



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
MEDICINSKI FAKULTET



Đorđe Đukanović

**ZNAČAJ TRPA1 KANALA KAO CILJNOG MJESTA
VAZODILATATORNOG DEJSTVA KARVAKROLA I
PRIMJENA *IN SILICO* METODA U DIZAJNU NOVIH
MOLEKULA SA VAZODILATATORNIM DEJSTVOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2025. godine



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE



Dorđe Đukanović

**THE ROLE OF THE TRPA1 CHANNELS AS A TARGET
SITE FOR THE VASODILATORY EFFECT OF THE
CARVACROL AND THE APPLICATION OF *IN SILICO*
METHODS IN DESIGNING NOVEL MOLECULES WITH
VASODILATORY EFFECT**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2025

Mentor: Prof. dr Žarko Gagić, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

Naslov doktorske disertacije: Značaj TRPA1 kanala kao ciljnog mjesta vazodilatatornog dejstva karvakrola i primjena *in silico* metoda u dizajnu novih molekula sa vazodilatatornim dejstvom.

Rezime: Povišen arterijski krvni pritisak ili hipertenzija je hronično kardiovaskularno oboljenje koje je vodeći uzrok nastanka ozbiljnih kardiovaskularnih komplikacija i čija prevalencija je u konstantnom porastu. Biljke iz porodice *Labiatae*, kao što je origano, se tradicionalno koriste u terapiji hipertenzije. Aktivni princip u ovim biljkama je monoterpensko jedinjenje pod imenom karvakrol, koje može da izazove vazodilataciju krvnih sudova. Tačan mehanizam vazorelaksantnog dejstva karvakrola nije u potpunosti opisan. Tranzitorni receptorski potencijalni ankirin 1 kanali (eng. *Transient Receptor Potential Ankyrin 1*, TRPA1) su kanali čija aktivacija može da dovede do vazodilatacije krvnih sudova i na taj način potencijalno da izazove hipotenzivni efekat, a karvakrol je poznati aktivator ovih kanala. Ova doktorska disertacija se sastoji od dvije cjeline, prve koja izučava mehanizam vazorelaksantnog dejstva karvakrola na izolovanim humanim arterijama korištenjem *in vitro* metodologije kupatila za izolovane organe i tkiva i druge u kojoj se korištenjem *in silico* tehnika dizajniraju nova jedinjenja aktivnija od karvakrola na TRPA1 kanale. Rezultati ove studije su pokazali da su u mehanizam vazorelaksantnog dejstva karvakrola uključeni blokada L-tipa voltažno zavisnih kalcijumskih kanala (eng. *L-type Voltage Gated Calcium Channels*, VGCC) i aktivacija TRPA1 kanala. Ispitivanje je pokazalo da kalijumski kanali i azot-monoksid (NO) nemaju ulogu u vazodilataciji humanih arterija izazvanoj dejstvom karvakrola. Pouzdani 3D-QSAR model je kreiran s ciljem predviđanja aktivnosti jedinjenja na TRPA1 kanale. Korištenjem informacija dobijenih iz pozitivnih i negativnih varijabli kreiranog modela, dizajnirano je šest jedinjenja (D1-D6) koja su imala bolju aktivnost u poređenju sa karvakrolom. Korištenjem softvera ADMET Predictor, predviđene su ADMET karakteristike novodizajniranih jedinjenja, od kojih su četiri pokazala bolje predviđene osobine u odnosu na karvakrol. Afinitet novodizajniranih jedinjenja za TRPA1 protein je bio veći nego afinitet karvakrola, dok su kompleksi karvakrol-TRPA1, kao i D2-TRPA1 pokazali izrazitu stabilnost tokom trajanja simulacije molekulske dinamike. Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da je mehanizam vazorelaksantnog dejstva karvakrola posredovan blokadom L-tipa VGCC i aktivacijom TRPA1 kanala. Novodizajnirano jedinjenje D2 pokazalo je najveću predviđenu aktivnost, najpoželjnije predviđene ADMET karakteristike, kao i najpovoljniju predviđenu

interakciju sa TRPA1 proteinom, te se zbog toga smatra najperspektivnijim kandidatom za dalja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.

Ključne riječi: karvakrol, TRPA1 kanali, vazodilatacija, QSAR, dizajn lijekova, molekularni doking, molekularna dinamika

Naučna oblast: Medicinske i zdravstvene nauke

Naučno polje: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska hemija

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifarniku: B740

Tip odabrane licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za način korišćenja sadržaja doktorske disertacije: Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima.

Mentor: Žarko Gagić, MPharm, PhD, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka

Doctoral thesis: The role of TRPA1 channels as a target site for the vasodilatory effect of carvacrol and the application of *in silico* methods in designing novel molecules with vasodilatory effects.

Summary: Elevated arterial blood pressure, or hypertension, is a chronic cardiovascular disease and the leading cause of serious cardiovascular complications, with a steadily increasing prevalence. Plants from the *Labiata* family, such as oregano, have been traditionally used to treat hypertension. The active compound in these plants is carvacrol, a monoterpene that can induce vasodilation. However, the precise mechanism behind carvacrol's vasorelaxant effect remains unclear. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels are known to cause vasodilation upon activation, potentially leading to a hypotensive effect, and carvacrol is a well-known activator of these channels. This doctoral dissertation is composed of two parts. The first part explores the vasorelaxant mechanism of carvacrol in isolated human arteries using the *in vitro* organ bath technique. The second part focuses on designing novel compounds with greater activity on TRPA1 channels than carvacrol, employing *in silico* methods. The study's findings indicate that the vasorelaxant effect of carvacrol involves the blockade of L-type voltage gated calcium channels (L-type VGCC) and activation of TRPA1 channels. It was also determined that potassium channels and nitric oxide (NO) do not contribute to carvacrol-induced vasodilation in human arteries. A reliable 3D-QSAR model was created to predict the activity of compounds on TRPA1 channels. Using insights from the model's positive and negative variables, six new compounds were designed, all of which demonstrated superior activity compared to carvacrol. The ADMET properties of these newly designed compounds were predicted using ADMET Predictor software, and four of them showed better predicted profiles than carvacrol. The binding affinity of the novel designed compounds for the TRPA1 protein was higher than that of carvacrol, with the carvacrol-TRPA1 and D2-TRPA1 complexes showing remarkable stability during molecular dynamics simulations. In conclusion, the vasorelaxant mechanism of carvacrol is mediated by L-type VGCC blockade and TRPA1 channel activation. The novel designed compound D2 exhibited the highest predicted activity, the most favorable predicted ADMET profile, and the strongest

predicted interaction with the TRPA1 protein, positioning it as the most promising candidate for further *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: carvacrol, TRPA1 channels, vasodilation, QSAR, drug design, molecular docking, molecular simulation

Scientific area: Medical and health sciences

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific area: Pharmaceutical/Medicinal chemistry

Classification code of the scientific area by CERIF codebook: B 740

Type of the selected licence of the Creative Commons how to use the content of the doctoral dissertation: Attribution – Non Commercial – Share Alike

Zahvalnica

Svome mentoru prof. dr Žarku Gagiću dugujem ogromnu zahvalnost na iskrenoj posvećenosti, prenesenom znanju i iskustvu, kao i na ohrabrivanju i što je bio uvijek bio glas razuma i mira, te mi na taj način pomagao da ispravno usmjerim svoju energiju i razmišljanja kada god bi se susreli sa poteškoćama tokom izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Ranku Škrbiću, koji me je skupa sa mentorom vodio kroz ovu doktorsku disertaciju i koji me je upoznao sa svijetom nauke, takođe dugujem veliku zahvalnost na nesebičnoj pomoći, podršci i razumijevanju. Mnogobrojni savjeti i životne lekcije koje sam od njega naučio imale su ogroman uticaj na moj profesionalni i lični razvoj i na tome mu veliko hvala.

Hvala prof. dr Saši Trailoviću na saradnji, savjetima i ideji da ispitujemo efekte karvakrola na izolovanim krvnim sudovima in vitro, koja se kasnije razvijala i urodila nastankom ove teme istraživanja.

Zahvaljujem se kolegama i prijateljima, Milici Gajić Bojić i Sonji Marinković, koje su mi nesebično pomagale u sprovođenju in vitro eksperimenata ovog istraživanja i bile podrška tokom svih ovih godina. Prijatelju i kolegi Žani Maksimović dugujem neizmjereno hvala na mnogobrojnim razgovorima podrške i savjetima. Prof. dr Relji Suručiću zahvaljujem na saradnji i pomoći u izvođenju studija molekulske dinamike. Veliko hvala dugujem i ostalim kolegama sa odsjeka Farmacija i iz Centra za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, čija me je podrška motivisala i doprinijela izradi ove disertacije.

Posebnu zahvalnost želim ukazati svojoj porodici, roditeljima Dijani i Brani, braći Aleksandru, Branislavu i Petku, kao i baki Mladenki. Hvala im na velikoj ljubavi, razumijevanju i podršci.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj supruzi Željki, životnom saborcu i osobi uz čiju podršku i ljubav svi nabujali izazovi postanu plitki potoci.

