, a sve to u cilju razvoja novih terapijskih strategija za lečenje hipofunkcije pljuvačnih žlezda.

U pljuvačnim žlezdama, cGMP je uključen u transdukcione mehanizme, kako muskarinskih receptora tako i NO (Xu i sar., 1997; Sakai i sar., 2002). Ishikawa i sar. (2002) su pokazali da u acinusnim ćelijama pacova u fiziološkim uslovima, transdukcioni signal koji prati aktivaciju muskarinskih receptora i dovodi do sekrecije, čini aktivacija nNOS, preko Ca^{2+} i kalmodulina, i sledstvena stimulacija gvanilatne ciklaze sa povećanjem stvaranja cGMP. Iako je na mnogobrojnim animalnim i humanim krvnim sudovima pokazan značaj NO-cGMP signalnog puta za regulaciju vaskularnog tonusa (Schulz i sar., 2002; Morgado i sar., 2011), do sada nije bilo podataka o učešću cGMP u kontroli tonusa krvnih sudova u pljuvačnim žlezdama.

Naši rezultati su pokazali da se bazalni nivo cGMP značajno povećava u dijabetesu u odnosu na kontrolne uslove, kako u parotidnoj arteriji tako i u žlezdi. Do sličnih rezultata došli su i Bojunga i sar. (2004) koji su pokazali da je kod pacova bazalno stvaranje cGMP mnogo veće u dijabetesu nego u fiziološkim uslovima, u aorti, srcu i bubrezima. S tim u vezi, značajno je ponovo istaći da u našim eksperimentima, i u arteriji i u žlezdi, u dijabetesu raste ekspresija i aktivnost iNOS. Imajući u vidu da nismo direktno ispitivali odnos cGMP i ekspresije drugih NOS izoformi, treba napomenuti da dijabetes različito utiče na pojedine NOS izoforme kao i aktivaciju NO-cGMP sistema (Tilton i sar., 1993; Corbett i sar., 1992). Naime, pomenuti autori su na

animalnim modelima pokazali da dijabetes povećava ekspresiju i aktivnost iNOS a inhibiše eNOS, što smo indirektno, u funkcionalnim studijama, i mi pokazali, kao i da aktivacija NO-cGMP sistema u kombinaciji sa oksidativnim stresom doprinosi razvoju endotelne disfunkcije kod životinja sa dijabetesom.

ZAKLJUČCI

- **ACh prouzrokuje koncentracijski i endotelno-zavisnu relaksaciju parotidne arterije kunića, aktivacijom muskarinskih M₃ receptora, efekt koji je značajno smanjen u dijabetesu**
- **Smanjenje vazorelaksantnog efekta ACh na parotidnoj arteriji kunića, najverovatnije, nije posledica promena na nivou muskarinskog M₃ receptora već promena u transdukcionom signalu u disfunkcionalnom endotelu.**
- **U osnovi disfunkcije endotela u parotidnoj arteriji kunića sa dijabetesom je smanjeno stvaranje/oslobađanje NO poreklom iz endotela koje prati povećano stvaranje/oslobađanje drugih endotelnih faktora, prostaciklina i EDHF, najverovatnije kao kompenzatorni mehanizam očuvanja vazodilatacije u parotidnoj arteriji u dijabetesu.**
- **Uporedo sa značajnim smanjenjem aktivnosti eNOS, u parotidnoj arteriji kunića sa dijabetesom, dolazi do značajnog povećanja aktivnosti i ekspresije iNOS. S obzirom da su obe izoforme u parotidnoj arteriji kunića kolokalizovane u endotelu, i za funkciju su im neophodni isti supstrat i kofaktori, može se pretpostaviti da iNOS deluje antagonistički sa eNOS zbog kompeticije za isti supstrat i kofaktore uključene u stvaranje NO.**
- **Karbahol izaziva dozno-zavisno povećanje sekrecije u parotidnoj žlezdi kunića, aktivacijom muskarinskih M₃ receptora, efekt koji je značajno smanjen u dijabetesu.**