Ovu disertaciju posvećujem svojoj porodici, koja je neizostavan dio moga uspjeha. Posebnu posvetu upućujem svome dedi Ratku, koji me za života uvijek ohrabrivao i podržavao na putu mog obrazovanja i usavršavanja.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Regulacija vaskularnog tonusa.....	2
1.1.1	Autonomni nervni sistem u regulaciji vaskularnog tonusa.....	2
1.1.2	Humoralni mehanizmi regulacije vaskularnog tonusa.....	3
1.1.3	Uloga i značaj kalcijuma u regulaciji vaskularnog tonusa.....	5
1.1.4	Jonski kanali i mehanizmi uključeni u regulaciju vaskularnog tonusa.....	7
1.2	TRPA1 kanali.....	12
1.2.1	Aktivatori i inhibitori TRPA1 kanala	14
1.2.2	TRPA1 kanali u kardiovaskularnom sistemu	15
1.2.3	Uloga TRPA1 kanala u regulaciji vaskularnog tonusa	17
1.3	Egzogeni modulatori vaskularnog tonusa	19
1.3.1	Vazoaktivnost monoterpenskih jedinjenja.....	20
1.3.2	Karvakrol	21
1.4	Kompjuterske metode koje se koriste u dizajnu i razvoju novih lijekova	22
1.4.1	Studija kvantitativnog odnosa strukture i dejstva (QSAR).....	24
1.4.2	Molekulski doking i molekulska dinamika.....	28
1.4.3	ADMET predikcija	31
2	HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	32
3	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	33
4	METODOLOGIJA	34
4.1	<i>In vitro</i> eksperimenti	34
4.1.1	Hemikalije i reagensi	34
4.1.2	Priprema sistema za izolovana tkiva.....	35

4.1.3	Uzorkovanje, priprema i postavljanje tkiva u kupatilo	36
4.1.4	Određivanje optimalnih eksperimentalnih uslova	37
4.1.5	Eksperimentalni protokoli za određivanje vazoaktivnosti karvakrola i ispitivanje njegovog mehanizma dejstva.....	38
4.1.6	Etičko odobrenje	41
4.1.7	Statistička analiza.....	41
4.2	<i>In silico</i> eksperimenti	42
4.2.1	Kompjuterski programi	42
4.2.2	Kreiranje i validacija 3D-QSAR modela i određivanje domena primjenjivosti	42
4.2.3	Molekulski doking	44
4.2.4	Molekulska dinamika.....	45
4.2.5	ADMET predikcija	46
5	REZULTATI	47
5.1	Rezultati <i>in vitro</i> ispitivanja na izolovanim humanim arterijama	47
5.1.1	Rezultati određivanja optimalnih eksperimentalnih uslova za sprovođenje studija vazoaktivnosti na humanim krvnim sudovima metodologijom kupatila za izolovana tkiva	47
5.1.2	Rezultati za određivanje krive koncentracija-odgovor za karvakrol	50
5.1.3	Rezultati mjerenja vazorelaksantnog odgovora karvakrola u prisustvu različitih blokatora kalijumskih kanala.....	51
5.1.4	Rezultati mjerenja vazorelaksantnog odgovora karvakrola u prisustvu L-NAME (inhibitora enzima endotelne NO sintetaze)	52
5.1.5	Rezultati mjerenja inhibitornog efekta karvakrola na izometrijsku kontrakciju izazvanu 5-HT-om	53
5.1.6	Rezultati mjerenja inhibitornog efekta karvakrola na izometrijsku kontrakciju izazvanu BaCl ₂ -om u medijumu bez Ca ²⁺ jona	54
5.1.7	Rezultati mjerenja inhibitornog efekta karvakrola na izometrijsku kontrakciju izazvanu specifičnim agonistom L-tipa Ca ²⁺ kanala (BAY K 8644)	55

5.1.8	Rezultati mjerenja vazorelaksantnog odgovora karvakrola u prisustvu IPP ili A967079	56
5.2	Rezultati <i>in silico</i> eksperimenata.....	58
5.2.1	Rezultati 3D-QSAR studije na TRPA1 agonistima	58
5.2.2	Rezultati dizajniranja novih jedinjenja	69
5.2.3	Rezultati predviđanja ADMET karakteristika novodizajniranih jedinjenja	70
5.2.4	Rezultati molekuskog dokinga.....	71
5.2.5	Rezultati simulacije molekulske dinamike	74
6	DISKUSIJA	79
7	ZAKLJUČCI	91
8	LITERATURA	93
	LISTA SKRAĆENICA.....	109

1 UVOD

Među hroničnim nezaraznim bolestima, kardiovaskularna oboljenja prednjače kao jedan od vodećih uzročnika smrtnosti u razvijenim zemljama. Vodeći faktor rizika za nastanak ozbiljnih kardiovaskularnih komplikacija jeste povišen arterijski krvni pritisak tj. hipertenzija. Prevalencija hipertenzije u toku prethodne tri decenije je u konstantnom porastu, sa naročito izraženom stopom rasta u nerazvijenim i zemljama u razvoju. U SAD prevalenca hipertenzije kod osoba starijih od 60 godina je preko 71 %.¹ Hipertenzija pogađa gotovo 1,3 milijarde ljudi širom svijeta, a smatra se da je kod skoro 50 % oboljelih od hipertenzije ovo hronično stanje neprepoznato i bez postavljene dijagnoze.² Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije 54 % slučajeva moždanih udara i 47 % slučajeva ishemijske bolesti srca direktna je posljedica hipertenzije kao primarnog oboljenja, zbog čega ona i spada u vodeće faktore rizika kada su u pitanju smrtni ishodi kod kardiovaskularnih kombinacija.³ Nastanak hipertenzije nerijetko je povezan sa promjenom u regulaciji vaskularnog tonusa, zbog čega se često u terapiji iste koriste vazodilatatori. Pored hipertenzije, vazodilatatori takođe imaju značaj i u terapiji angine pektoris, hipertenzivnih kriza, perifernih vaskularnih oboljenja i preeklampsije.⁴ Sprečavanje nastanka i terapija gestacijske hipertenzije pokazali su se kao veoma bitni kod trudnica, koje su primljene u bolnicu sa teškom preeklampsijom.⁵ Tretman preeklampsije podrazumijeva primjenu terapije koja ima za cilj zaustavljanje i sprečavanje nastanka konvulzija, kao i primjenu antihipertenziva. Pored postojećih hipotenzivnih lijekova, koji se koriste u tretmanu preeklampsije, postoji potreba za razvojem novih, sigurnijih i efikasnijih terapijskih mogućnosti.⁶ Prehipertenzija je takođe izazovno stanje, jer ne zahtijeva uvođenje konvencionalne terapije, nego se reguliše primjenom nefarmakoloških higijensko-dijetetskih mjera, koje obuhvataju odgovarajuću ishranu (najčešće mediteransku ishranu), povećanu fizičku aktivnost, kao i prestanak pušenja.⁷ Nažalost mnogi pacijenti zbog nepridržavanja propisanim mjerama završe sa dijagnozom arterijske hipertenzije.⁸

Zbog opisanih stanja postoji potreba za pronalaskom novih ciljnih mjesta za dejstvo vazodilatatora, kao i potreba da se iznova razmotri terapijska upotreba aktivnih principa biljnog porijekla, ali i da se otkriju nove grupe jedinjenja koje bi mogle biti efikasnije u liječenju oboljenja usko povezanih sa povišenim arterijskim krvnim pritiskom.

1.1 Regulacija vaskularnog tonusa

Regulacija vaskularnog tonusa ključna je za održavanje homeostaze kardiovaskularnog sistema, a njeno narušavanje može dovesti do razvoja različitih kardiovaskularnih oboljenja. U ovom procesu učestvuju brojni nervni i humoralni sistemi, kao i različiti egzogeni faktori, što ukazuje na izuzetnu složenost održavanja fiziološkog tonusa krvnih sudova.

1.1.1 Autonomni nervni sistem u regulaciji vaskularnog tonusa

Autonomni nervni sistem, koji se sastoji od simpatikusa i parasimpatikusa, odgovoran je za održavanje ravnoteže organizma i reakcije na spoljašnje uticaje. Između ostalog, autonomni nervni sistem kontroliše vaskularni tonus krvnih sudova, čime reguliše krvni pritisak i dotok krvi u organe. Između krvnih sudova i perivaskularnog autonomnog nervnog sistema postoji kompleksna interakcija koja omogućava regulaciju tenzije i kontraktilnosti glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova. Stimulacijom autonomnog nervnog sistema oslobađaju se različiti neurotransmiteri koji mogu izazvati vazokonstrikciju (noradrenalin i neuropeptid Y) ili vazodilataciju (acetilholin) krvnih sudova.

Noradrenalin je glavni, endogeni neurotransmiter simpatičkog nervnog sistema koji djeluje na različite adrenergičke receptore kao što su $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, and $\beta 2$ receptori.⁹ Aktivacija $\alpha 1$ receptora dominantno prisutnih na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova dovodi do nastanka vazokonstrikcije, dok aktivacija $\alpha 2$ indukuje endotel-zavisnu vazodilataciju posredovanu azot monoksidom (NO).^{10,11} Iako se prvobitno smatralo da aktivacija β receptora ne utiče na vaskularni tonus, jer su prisutni u manjem broju na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova, istraživanja su pokazala da njihova aktivacija ipak može dovesti do vazodilatacije.¹¹ Neuropeptid Y koji predstavlja kotransmiter u simpatičkom nervnom sistemu i otpušta se skupa sa noradrenalinom, može značajno da potencira vazokonstrikciju izazvanu noradrenalinom, što je pokazano na izolovanim krvnim sudovima zeca.¹² Simpatički nervni sistem zaslužan je za održavanje tonusa arteriola, dok njegova pojačana aktivacija dovodi do smanjenog protoka krvi i izražene

vazokonstrikcije posredovane aktivacijom α receptora.¹³ Prekomjerno pojačana aktivnost simpatikusa učestvuje u kompleksnom mehanizmu razvoja hipertenzije.

Prvi izolovani neurotransmiter odgovoran za ispoljavanje efekata parasimpatičkog nervnog sistema jeste acetilholin. Acetilholin deluje na dve vrste receptora: nikotinske i muskarinske. Aktivacijom M3 muskarinskih receptora, koji su dominantno prisutni u krvnim sudovima u odnosu na druge muskarinske receptore, acetilholin dovodi do endotel-zavisne vazodilatacije.¹⁴ Pored M3, aktivacija M1 i M2 muskarinskih receptora prisutnih na endotelnim ćelijama krvnih sudova takođe može izazvati vazodilataciju, dok njihova aktivacija na glatkim mišićnim ćelijama rezultira vazokonstrikcijom.¹⁵

1.1.2 Humoralni mehanizmi regulacije vaskularnog tonusa

Humoralni regulatori vaskularnog tonusa obuhvataju mnogobrojne endogene molekule koje imaju sposobnost da utiču na tenziju krvnih sudova u određenim organima i tkivima. Na osnovu njihovog uticaja na vaskularni tonus, ove molekule se dijele na vazokonstriktore i vazodilatatore. Najznačajniji vazokonstriktori uključuju endotelin-1, serotonin, angiotenzin II, prostaglandin F2 α , vazopresin i tromboksan A2. S druge strane, među vazodilatatorima se ističu prostaglandin I2, histamin, bradikinin, supstanca P i peptid sličan kalcitoninu (*Calcitonin Gene-Related Peptide*, CGRP).

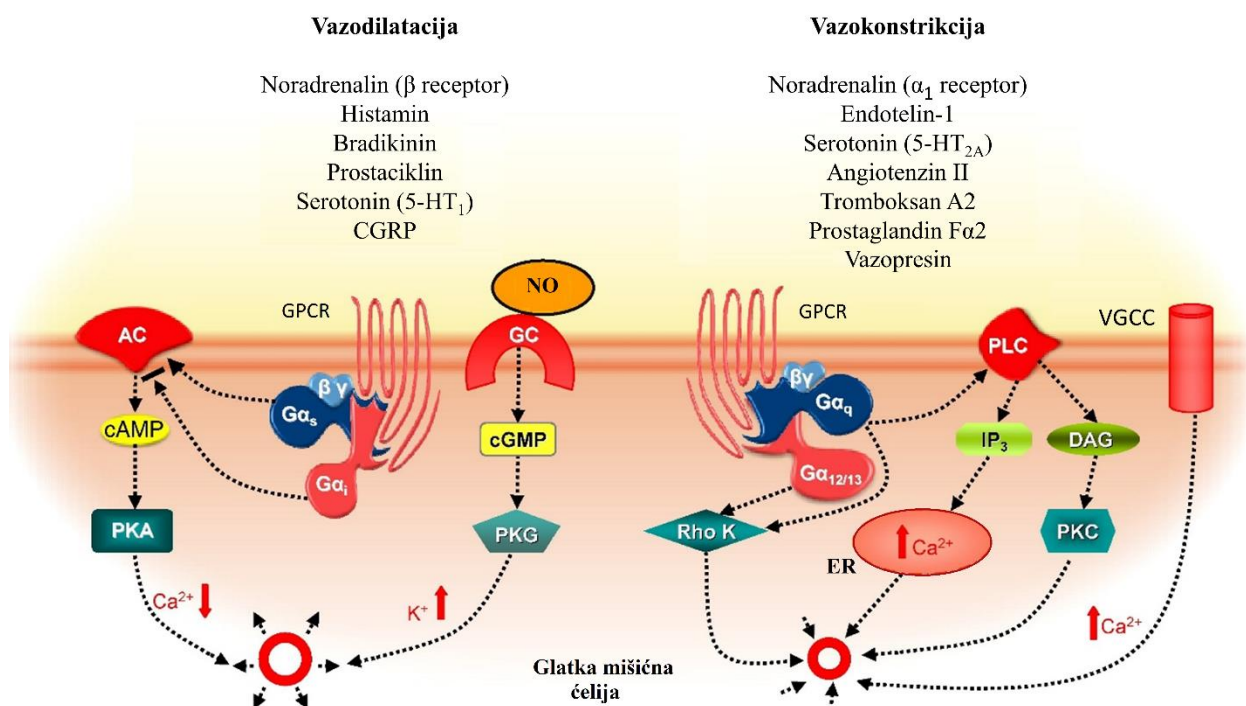
Endotelin-1 ispoljava svoj vazokonstriktorni efekat preko endotelin-A receptora prisutnih na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova, dok aktivacija endotelin-B receptora dovodi do vazodilatacije.¹⁶ Sistematska primjena endotelin-1 izaziva prolaznu, kratkotrajnu vazodilataciju praćenu dugotrajnom vazokonstrikcijom. Serotonin uglavnom izaziva vazokonstrikciju putem svojih 5-HT_{2A} receptora na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova.¹⁷ Prostaglandin F2 α djeluje vazokonstriktorno preko prostaglandinskih F receptora.¹⁷ Angiotenzin II, kao krajnji produkt renin-angiotenzin-aldosteron sistema, izaziva kontrakciju perifernih arteriola djelovanjem na angiotenzin II tip 1 receptore.¹⁶ Vazopresin, poznat i kao antidiuretski hormon, izaziva vazokonstrikciju putem vazopresin 1A receptora u krvnim sudovima.¹⁶ Tromboksan A2,

oslobođen iz aktiviranih trombocita, predstavlja značajan humoralni vazokonstriktor, koji svoju aktivnost ispoljava preko tromboksan A₂ receptora.¹⁶

Svi navedeni vazokonstriktori, uključujući noradrenalin kao neurotransmiter simpatičkog nervnog sistema, djeluju na receptore povezane sa G_q proteinom. Vezivanjem ovih agonista za njihove receptore dolazi do aktivacije fosfolipaze C (eng. *phospholipase C*, PLC), enzima koji razlaže fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat u diacilglicerol (DAG) i inozitol 1,4,5-trifosfat (IP₃).¹⁷ DAG i IP₃ su ključni medijatori koji omogućavaju ulazak kalcijumovih jona u ćeliju i oslobađanje kalcijuma iz endoplazmatičnog retikuluma (ER). Porast unutarćelijske koncentracije kalcijuma u glatkim mišićnim ćelijama ključni je korak u nastanku vazokonstrikcije (Slika 1).

Prostaglandin I₂, poznat i kao prostaciklin, predstavlja lokalni autokanoid čija je jedna od glavnih uloga, pored sprečavanja agregacije trombocita, izazivanje vazodilatacije. On djeluje na prostaciklinske I₂ receptore, koji su povezani sa G proteinom, čime dolazi do povećanja koncentracije cAMP i kalijumovih jona u glatkim mišićnim ćelijama, uz smanjenje koncentracije kalcijumovih jona, što rezultuje relaksacijom krvnih sudova.¹⁸ Supstanca P je poznati vazodilatator koji svoj efekat ispoljava putem neurokinin-1 receptora, endotel-zavisnim mehanizmom koji je delimično posredovan pomoću NO.¹⁹ Histamin, delujući na svoje H₁ i H₂ receptore, koji su povezani sa G proteinom, izaziva snažnu vazodilataciju krvnih sudova.²⁰ Vazoaktivni peptid bradikinin, nastao proteolitičkim razlaganjem visoko molekularnog kininogena pomoću kalikreina, predstavlja značajan humoralni vazodilatator. Bradikinin deluje preko bradikinin 2 receptora, koji su G-protein povezani receptori, izazivajući endotel-zavisnu vazodilataciju.²¹ CGRP prisutan je u perivaskularnim neuronima u blizini krvnih sudova i može izazvati vazodilataciju kada se veže za CGRP1 receptor na endotelu.²² Ova vazodilatacija se većinom oslanja na mehanizme posredovane NO, ali CGRP takođe može dovesti i do otvaranja različitih kalijumskih kanala na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova.

Endogeni vazodilatatori delovanjem na svoje receptore putem proteina G dovode do povećanja koncentracije cikličnog adenzin monofosfata (eng. *Cyclic Adenosine Monophosphate*, cAMP) i aktivacije protein kinaze A (PKA), što smanjuje unutarćelijsku koncentraciju kalcijumovih jona (Slika 1). S druge strane, stimulišu i produkciju endogenog NO, koji je glavni medijator endotel-zavisne vazodilatacije.



Slika 1. Šematski prikaz mehanizama dejstva endogenih vazokonstriktora i vazodilatatora.

Receptori vezani sa G proteinom (eng. *G Protein Coupled Receptor*, GPCR), voltažno zavisni kalcijumski kanali (eng. *Voltage Gated Calcium Channels*, VGCC), fosfolipaza C (eng. *Phospholipase C*, PLC), adenil ciklaza (eng. *Adenylate Cyclase*, AC), guanilatna ciklaza (eng. *Guanylate Cyclase*, GC), ciklični adenzin monofosfat (eng. *Cyclic Adenosine Monophosphate*, cAMP), ciklični guanozin monofosfat (eng. *Cyclic Guanosine Monophosphate*, cGMP), azot monoksid (NO), diacilglicerol (DAG), inozitol 1,4,5-trifosfat (IP₃), protein kinaza C (PKC), protein kinaza G (PKG), protein kinaza A (PKA), Rho vezana kinaza (Rho K), endoplazmatični retikulum (ER). Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora Brinks i saradnici, 2021.²³

1.1.3 Uloga i značaj kalcijuma u regulaciji vaskularnog tonusa

Kalcijum je primarni regulator vaskularnog tonusa glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova. Kada koncentracija slobodnih kalcijumovih jona u ćeliji poraste, aktivira se Ca^{2+} –kalmodulin zavisna protein kinaza koja zatim aktivira kinazu lakih lanaca miozina.²⁴ Fosforilacija lakih lanaca miozina omogućava njegovu interakciju sa aktinom i nastanak vazokonstrikcije. Stoga osnovni zadatak egzogenih i endogenih vazokonstriktora jeste izazivanje porasta koncentracije Ca^{2+} jona u

glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova. Do porasta koncentracije Ca^{2+} jona unutar ćelije dolazi ulaskom kalcijuma iz vanćelijskog prostora u ćeliju ili oslobađanjem istog iz njegovog ćelijskog depoa tj. sarkoplazmatičnog retikuluma. Kada se vazokonstriktori kao što je noradrenalin vežu za svoje receptore na membrani glatkih mišićnih ćelija, dolazi do otvaranja jonskih kanala koji omogućavaju ulazak jona kalcijuma.²⁵ Pored toga nakon aktivacije receptora dolazi i do odloženog stvaranja inozitol 1,4,5–trifosfata (IP3) i oslobađanja Ca^{2+} jona iz sarkoplazmatičnog retikuluma.²⁶ Postoje i voltažno zavisni kalcijumski kanali (eng. *Voltage Gated Calcium Channels*, VGCC) koji se aktiviraju depolarizacijom membrane glatkih mišićnih ćelija i koji imaju značajnu ulogu u regulaciji bazalnog tonusa spontano aktivnih krvnih sudova.²⁷

Nastanak vazodilatacije krvnih sudova povezan je sa padom unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} jona. Kalcijum se uklanja iz ćelije skladištenjem u sarkoplazmatični retikulum ili izbacivanjem u međućelijski prostor.²⁸ S obzirom na uključenost velikog broja mehanizama koji regulišu homeostazu kalcijuma u glatkim mišićima krvnih sudova, postoji i veliki broj ciljnih mjesta sa kojima intereaguju lijekovi i molekule sa vazodilatatornim dejstvom. Neki vazodilatatori, poput organskih nitrata, dovode do opšte vazodilatacije svih krvnih sudova. S druge strane vazodilatatori mogu prevashodno vršiti relaksaciju u arterijskom ili venskom sistemu, ovisno o stepenu uključenosti različitih mehanizama koji regulišu nivo Ca^{2+} jona unutar ćelije.