- **Smanjenje sekretornog efekta karbahola u parotidnoj žlezdi kunića sa dijabetesom, najverovatnije, nije posledica promena na nivou muskarinskog M_3 receptora već promena u transdukcionom signalu uključenom u sekretorni proces.**
- **U parotidnoj žlezdi kunića sa dijabetesom dolazi do povećanja ukupne aktivnosti NOS za koje je odgovorno povećanje aktivnosti nNOS i iNOS uz značajno povećanje ekspresije iNOS. Može se pretpostaviti da prekomerno stvaranje NO, prvenstveno kao posledica povećanja aktivnosti i ekspresije iNOS, mehanizmom koji, najverovatnije, uključuje oksidativni stres, menja funkciju signalnih molekula i smanjuje sekreciju parotidne pljuvačke kunića sa dijabetesom.**
- **U parotidnoj arteriji i žlezdi kunića sa dijabetesom značajno se povećava bazalna koncentracija cGMP, osnovnog signalnog efektornog molekula NO. Može se pretpostaviti da promenjena aktivnost NO-cGMP sistema u dijabetesu, najverovatnije u kombinaciji sa oksidativnim stresom, doprinosi razvoju endotelne disfunkcije parotidne arterije i sekretorne hipofunkcije parotidne žlezde kunića sa dijabetesom.**

LITERATURA

Alm P, Ekström J, Larsson B, Tobin G, Anderson KE. Nitric oxide synthase immunoreactive nerves in rat and ferret salivary glands, and the effects of denervation. *Histochem J*, 1997;29:669-676.

Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diab Vasc Dis Res*. 2011;8(1):22-8

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004; 64(15):5245-50.

Anderson, LC; Martin, DJ; Philips, DL; Killpack, KJ; Bone, SE; Rahimian, R. The influence of gender on parasympathetic vasodilation in the submandibular gland of rat. *Exp Physiol*, 2006; 91: 435-444.

Anderson, LC; Garrett, JR. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for impaired endothelium-dependent vasodilation. *Arch Oral Biol*, 2004; 49: 183-191.

Angus JA, Cocks TM. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther*. 1989;41(1-2):303-52.

Arana C, Cutando A, Ferrera MJ, Gómez-Moreno G, Worf CV, Bolaños MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(9):554-9.

Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation*, 1996;94:3341-3347.

Berggreen E, Nyløkken K, Delaleu N, Hajdaragic-Ibricevic H, Jonsson MV. Impaired vascular responses to parasympathetic nerve stimulation and muscarinic receptor activation in the submandibular gland in nonobese diabetic mice. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(1):R18.

Bockman CS, Bradley ME, Dang HK, Zeng W, Scofield MA, Dowd FJ. Molecular and pharmacological characterization of muscarinic receptor subtypes in a rat parotid gland cell line: comparison with native parotid gland. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(2):718-26.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001;2(10):907-16.

Bojunga J, Dresar-Mayert B, Usadel KH, Kusterer K, Zeuzem S. Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(3):771-80.

Borda E, Heizig G, Busch L, Sterin-Borda L. Nitric oxide synthase/PGE(2) cross-talk in rat submandibular gland. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;67(1):39-44.

Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol.* 2003;48(2):93-100.

Bruchas MR, Toews ML, Bockman CS, Abel PW. Characterization of the alpha1-adrenoceptor subtype activating extracellular signal-regulated kinase in submandibular gland acinar cells. *Eur J Pharmacol.* 2008; 578(2-3):349-58.

Buckle AD, Parker SJ, Bloom SR, Edwards AV. The role of nitric oxide in the control of protein secretion in the submandibular gland of the cat. *Exp Physiol.* 1995;80(6):1019-30.

Caldeira EJ, Camilli JA, Cagnon VH. Stereology and ultrastructure of the salivary glands of diabetic Nod mice submitted to long-term insulin treatment. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005;286(2):930-7.

Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50(2):279-90.

Ceccatelli S, Lundberg JM, Zhang X, Åman K, Hökfelt T. Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral nervous system. *Brain Res.* 1994;656:381-395.