U glatkim mišićnim ćelijama nalazi se veliki broj jonskih kanala koji su uključeni u regulaciju vaskularnog tonusa. Uloga ovih kanala može biti značajno izmijenjena usljed određenih patoloških stanja, a i same promjene u njihovoj ekspresiji i funkciji mogu dovesti do nastanka različitih oboljenja. Najznačajniji jonski kanali koji su uključeni u homeostazu vaskularnog tonusa jesu K^{+} kanali, VGCC kanali i tranzitorni receptorski potencijalni kanali (eng. *Transient Receptor Potential*, TRP), a pored njih neizostavnu ulogu u samoj vazodilataciji ima i azot-monoksid (NO), koji može biti endogenog ili egzogenog porijekla. Navedeni jonski kanali, kao i mehanizmi vazodilatacije aktivirani pomoću NO predstavljaju ciljna mjesta za dejstvo različitih vazodilatatora.

1.1.4 Jonski kanali i mehanizmi uključeni u regulaciju vaskularnog tonusa

1.1.4.1 *Voltažno zavisni kalcijumski kanali*

VGCC su jonski kanali koji primarno omogućavaju transport Ca^{2+} jona kroz ćelijsku membranu, regulišući na taj način brojne fiziološke funkcije u ljudskom organizmu. Razlikuje se pet tipova ovih kanala (L, P/Q, N, R i T tip VGCC), od kojih je L-tip VGCC prisutan u kardiovaskularnom sistemu. Kalcijumski kanali sastoje se od pet podjedinica α_1 , α_2 , β , γ i δ , od kojih α_1 podjedinica predstavlja vezno mjesto za antagoniste.²⁹ Rezultati istraživanja su pokazali da neutralni dihidropiridinski antagonisti L-tipa VGCC imaju veći afinitet za α_1 1.2b podjedinicu, dok se jonizovani nedihidropiridinski antagonisti snažnije vezuju za α_1 1.2a podjedinicu L-tipa VGCC.³⁰ Uzimajući u obzir navedene podatke, može se zaključiti da je selektivnost antagonista prema različitim podjedinicama jedan od razloga za postojanje tkivne specifičnosti, koju antagonisti kalcijumskih kanala ispoljavaju. Različite arterije mogu drugačije da reaguju na isti lijek koji vrši vazodilataciju. Blokadom L-tipa VGCC inhibicija kontrakcije arterija izazvane serotoninom je veća kod koronarnih arterija u poređenju sa unutrašnjom grudnom arterijom kod ljudi.³¹ Kontrakcija glatkih mišića u nekim tkivima može da se odvija neovisno o ulasku Ca^{2+} jona u ćeliju, što takođe predstavlja razlog zašto je efekt blokade L-tipa VGCC slabiji u određenim krvnim sudovima.³² Iako antagonisti Ca^{2+} jona izazivaju snažnu vazodilataciju, postoje dokazi da su dijametar nekih krvnih sudova i protok krvi kroz iste skoro u potpunosti rezistentni na blokadu L-tipa VGCC. Ovaj fenomen je opisan kod kremasteričnih arteriola pacova i hrčaka, gdje nifedipin ni pri maksimalnoj koncentraciji nije uspio značajno dilatirati navedene krvne sudove.³³

Antagonisti VGCC koji imaju kliničku primjenu u tretmanu kardiovaskularnih oboljenja, blokiraju L-tip VGCC u glatkim mišićima krvnih sudova i u srcu. Različiti antagonisti imaju različit afinitet za VGCC u određenim tkivima. Verapamil djeluje prvenstveno na kalcijumske kanale u srcu, dok dihidropiridini djeluju više na kalcijumske kanale glatkih mišićnih ćelija, zbog čega su oni jači vazodilatatori. S druge strane diltiazem je predstavnik antagonista koji djeluje podjednako i na srčani mišić i na glatke mišićne krvnih sudova. Blokadom L-tipa VGCC, sprječava se ulazak Ca^{2+} jona u glatke mišićne ćelije, a samim tim ne može se postići neophodna koncentracija Ca^{2+} jona unutar ćelije, koja je neophodna za nastanak kontrakcije.

Kod osoba oboljelih od hipertenzije opisana je pojačana ekspresija i funkcija L-tipa VGCC, međutim sam mehanizam nastanka ove pojave nije još uvijek razjašnjen.³⁴ Pored hipertenzije kao osnovne indikacije za primjenu antagonista L-tipa VGCC, isti se mogu primjenjivati i u terapiji angine pectoris i poremećaja srčanog ritma.

1.1.4.2 Kalijumski kanali

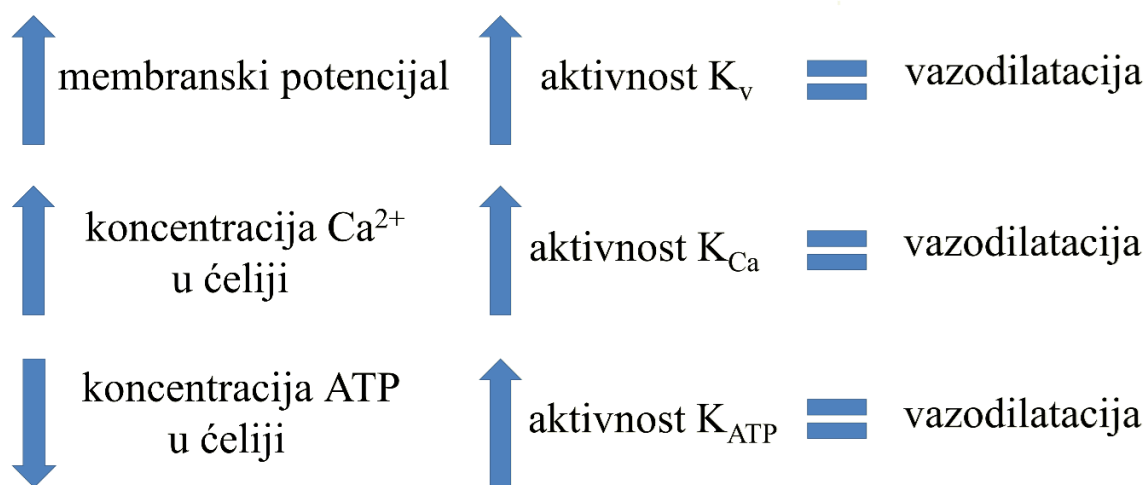
Hiperpolarizacija ćelijske membrane glatkih mišićnih ćelija prouzrokovana otvaranjem kalijumskih kanala i izlaskom jona kalijuma (K^+ jona), dovodi do zatvaranja kalcijumskih kanala i nastanka relaksacije glatkih mišića. Postoji više tipova kalijumskih kanala, a najznačajniji u regulaciji vaskularnog tonusa su voltažno zavisni kalijumski kanali (K_v), kalcijum-zavisni kalijumski kanali (K_{Ca}) i ATP-zavisni kalijumski kanali (K_{ATP}) (Slika 2).

Akcioni potencijal dovodi do aktivacije K_v , koji nakadno učestvuju u vraćanju vrijednosti membranskog potencijala na površini glatkih mišićnih ćelija u vrijednosti koje je membranski potencijal imao tokom stanja mirovanja. Opisano je 12 porodica K_v , čiji su članovi tetrameri sa četiri α podjedinice od koji svaka α podjedinica ima šest transmembranskih domena.³⁵ Kada se u sistemu nađe blokator ovih kanala, kao što je 4-aminopiridin (4-AP), doći će do kontrakcije krvnih sudova, ukazujući na značajnost ovih kanala u procesu vazodilatacije.³⁶

Porast unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} jona aktivira K_{Ca} kanale, koji su široko rasprostranjeni u glatkim mišićnim ćelijama različitih krvnih sudova, a na osnovu svoje provodljivosti dijele se na dvije grupe: K_{Ca} velike provodljivosti (eng. *Big K_{Ca}* ; BK_{Ca}) i K_{Ca} male provodljivosti (eng. *Small K_{Ca}* ; SK_{Ca}).³⁷ BK_{Ca} kanali imaju veću značajnost u odnosu na SK_{Ca} kanale u regulaciji vaskularnog tonusa. Blokatori BK_{Ca} kanala, kao što su haribdotoksin i tetraetilamonijum (TEA), doveli su do kontrakcije glatkih mišića različitih krvnih sudova pacova.³⁸ Smatra se da BK_{Ca} kanali predstavljaju negativnu povratnu spregu u regulaciji tonusa glatkih mišića, međutim njihovom blokadom u nekim krvnim sudovima neće doći do promjene u vaskularnom tonusu, što se objašnjava manjom ekspresijom ili slabijom osjetljivošću ovih kanala na koncentraciju Ca^{2+} jona.³⁹

Velika grupa izazito važnih kalijumskih kanala koji se nalaze u glatkim mišićima jeste K_{ATP} , koji su inhibirani pri povišenoj koncentraciji ATP-a u ćeliji. Oni su heteromeri koji u svojoj

strukturi sadrže Kir 6 podjedinicu i receptor za sulfonilureju (SUR), koji predstavlja vezno mjesto za agoniste i antagoniste ovih kanala.⁴⁰ Antidijabetik glibenklamid (GLB), derivat sulfonilureje, koji djeluje kao inhibitor K_{ATP} u pankreasu, takođe sprječava vazodilataciju plućnih arterija izazvanu lemakalinom, agonistom K_{ATP} .⁴¹



Slika 2. Šematski prikaz fizioloških aktivatora kalijumskih kanala.

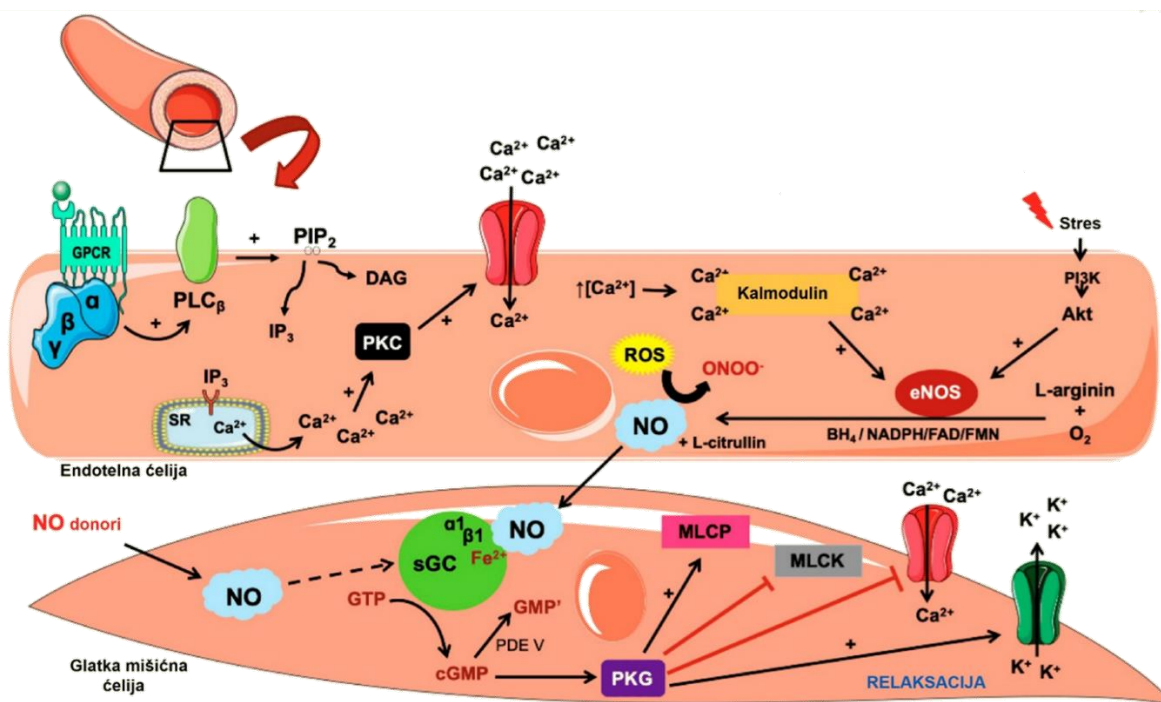
1.1.4.3 Vazodilatacija posredovana azot-monoksidom

Poznato je da oslobađanje NO u endotelnim ćelijama krvnih sudova započinje seriju procesa koji dovode do endotel-zavisne vazodilatacije. Značajnost NO najbolje se primjećuje kada se životinjama aplicira N–nitro–L–arginin metilestar (eng. *N–Nitro–L–Arginin Methylester*, L–NAME) koji blokira endotelnu NO sintetazu (eNOS), što dalje dovodi do porasta krvnog pritiska.⁴² Odsustvom sinteze NO usljed teške endotelne disfunkcije narušava se homeostaza održavanja vaskularnog tonusa, te endogene vazoaktivne molekule koje imaju bifazno djelovanje, poput acetilholina, počinju da jače ispoljavaju svoj vazokonstriktorni efekat.⁴³

Vazodilatacija posredovana putem NO predstavlja kompleksan lančani proces u kojem učestvuju mnogobrojne molekule i enzimi, a koji zbog svoje složenosti može biti inhibisan na bilo kojem nivou (Slika 3).⁴⁴ Endogeni kao i NO egzogenog porijekla (organski nitrati i Na–nitroprusid) vežu se za enzim guanil ciklazu koji se nalazi u citosolu, a njegovom aktivacijom dolazi do porasta koncentracije cikličnog guanozin monofosfata (eng. *Cyclic Guanosine Monophosphate*, cGMP).⁴⁵ Blokada enzima fosfodiesteraze koji metaboliše cGMP takođe može

dovesti do nastanka vazodilatacije.⁴⁶ Da bi se mehanizmi relaksacije pokrenuli neophodno je da cGMP aktivira enzim protein kinazu G (PKG). Izbacivanje Ca^{2+} jona iz ćelije, ponovno preuzimanje Ca^{2+} jona u sarkoplazmatični retikulum, aktiviranje BK_{Ca} kanala i inhibicija VGCC predstavljaju vodeće mehanizme vazodilatacije posredovane preko NO–cGMP–PKG kaskade.⁴⁷ Koji od ovih mehanizama i u kojem procentu će biti zastupljen prilikom vazorelaksacije, zavisi i od vrste samog krvnog suda.

Prethodno spomenuti egzogeni donori NO najveća su grupa lijekova koji imaju kliničku primjenu djelujući putem gore opisanih mehanizama. Organski nitrati koriste se u terapiji teških kardiovaskularnih oboljenja kao što su hipertenzivna kriza i angina pectoris. Glavna korist primjene organskih nitrata u terapiji angine pectoris jeste vazodilatacija velikih venskih sudova, kojom se smanjuje prethodno opterećenje srca i vazodilatacija perifernih arteriola, kojom se smanjuje periferni otpor i takozvano naknadno opterećenje srca.



Slika 3. Šematski prikaz vazodilatacije glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova posredovane NO.

Aktivacija G-protein vezanih receptora stimuliše fosfolipazu C, koja iz membranskih fosfolipida cijepa diacilglicerol i IP3. IP3 dovodi do oslobađanja Ca^{2+} jona iz sarkoplazmatičnog retikuluma, koji zatim omogućavaju dalji ulazak Ca^{2+} jona kroz VGCC. Ca^{2+} joni se vezuju za kalmmodulin aktivirajući eNOS koja iz aminokiseline arginin i O_2 stvara NO i citrulin. NO prelazi u glatke mišićne ćelije krvnih sudova gdje se veže za solubilnu guanil ciklazu, što dovodi

do nastanka cGMP koji stimulise PKG. PKG dovodi do smanjenja aktivnosti VGCC, kinaze lakih lanca miozina, a povećava aktivnost fosfataze lakih lanaca miozina, kao i kalijumskih kanala. Svi ovi efekti dovode do vazodilatacije glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova. NO egzogenog porijekla ima iste efekte na glatke mišićne ćelije. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora da Silva i saradnici, 2021.⁴⁴

1.1.4.4 Uloga TRP kanala u regulaciji vaskularnog tonusa

TRP kanali su neselektivni jonski kanali koji omogućavaju prvenstveno transport kalcijuma i drugih katjona kroz ćelijsku membranu, regulišući na taj način mnogobrojne fiziološke procese.⁴⁸ Kod sisara postoji 28 različitih tipova TRP kanala, koji su podijeljeni u 6 potporodica, TRP kanonski 1-7 (eng. TRP *canonical*, TRPC), TRP melanostatin 1-8 (eng. TRP *melanostatin*, TRPM), TRP vaniloid 1-6 (eng. TRP *vanilloid*, TRPV), TRP policistin 1-3 (eng. TRP *polycystin*, TRPP), TRP mukolipin 1-3 (eng. TRP *mucolipin*, TRPML) i najmanja potporodica koju čini samo jedan član TRP ankirin 1 (eng. TRP *ankyrin*, TRPA).^{48,49} Svi TRP kanali sastoje se od četiri podjedinice i imaju šest transmembranskih domena.

Osim TRPML, članovi ostalih potporodica uključeni su u regulaciju vaskularnog tonusa.⁵⁰ Aktivacija TRPV1 kanala u arteriolama kože dovodi do nastanka vazodilatacije, dok suprotno tome vazodilatacija izolovanih arterija skeletnih mišića dešava se nakon inhibicije TRPV1.⁵¹ Vazodilatacija mezenteričnih arterija pacova dešava se pri aktivaciji TRPV2 ili TRPV4 kanala.^{52,53} Iako je TRPM najveća potporodica, samo dva njena predstavnika se nalaze u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova. TRPM4 u koordinaciji sa TRPC6 odgovoran je za nastanak pojačanog vaskularnog tonusa u cerebralnim arterijama pacova.⁵⁴ Opisana je i uključenost TRPM8 u vazodilataciju mezenteričnih i femoralnih arterija pacova.⁵⁵ Ne postoji mnogo studija koje su istraživale ulogu TRPP kanala u regulaciji vaskularnog tonusa. Postoje dokazi da kada su aktivirani, TRPP kanali u perifernim arterijama omogućavaju nastanak vazokonstrikcije, dok u cerebralnim arterijama njihova aktivacija ima suprotan efekat.³⁴ Uloga TRPC1 u vazokonstrikciji i vazodilataciji je izuzetno kompleksna. Kod TRPC1 nokaut miševa opisane su jače kontrakcije aorte izazvane fenilefrinom.⁵⁶ TRPC1 kanali su dovedeni u poveznicu sa BK_{Ca} kanalima, gdje influks Ca²⁺ jona putem TRPC1 dovodi do aktivacije BK_{Ca} kanala i hiperpolarizacije glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova.⁵⁷ Nekoliko endogenih vazokonstriktora, kao što je endotelin 1, aktiviraju TRPC3 kanale prilikom izazivanja kontrakcije koronarnih arterija.⁵⁸ Ovo ukazuje da su TRPC3 kanali povezani sa vazokonstrikcijom izazvanom pomoću agonista za receptore vezane sa