Changrani NR, Chonkar A, Adeghate E, Singh J. Effects of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus on total protein concentrations and cation contents in the isolated pancreas, parotid, submandibular, and lacrimal glands of rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:503-19.

Chataigneau T, Félétou M, Huang PL, Fishman MC, Duhault J, Vanhoutte PM. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol.* 1999;126(1):219-26.

Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR Jr, Williamson JR, McDaniel ML. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes.* 1992;41(4):552-6.

Culp DJ, Luo W, Richardson LA, Watson GE, Latchney LR. Both M1 and M3 receptors regulate exocrine secretion by mucous acini. *Am J Physiol.* 1996;271(6 Pt 1):C1963-72.

Dai YS, Ambudkar IS, Horn VJ, Yeh CK, Kousvelari EE, Wall SJ, Li M, Yasuda RP, Wolfe BB, Baum BJ. Evidence that M3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *Am J Physiol.* 1991;261(6 Pt 1):C1063-73.

Derks NM, Müller M, Gaszner B, Tilburg-Ouwens DT, Roubos EW, Kozicz LT. Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience.* 2008;156(2):305-9.

De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van De Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 963-974.

Ding H, Triggle CR. Endothelial cell dysfunction and the vascular complications associated with type 2 diabetes: assessing the health of the endothelium. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(1):55-71.

Doni MG, Whittle BJ, Palmer RM, Moncada S. Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol.* 1988; 22;151(1):19-25.

Edwards AV, Garrett JR. Endothelium-derived vasodilator responses to sympathetic stimulation of the submandibular gland in the cat. *J Physiol.* 1992; 456:491-501.

Edwards AV, Garrett JR. Nitric oxide- related vasodilator responses to parasympathetic stimulation of the submandibular gland in the cat. *J Physiol,* 1993;464:379-392.

Edwards AV, Tobin G, Ekström J, Bloom SR. Nitric oxide and release of the peptide VIP from parasympathetic terminals in the submandibular gland of the anaesthetized cat. *Exp Physiol,* 1996; 81(3): 349-359.

Edwards AV. Autonomic control of salivary blood flow. In: GarretJR, EkströmJ, AndersonLC, eds. Glandular mechanisms of salivary secretion. *Frontiers of oral biology*, vol 10. Basel: Karger, 1998; 110–117.

Fedirko NV, Kruglikov IA, Kopach OV, Vats JA, Kostyuk PG, Voitenko NV. Changes in functioning of rat submandibular salivary gland under streptozotocin-induced diabetes are associated with alterations of Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ transporting pumps. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(3):294-303.

Fushimi H, Inoue T, Matsuyama Y, Kishino B, Kameyama M, Funakawa S, Tochino Y, Yamatodani A, Wada H, Minami T, et al. Impaired catecholamine secretion as a cause of diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 1988;4(4):303-7.

Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, Ziche M. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(8):587-96.

Genaro AM, Stranieri GM, Borda E. Involvement of the endogenous nitric oxide signalling system in bradykinin receptor activation in rat submandibular salivary gland. *Arch Oral Biol*. 2000;45(9):723-9.

Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*, 2002;55:250-260.

Golden SH. Emerging therapeutic approaches for the management of diabetes mellitus and macrovascular complications. *Am J Cardiol*. 2011;108(3 Suppl):59B-67B.

Graham DJ, Campen D, Hui R, Spence M, Cheetham C, Levy G, Shoor S, Ray WA. Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in patients treated with cyclo-oxygenase 2 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: nested case-control study. *Lancet*. 2005;365(9458):475-81.

Gumieniczek A, Hopkała H, Wójtowicz Z, Nikołajuk J. Changes in antioxidant status of heart muscle tissue in experimental diabetes in rabbits. *Acta Biochim Pol*. 2002;49(2):529-35.

Hirata K, Kuroda R, Sakoda T, Katayama M, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, Yokoyama M. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension*. 1995;25(2):180-5.