G proteinom (eng. *G Protein-Coupled Receptor*; GPCR). Iako je poznato da su i TRPC4 i TRPC5 prisutni u krvnim sudovima, još uvijek nema dovoljno informacija o njihovoj značajnosti i ulozi u ovim tkivima. GPCR koje aktiviraju mehanički stimuli dovode do aktivacije TRPC6 kanala i dodatnog ulaska Ca^{2+} jona, te nastanka vazokonstrikcije krvnih sudova mozga.⁵⁹

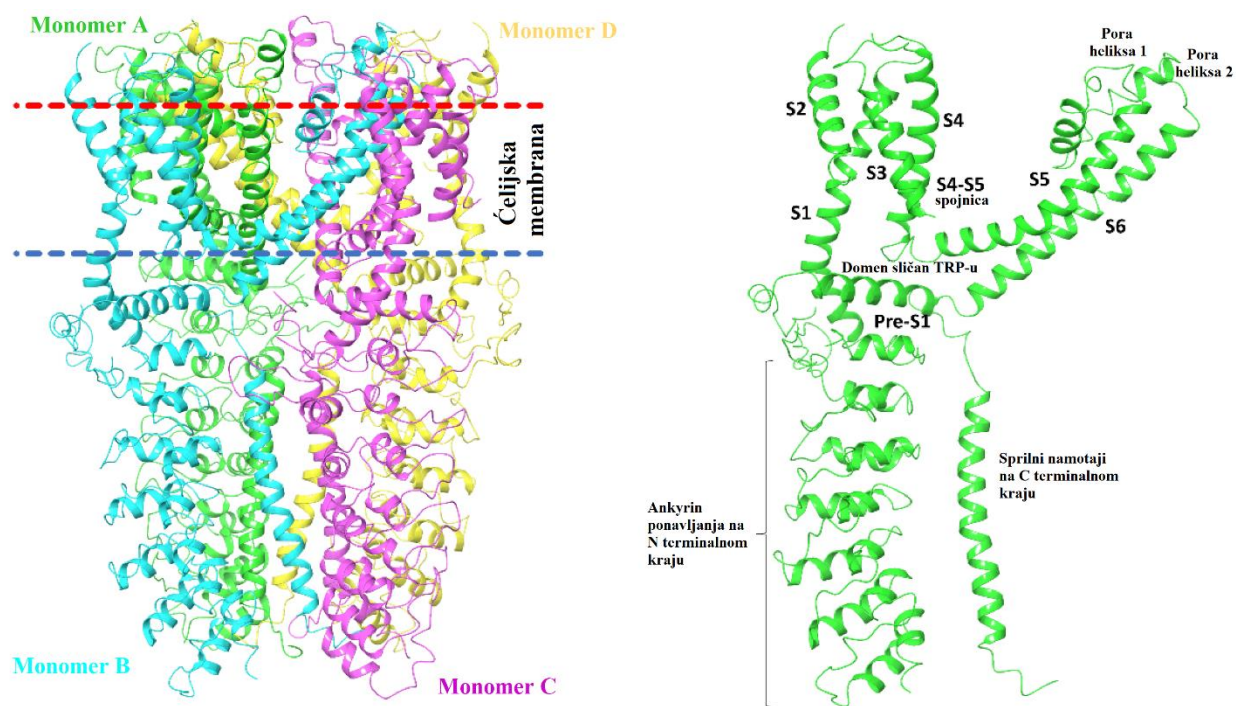
1.2 TRPA1 kanali

TRPA kanali predstavljaju najmanju potporodicu TRP kanala sa samo jednim članom. Izoforme ovih kanala su pronađene kod različitih vrsta, a opisano je da se humani TRPA1 kanal sastoji od 1119 aminokiselina i ima molekulsku masu od približno 130 kDa u poređenju sa 1115 aminokiselina kod miša i 1125 aminokiselina kod pacova.⁶⁰ Slično ostalim TRP kanalima TRPA1 kanali su tetrameri sastavljeni od četiri identične podjedinice, od kojih se svaka sastoji od šest transmembranskih domena (Slika 4).^{61,62} Prva četiri domena formiraju senzorni region osjetljiv na voltažu, dok domeni S5 i S6 formiraju pore za propuštanje katjona kada se kanal nalazi u aktivnom stanju.⁶³ Na N terminalnim krajevima TRPA1 kanala nalaze se ponavljajući domeni ankirina (16 domena kod čovjeka, sa još dodatno jednim nepotpunim domenom) po kojem su TRPA1 kanali i dobili ime.⁶⁴ Ankirinski domeni se sastoje od 33 aminokiseline raspoređene u dva α heliksa, koja su razdvojena petljama. Ponavljajući domeni ankirina doprinose proteinskim interakcijama i elastičnosti samih TRPA1 kanala.

Prvobitno se smatralo da su TRPA1 kanali prisutni samo u senzornim neuronima gdje imaju ulogu u patofiziološkim procesima kao što su nastanak bola, inflamacija, svrab i povreda tkiva.^{49,65} Danas se zna, da su ovi kanali prisutni i u drugim tkivima gdje regulišu protok jednovalentnih i dvovalentnih katjona, kao što su Na^+ , K^+ , Mg^{2+} i Ca^{2+} , kroz ćelijsku membranu. Iako se smatralo da su ovi kanali jednako propustljivi za Na^+ i Ca^{2+} , pokazano je da pod dejstvom agonista ovi kanali dovode do značajnijeg influksa Ca^{2+} jona u ćeliju. Ovo je izuzetno značajno uzimajući u obzir dalju ulogu Ca^{2+} jona kao sekundarnih glasnika unutar ćelije, koji reguliše različite fiziološke procese. U nervnom tkivu uz TRPA1 kanale često se nalaze i TRPV1 kanali, čija istovremena aktivacija njihovim agonistima pokazuje sinergističko dejstvo, a kao posrednik ovog efekta opisuju se Ca^{2+} joni.^{66,67} Pored nervnog tkiva, prisustvo TRPA1 kanala opisano je i u

endotelnim ćelijama krvnih sudova pacova, humanim plućnim fibroblastima, epitelnim ćelijama alveola, β ćelijama pankreasa pacova, humanom i pacovskom kolonu, humanim keratinocitima.⁶⁸⁻⁷³ Ovi kanali su takođe prisutni i u kardiovaskularnom sistemu gdje su uključeni u regulaciju različitih fizioloških procesa, ali i u nastanak nekih patofizioloških stanja. Najskorija istraživanja su pokazala prisustvo TRPA1 kanala u kardiomiocitima i u endotelnim ćelijama krvnih sudova mozga.^{74,75}

Zbog svoje rasprostranjenosti i različitih uloga u fiziološkim procesima TRPA1 kanali su privukli izrazitu pažnju kao potencijalno ciljno mjesto za razvoj različitih terapija.



Slika 4. A) Trodimenzionalni bočni prikaz TRPA1 kanala i položaja njegovih gradivnih podjedinica, gdje je svaki monomer obojen različitom bojom; B) Strukturni detalji svake pojedinačne monomerne podjedinice. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora Gawalska i saradnici, 2022.⁶²

1.2.1 Aktivatori i inhibitori TRPA1 kanala

Među aktivatorima TRPA1 kanala nalazi se različit spektar hemijskih jedinjenja, a neka od njih su iritansi kao što je akrolein, zatim anestetici i monoterpenska jedinjenja iz etarskih ulja biljaka (timol, karvakrol).^{65,76,77} Produkti oksidativnog stresa poput vodonik peroksida, takođe su značajni aktivatori TRPA1 kanala. Pored hemijskih, fizički agensi poput toplote i hladnoće isto mogu da aktiviraju TRPA1 kanale.^{49,78} Nekoliko studija je pokazalo da su slobodni radikali kiseonika endogeni aktivatori TRPA1 kanala u fiziološkim uslovima.⁷⁹ Postoji kontinuirani porast u otkrivanju već poznatih jedinjenja koja mogu da vrše aktivaciju TRPA1 kanala i na taj način ispoljavaju svoje dejstvo.

Tabela 1. Agonisti TRPA1 kanala.

Agonista	Izvor	EC ₅₀
alil izotiocijanat	slačica	11 µM pacov ⁸⁰
cinamaldehyd	cimet	100 µM miš ⁸¹
karvakrol	origano	17 mM čovjek ⁸²
nikotin	duvan	10 µM miš ⁸³
propofol	anestetik	17 µM miš ⁸⁴
lidokain	anestetik	24,0 mM čovjek ⁷⁶
hidrogen peroksid (H ₂ O ₂)	oksidativni stres	230 µM miš ⁸⁵
4-okso-2-nonenal (4-ONE)	oksidativni stres	1,9 µM miš ⁸⁵

U početku su se za blokadu TRPA1 kanala koristili neselektivni TRP inhibitori kao što su kamfor i rutenijum crveno, međutim otkrivanjem specifičnih blokatora njihova upotreba u eksperimentalnim studijama je postala opsolentna.^{86,87} Prvi opisani selektivni inhibitor, koji se i danas široko primjenjuje jeste HC-030031.⁸⁸ A-967079 je takođe selektivni inhibitor, koji je veoma potentan i svoj inhibišući efekat ispoljava čak u nanomolarnim koncentracijama.⁸⁹

Tabela 2. Selektivni antagonisti TRPA1 kanala.