Ishikawa Y, Iida H, Skowronski MT, Ishida H. Activation of endogenous nitric oxide synthase coupled with methacholine-induced exocytosis in rat parotid acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(1):355-63.

Jenkinson DH. How we describe competitive antagonists: three questions of usage. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 53-54.

Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives. *Circ J.* 2010;74(5):836-43.

Kazuyama E, Saito M, Kinoshita Y, Satoh I, Dimitriadis F, Satoh K. Endothelial dysfunction in the early- and late-stage type-2 diabetic Goto-Kakizaki rat aorta. *Mol Cell Biochem.* 2009;332(1-2):95-102.

Kenakin TP. *A pharmacology primer: theory, application, and methods.* London: Elsevier Academic Press, 2004; 93-123.

Kerezoudis NP, Olgart L, Edwall L. Differential effects of nitric oxide synthesis inhibition on basal blood flow and antidromic vasodilation in rat oral tissues. *Eur J Pharmacol.* 1993; 241(2-3):209-19.

Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 2004;500(1-3):255-66.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* 1998;113(2):147-56.

Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation.* 2000;101(6):676-81.

Lagaud GJ, Masih-Khan E, Kai S, van Breemen C, Dubé GP. Influence of type II diabetes on arterial tone and endothelial function in murine mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res.* 2001;38(6):578-89.

Lam TY, Seto SW, Lau YM, Au LS, Kwan YW, Ngai SM, Tsui KW. Impairment of the vascular relaxation and differential expression of caveolin-1 of the aorta of diabetic +db/+db mice. *Eur J Pharmacol.* 2006;546(1-3):134-41.

Lau YT, Ma WC. Nitric oxide inhibits migration of cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;221(3):670-4.

Li Y, Qi J, Liu K, Li B, Wang H, Jia J. Peroxynitrite-induced nitration of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase promotes their binding in diabetic angiopathy. *Mol Med.* 2010;16(9-10):335-42.

Lohinai Z, Szekely AD, Soos L, Feher E. Distribution of nitric oxide synthase containing elements in the feline submandibular gland. *Neurosci Lett* 1995;195:9-12.

Lohinai Z, Balla I, Marczis J, Vass Z, Kovách AG. The effect of a nitric oxide donor and an inhibitor of nitric oxide synthase on blood flow and vascular resistance in feline submandibular, parotid and pancreatic glands. *Arch Oral Biol.* 1996;41(7):699-704.

Looms D, Tritsarlis K, Pedersen AM, Nauntofte B, Dissing S. Nitric oxide signalling in salivary glands. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(10):569-84.

Marcelín-Jiménez G, Escalante B. Functional and cellular interactions between nitric oxide and prostacyclin. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2001 Aug;129(4):349-59.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signalling and NO production. *Eur J Physiol* 2010; 459:807-816.

Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest,* 1997;100(9):2146-52.

Mombouli J, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol,* 1999; 31:61-74.

Morgado M, Cairrão E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Sep 27. [Epub ahead of print]

Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA.* 2001;286(8):954-9.

Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):217-52.

Modin, A; Weitzberg, E, Lundberg, JM. Nitric oxide regulates peptide release from parasympathetic nerves and vascular reactivity to vasoactive intestinal peptide *in vivo*. Eur J Pharmacol, 1994; 261: 185-197.

Morris, JL; Gibbins, IL; Kadowitz, PJ; Herzog, H; Kreulen, DL; Toda, N; Claing, A. Roles of peptides and other substances in cotransmission from vascular autonomic and sensory neurons. Can J Physiol Pharmacol, 1995; 73(5): 521-532.

Mitsui Y, Yasuda N, Furuyama S, Sugiya H. Nitric oxide synthase activities in mammalian parotid and submandibular salivary glands. Arch Oral Biol. 1997;42(9):621-4.

Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;92(3):281-91.

Mednieks MI, Szczepanski A, Clark B, Hand AR. Protein expression in salivary glands of rats with streptozotocin diabetes. Int J Exp Pathol. 2009;90(4):412-22.