Antagonist	Hemijska pripadnost	IC ₅₀
HC-030031	ksantinski derivat	6,2 μ M čovjek ⁸⁸
AP-18	oksim	3,1 μ M čovjek ⁹⁰
A-967079	oksim	0,067 μ M čovjek ⁹¹

1.2.2 TRPA1 kanali u kardiovaskularnom sistemu

S obzirom na ozbiljnost kardiovaskularnih oboljenja i posljedice koje one sa sobom nose, konstantno se traga za novim terapijskim mogućnostima kako bi se poboljšao kvalitet života i smanjio mortalitet oboljelih od ovih bolesti. S tim u vezi uloga i značaj TRPA1 kanala u različitim patološkim stanjima vezanim za kardiovaskularni sistem predstavlja oblast u kojoj se intenzivno istražuje.

Ateroskleroza je okarakterisana kao hronična inflamatorna bolest nastala poremećajem metabolizma lipida, koja predstavlja jedan od vodećih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih komplikacija. Inhibicija TRPA1 receptora na makrofagima dovela je do smanjenja efluksa LDL-a iz ovih ćelija, što je dovelo do pogoršanja ateroskleroze.⁹²

Srčana slabost predstavlja kompleksno kliničko stanje, koje nastaje kao rezultat izlaganja srca hroničnom stresu ili oštećenju usljed akutnog infarkta miokarda. Jedna studija je pokazala da se inhibicijom TRPA1 kanala smanjuje hipertrofija srca i poboljšava srčana funkcija u modelu srčane slabosti kod miševa.⁹³ Aktivacijom TRPA1 kanala dolazi do ulaska Ca²⁺ jona u kardiomiocyte, koji zatim aktiviraju različite signalne puteve i dovode do ekspresije hipertrofičnih gena što na kraju može rezultovati nastankom srčane slabosti.⁹⁴

Ishemijsko–reperfuziona povreda miokarda je stanje gdje je povreda srčanog tkiva izazvana oksidativnim stresom nastalim nakon nagle reperfuzije tkiva koje je prethodno bilo izloženo ishemijskoj epizodi. Uloga TRPA1 kanala u patofiziološkom procesu ovog stanja nije definisana. U izolovanim kardiomiocitima aktivacija TRPA1 kanala smanjila je ćelijsku smrt pri reoksigenizaciji.⁹⁵ S druge strane, kod TRPA1 nokaut miševa, obim srčanog oštećenja je bio značajno manji u modelu ishemijsko–reperfuzijske povrede miokarda.⁹⁶

Fibroza miokarda nastaje proliferacijom srčanih fibroblasta kao odgovor na različita patofiziološka stanja povezana sa povredom miokarda i neuspjelom popravkom srčanog tkiva. Metilglioksat, metabolički intermedijer glikolize, može aktivirati TRPA1 kanale i smatra se glasnikom koji dovodi do nastanka fibroze u srčanom tkivu.⁹⁷ Ulazak Ca^{2+} jona putem TRPA1 kanala aktivira signalne puteve neophodne da bi metilglioksat doveo do diferencijacije i proliferacije fibroblasta, a samim tim i do fibroze srčanog tkiva.⁹⁸

Aritmije predstavljaju nepravilan srčani ritam koji se odlikuje promjenama u frekvenciji nastalih zbog neodgovarajućeg stvaranja i/ili sprovođenja srčanog impulsa. Zagađeni zrak često sadrži molekule koje mogu da utiču na autonomni nervni sistem i srčani ritam. Među ovim molekulima nalazi se i poznati aktivator TRPA1 kanala, akrolein, koji je proizvod sagorijevanja duvana ili gorenja vatre.⁹⁹ Pokazano je da su TRPA1 kanala uključeni u promjenu srčanog ritma izazvanu akroleinom kod miševa.¹⁰⁰

Hipertenzija je stanje okarakterisano povišenim sistolnim i/ili dijastolnim arterijskim krvnim pritiskom i predstavlja jedno od vodećih kardiovaskularnih oboljenja. Ne postoji razlika u frekvenciji i srednjoj vrijednosti arterijskog krvnog pritiska kod divljeg tipa i TRPA1 nokaut miševa.¹⁰¹ Ovo pokazuje da miševi mogu održavati bazalne vrijednosti krvnog pritiska i kompenzovati nedostatak TRPA1 kanala. Cinamaldehyd koji je agonist TRPA1 kanala doveo je do prolaznog hipotenzivnog efekta praćenog trajnim hipertenzivnim efektom kod anesteziranih pacova. Primjena atropina, kao antiholinergika, blokirala je hipotenzivni efekat cinamaldehyda, dok je primjena prazosina, α_1 blokatora, umanjila i hipotenzivni i hipertenzivni efekat cinamaldehyda.¹⁰¹ Iz ovih studija se može zaključiti da TRPA1 kanali mogu dovesti do promjena u vrijednosti krvnog pritiska interakcijom sa autonomnim nervnim sistemom. Takođe je poznato da aktivacija TRPA1 kanala može dovesti do nastanka vazodilatacije, stoga su ovi kanali intresantno ciljno mjesto za razvoj novih terapijskih mogućnosti u tretmanu hipertenzije.

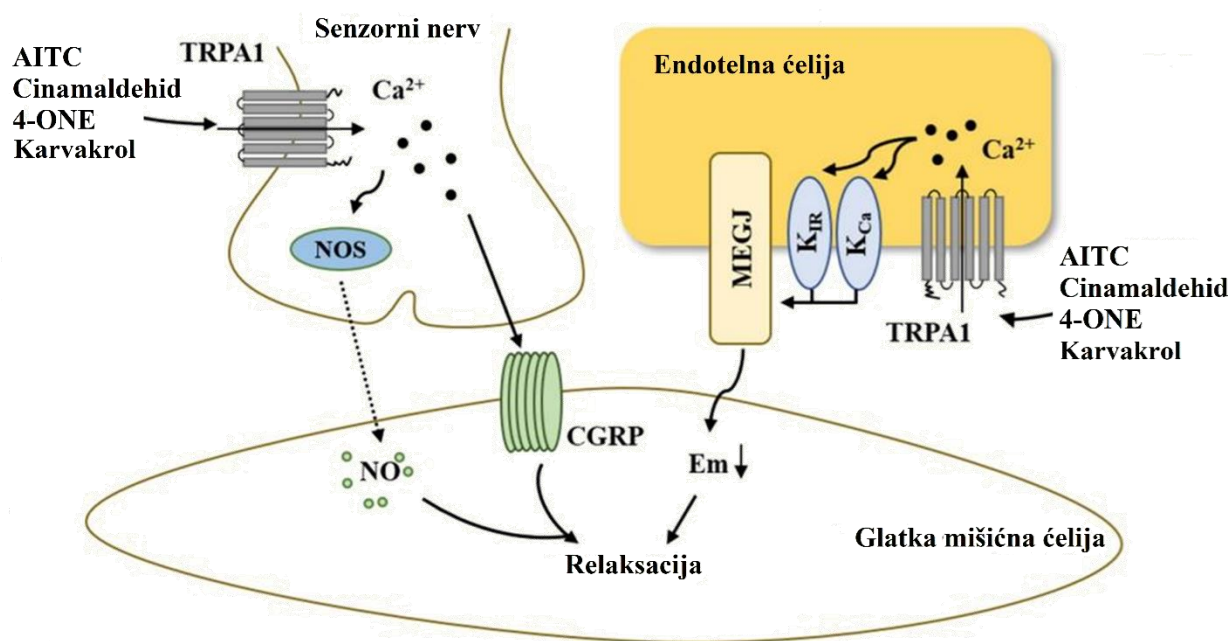
1.2.3 Uloga TRPA1 kanala u regulaciji vaskularnog tonusa

Oslobađanje različitih neuropeptida iz senzornih neurona učestvuje u regulaciji vaskularnog tonusa okolnih, inervisanih krvnih sudova. Relaksaciju prekontrahovanih mezenteričnih arterija pacova pomoću alicina i dialil disulfida bilo je moguće suprimirati korištenjem neselektivnih blokatora TRP kanala, denervacijom krvnog suda pomoću kapsaicina, kao i primjenom antagonista CGRP.¹⁰²

TRPA1 kanali su pronađeni na perivaskularnim neuronima u okolini mezenterijuma, te su po aktivaciji otpuštali CGRP i izazivali dilataciju okolnih krvnih sudova (Slika 5).^{103,94} Primjena HC-030031 (selektivni blokator TRPA1) u jednoj studiji smanjila je pojačani meningealni protok krvi izazvan alil izotiocijanatom i akroleinom, poznatim agonistima TRPA1 kanala, ukazujući na značaj ovog kanala u regulaciji vaskularnog tonusa meningealnih krvnih sudova.¹⁰⁴

Nekoliko istraživačkih grupa pokušalo je dokazati prisustvo TRPA1 kanala na glatkim mišićnim ćelijama na indirektan način. Relaksacija pacovske aorte pomoću cinamaldehida, koji je aktivator TRPA1 kanala, nije bila zavisna od prisustva endotela, ukazujući na direktan efekat cinamaldehida na glatke mišićne ćelije.¹⁰⁵ Međutim, specifični inhibitori TRPA1 kanala nisu testirani u ovoj studiji. U drugoj studiji perzistentna relaksacija u prisustvu HC-030031 i kod TRPA1 nokaut miševa ukazuje da cinamaldehyd izaziva relaksaciju mezenteričnih arterija miševa neovisno od ovih kanala.¹⁰⁶ U cerebralnim arterijama pacova, TRPA1 kanali su prisutni na endotelnim ćelijama krvnih sudova, dok njihovo prisustvo na glatkim mišićnim ćelijama nije bilo moguće potvrditi.⁶⁸ S druge strane, prisustvo TRPA1 kanala potvrđeno je na glatkim mišićnim ćelijama humanih dermalnih arterija.¹⁰⁷

Endotel–zavisna vazodilatacija obuhvata mehanizme koji dovode do stvaranja vazodilatatornih supstanci u endotelu kao što su NO i prostaciklini ili dovode do hiperpolarizacije samog endotela. Ovi mehanizmi mogu biti aktivirani od strane različitih vazoaktivnih molekula kao što su npr. adenozin, bradikinin, acetilholin i sl.



Slika 5. Uloga TRPA1 kanala u vazodilataciji.