Meeking DR, Browne DL, Allard S, Munday J, Chowienzyck PJ, Shaw KM, Cummings MH. Effects of cyclo-oxygenase inhibition on vasodilatory response to acetylcholine in patients with type 1 diabetes and nondiabetic subjects. Diabetes Care. 2000;23(12):1840-3.

Nacci C, Tarquinio M, De Benedictis L, Mauro A, Zigrino A, Carratù MR, Quon MJ, Montagnani M. Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature. *Endocrinology*. 2009; 150(2):849-61.

Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H2144-52.

Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, Cohen RA. Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Am J Physiol*. 1994;266(5 Pt 2):H2061-7.

Negi G, Kumar A, Joshi RP, Sharma SS. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: old perspective with a new angle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;408(1):1-5.

Nicolau J, de Souza DN, Carrilho M. Increased glycated calmodulin in the submandibular salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct*. 2009; 27(4):193-8.

Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(2):H459-65.

Niwano K, Arai M, Tomaru K, Uchiyama T, Ohyama Y, Kurabayashi M. Transcriptional stimulation of the eNOS gene by the stable prostacyclin analogue beraprost is mediated through cAMP-responsive element in vascular endothelial cells: close link between PGI₂ signal and NO pathways. *Circ Res.* 2003;93(6):523-30.

Ozkor MA, Quyyumi AA. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiol Res Pract.* 2011;2011:156146. Epub 2011.

Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1997;100(12):3131-9.

Pate M, Damarla V, Chi DS, Negi S, Krishnaswamy G. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Adv Clin Chem.* 2010;52:109-30.

Piras M, Hand AR, Mednieks MI, Piludu M. Amylase and cyclic amp receptor protein expression in human diabetic parotid glands. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(9):715-21.

Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci.* 2007;133(1):3-18.

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(4):856-62.

Rettori V, Lomniczi A, Elverdin JC, Suburo A, Faletti A, Franchi A, McCann SM. Control of salivary secretion by nitric oxide and its role in neuroimmunomodulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:258-67.

Roganović, J; Radenković, M; Stojić, D. ACh- and VIP-induced vasorelaxation in rabbit facial artery after carotid artery occlusion. *Arch Oral Biol*, 2010; 55: 333-342.

Rosignoli F, Pérez Leirós C. Activation of nitric oxide synthase through muscarinic receptors in rat parotid gland. *Eur J Pharmacol.* 2002;439(1-3):27-33.

Ryberg AT, Selberg H, Soukup O, Gradin K, Tobin G. Cholinergic submandibular effects and muscarinic receptor expression in blood vessels of the rat. *Arch Oral Biol.* 2008;53(7):605-16.

Sakai T, Michikawa H, Furuyama S, Sugiya H. Methacholine-induced cGMP production is regulated by nitric oxide generation in rabbit submandibular gland cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002;132(4):801-9.

Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken-Weckmüller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Münzel T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation*. 2002;105(10):1170-5.

Shinbori C, Saito M, Kinoshita Y, Satoh I, Kono T, Hanada T, Nanba E, Adachi K, Suzuki H, Yamada M, Satoh K. Cyclohexenonic long-chain fatty alcohol has therapeutic effects on diabetes-induced angiopathy in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2007;567(1-2):139-44.

Singh S, Gupta AK. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(6):1211-24.

Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*. 1992;266(5):68-71.

Soinila J, Nuorva K, Soinila S. Nitric oxide synthase in human salivary glands. *Histochem Cell Biol*. 2006;125(6):717-23.

Soinila S, Vanhatalo S, Lumme A, Bäck N, Soinila J. Nitric oxide synthase in the autonomic and sensory ganglia innervating the submandibular salivary gland. *Microsc Res Tech*. 1996;35(1):32-43.

Soltoff SP, Hedden L. Isoproterenol and cAMP block ERK phosphorylation and enhance $[Ca^{2+}]_i$ increases and oxygen consumption by muscarinic receptor stimulation in rat parotid and submandibular acinar cells. *J Biol Chem.* 2010;285(18):13337-48.

Spinetti G, Kraenkel N, Emanuelli C, Madeddu P. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies. *Cardiovasc Res.* 2008;78(2):265-73.

Stojić, D; Pesić, S; Radenković, M; Popović-Roganović, J; Pesić, Z; Grbović, L. Responses of the human submandibular artery to ACh and VIP. *J Dent Res* 2007; 86(6): 565-570.

Stojić, D; Radenković, M; Kršljak, E; Popović, J; Pešić, S; Grbović, L. Influence of the endothelium on the vasorelaxant response to acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide in the isolated rabbit facial artery. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 137-143.

Sugiya H, Mitsui Y, Michikawa H, Fujita-Yoshigaki J, Hara-Yokoyama M, Hashimoto S, Furuyama S. Ca^{2+} -regulated nitric oxide generation in rabbit parotid acinar cells. *Cell Calcium.* 2001;30(2):107-16.

Takai, N; Uchihaski, K; Higuichi, K; Yoshida, Y; Yamaguchi, M. Localization of neuronal-constitutive nitric oxide synthase and secretory regulation by nitric oxide in the rat submandibular and sublingual glands. *Arch Oral Biol* 1999; 44:745-750.

Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17(1):107-18.

Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Smith SR, Petrash JM, Misko TP, Moore WM, Currie MG, Corbett JA, McDaniel ML, et al. Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines. Inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-product formation. *Diabetes*. 1993;42(2):221-32.

Tobin G, Edwards AV, Bloom SR, Ekström J. Nitric oxide in the control of submandibular gland function in the anaesthetized ferret. *Exp Physiol*. 1997;82(5):825-36.

Tobin G, Ryberg AT, Gentle S, Edwards AV. Distribution and function of muscarinic receptor subtypes in the ovine submandibular gland. *J Appl Physiol*. 2006;100(4):1215-23.

Tobin G, Giglio D, Lundgren O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(1):3-21.

Tritsaris K, Looms DK, Nauntofte B, Dissing S. Nitric oxide synthesis causes inositol phosphate production and Ca²⁺ release in rat parotid acinar cells. *Pflugers Arch*. 2000;440(2):223-8.

Tsunoda S, Michikawa H, Furuyama S, Sugiya H. Evidence that nitric oxide does not directly contribute to methacholine-induced amylase secretion in rabbit parotid acinar cells. *Pflugers Arch*. 2003;446(4):470-4.

Turner S, Zettler G, Arcos ML, Cremaschi G, Davicino R, Anesini C. Effect of streptozotocin on reactive oxygen species and antioxidant enzyme secretion in rat submandibular glands: a direct and an indirect relationship between enzyme activation and expression. *Eur J Pharmacol*. 2011;659(2-3):281-8.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14(8):318-22.

Vág J, Hably C, Csabai Z, Tost H, Bartha J, Fazekas A. Blood flow of the submandibular gland in sodium-depleted and -loaded rats: effect of nitric oxide synthase inhibition. *Res Exp Med (Berl)*. 1998;198(2):101-8.

Vane JR, Anggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1993;323(1):27-36.

Xu X, Zeng W, Diaz J, Lau KS, Gukovskaya AC, Brown RJ, Pandol SJ, Muallem S. nNOS and Ca²⁺ influx in rat pancreatic acinar and submandibular salivary gland cells. *Cell Calcium*. 1997;22(3):217-28.

Watanabe M, Yamagishi-Wang H, Kawaguchi M. Lowered susceptibility of muscarinic receptor involved in salivary secretion of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol.* 2001; 87(2):117-24.

Whittle BJ. Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem J.* 1995;27(10):727-37.

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;281(1):H232-40.

Witcher, D; Sakai, N; Williams, B; Rahimian, R; Anderson, L. Gender differences in the effects of streptozotocin-induced diabetes on parasympathetic vasodilation in the rat submandibular gland. *Arch Oral Biol* 2010; 55: 745-753.

Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium.* 2004;11(2):89-97.