Aktivacija TRPA1 kanala dovodi do influksa Ca^{2+} jona u ćelije endotela, koji zatim aktivira kalijumske kanale i dovodi do nastanka hiperpolarizacije ćelijske membrane endotelne ćelije. Putem mioendotelne propusnice, hiperpolarizacija se prenosi i na glatke mišićne ćelije krvnih sudova, što dovodi do vazorelaksacije. Pored toga aktivacija TRPA1 u senzornim neuronima takođe dovodi do influksa Ca^{2+} jona u nervne ćelije, što za posljedicu ima otpuštanje CGRP-a i NO-a koji su značajni medijatori vazodilatacije. Alil izotiocijanat (AITC), 4-oksononenal (4-ONE). Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora Wang i saradnici, 2019.⁹⁴

TRPA1 kanali se nalaze na endotelnim ćelijama arterija koje vaskularizuju meku moždanu ovojnicu i učestvuju u mehanizmima vazodilatacije.⁶⁸ Međutim u endotelnim ćelijama arterija u srcu, mezenterijumu, bubregu ili koži TRPA1 kanali nisu pronađeni. Aktivacija TRPA1 u cerebralnim arterijama izaziva endotelno-zavisnu vazodilataciju, koja je izostala kod endotel TRPA1 nokaut miševa, kao i u prisustvu blokatora HC-030031.¹⁰⁸ Ovakav odgovor cerebralnih arterija na aktivaciju TRPA1 ostao je imun na blokadu NO sintetaze, dok je blokadom SK_{Ca} i IK_{Ca} srednje provodljivosti (eng. *Intermediate K_{Ca}* ; IK_{Ca}) došlo do potpunog izostanka vazodilatacije.¹⁰⁸ Ovi nalazi ukazuju da ulazak Ca^{2+} jona kroz TRPA1 kanale u ćelije endotela dovodi do daljeg otpuštanja Ca^{2+} jona iz endoplazmatičnog retikuluma, što za posljedicu ima aktivaciju SK_{Ca} i IK_{Ca}

kanala. Izlazak K^+ jona izaziva hiperpolarizaciju endotelnih ćelija koja se prenosi na glatke mišićne ćelije i izaziva relaksaciju istih.

Događaji nastali signalizacijom putem Ca^{2+} jona prilikom očitavanja nazivaju se „iskre” (eng. *sparklets*) i vezuju se za jonske kanale koji dovode do njihovog nastanka kao npr. „TRPA1 iskre”. Jedna TRPA1 iskra pri očitavanju pokazuje signal koji je otprilike oko 200 puta veći nego pri očitavanju od jedne L-tip VGCC iskre.¹⁰⁸ Sullivan i koautori su pokazali da je aktivnost TRPA1 kanala u bazalnim uslovima mala i da je povećanje ćelijske koncentracije Ca^{2+} jona posljedica aktivacije neaktivnih tj. „uspavanih” TRPA1 kanala, a ne pojačanje frekvencije jona kroz već aktivne TRPA1 kanale.¹⁰⁸ Značajno je napomeniti da se broj aktivnih mjesta pri optimalnim uslovima nije drastično povećao, iako se ovi kanali nalaze raspoređeni po čitavoj ćelijskoj membrani, što pokazuje da veliki broj TRPA1 kanala ostaje u „uspavanom” stanju. Sličan fenomen uočen je i kod L-tipa VGCC u glatkim mišićnim ćelijama cerebralnih arterija pacova, međutim razlog njegovog nastanka nije još uvijek objašnjen.¹⁰⁹

1.3 Egzogeni modulatori vaskularnog tonusa

Egzogene molekule koje svoj efekat ispoljavaju mijenjajući tonus glatkih mišića krvnih sudova, mogu se na osnovu postignutog dejstva podijeliti u dvije velike grupe, vazokonstriktori i vazodilatatori. U kliničkoj praksi vazodilatatori su mnogo više zastupljeni i imaju brojne indikacije. Pored hipertenzije u čijoj se terapiji najčešće koriste, vazodilatatori takođe imaju značaj i u terapiji angine pectoris, hipertenzivnih kriza, perifernih vaskularnih oboljenja i preeklampsije. Vazodilatatori imaju različite mehanizme dejstva pomoću kojih ispoljavaju svoj efekat. Koji mehanizmi će dovesti do nastanka vazodilatacionog efekta zavisi od samih vazodilatatora, ali i od krvnih sudova čija se vazodilatacija vrši. Veliku grupu vazodilatatora koji se koriste u kliničkoj praksi predstavljaju blokatori L-tipa VGCC među koje spadaju amlodipin, nikardipin, nifedipin i nimodipin.¹¹⁰ Vazodilatatori kao što su minoksidil, diazoksid, nikorandil i pinacidil djeluju tako što aktiviraju K_{ATP} kanale i dovode do hiperpolarizacije ćelijske membrane.¹¹¹ Međutim zbog velikog broja neželjenih dejstava, ne koriste se regularno u tretmanu hipertenzije, nego su svoju primjenu našla kao modelne supstance u ispitivanju uloge kalijumskih kanala. Minoksidil se

primjenjuje za liječenje alopecije, diazoksid kod teških hipertenzivnih kriza otpornih na druge vazodilatatore, dok se nikorandil ponekad koristi u terapiji angine pectoris.

Pored sintetskih mnogobrojna prirodna jedinjenja imaju uticaj na regulaciju vaskularnog tonusa. Među njima monoterpenska jedinjenja se izdvajaju kao velika grupa prirodnih molekula odgovornih za modulaciju različitih jonskih kanala i na taj način kontrolu vazoaktivnosti i drugih kardiovaskularnih funkcija.

1.3.1 Vazoaktivnost monoterpenskih jedinjenja

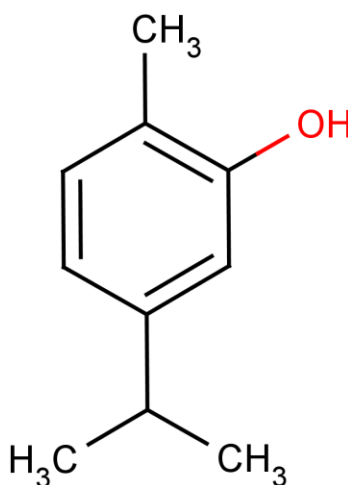
Monoterpenska jedinjenja ili skraćeno monoterpeni predstavljaju grupu terpenskih jedinjenja koja se sastoje od dvije izoprenske podjedinice (2-metil-1,3-butandien), a mogu biti linearne ili ciklične strukture. Monoterpeni su prisutni u različitim biljnim vrstama, uključujući različite vrste drveća, voća, povrća, ali i začinskog bilja. Biosintetski monoterpeni nastaju iz izopentenil pirofosfata koji predstavlja intermedijer u nastanku mevalonske kiseline. Najviše su koncentrisani u etarskim uljima biljaka. Zahvaljujući različitim biološkim efektima, kao i karakterističnim organoleptičkim svojstvima neki monoterpeni su pronašli svoju primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj, poljoprivrednoj i industriji hrane. Najpoznatiji predstavnici ove grupe jedinjenja su mentol, timol, kamfor, cineol, citral, limonen, cinamaldehyd i karvakrol.

U posljednjih nekoliko godina intenzivno se istražuje mogućnost primjene monoterpenskih jedinjenja u terapiji različitih kardiovaskularnih oboljenja, pogotovo oboljenja povezanih sa povišenim krvnim pritiskom, zbog vazorelaksantnog efekta ovih jedinjenja. Timol i karvakrol, koji su glavni sastojci etarskog ulja biljaka iz roda *Thymus*, pokazali su vazodilatatorno dejstvo na izolovanim krvnim sudovima pacova.¹¹² Metileugenol i eugenol su takođe pokazali značajno vazodilatatorno dejstvo na humanim umbilikalnim venama.¹¹³ Citral, karveol i cinamaldehyd su takođe pokazali sposobnost da relaksiraju humane krvne sudove.^{107,114,115}

Biljke iz porodice *Labiatae* među kojima se nalazi i origano primjenjuju se tradicionalno kod osoba oboljelih od hipertenzije.¹¹⁶ Ekstrakti biljaka iz ove porodice pokazali su vazodilatatorno dejstvo i u *in vitro* studijama, a jedan od glavnih aktivnih principa u ovim ekstraktima koji je zadužen za ispoljavanje njihovih bioloških efekata, jeste karvakrol.

1.3.2 Karvakrol

Karvakrol [2-metil-5-(1-metil etil)-fenol] je monoterpensko jedinjenje tečnog agregatnog stanja koje se u velikom procentu nalazi u etarskim uljima biljaka iz porodice *Labiatae*, naročito u vrstama *Thymus*, *Satureja*, *Thymbra* i *Origanum* (Slika 6).¹¹⁷⁻¹¹⁹ Hemijski sastav ovih etarskih ulja, kao i sam sadržaj karvakrola i srodnih monoterpenskih jedinjenja u njemu u velikoj mjeri zavisi od droge biljke koja se koristi za ekstrakciju, kao i od geografskog područja i vremena i načina sakupljanja droga. Kao uljasta tečnost karvakrol ima tačku ključanja između 237–238 °C, tačku topljenja na 1 °C i gustinu od 0,975 g/cm³ na sobnoj temperaturi tj. 25 °C.¹²⁰ Karvakrol je nerastvorljiv u vodi, ali je veoma rastvorljiv u etanolu. Kroz mnogobrojne *in vivo* i *in vitro* studije opisani su različiti biološki efekti karvakrola, kao što je njegovo antiinflamatorno, antioksidativno, antitumorsko, antibakterijsko, antigljivično i antinematodno dejstvo.¹²¹⁻¹²⁶ Zbog mirisa koji podsjeća na origano i antimikrobnog dejstva koristi se kao konzervans u industriji hrane. Pored toga, zbog svog antimikrobnog dejstva, karvakrol se veoma često nalazi u sastavu dijetetskih suplemenata koji se izdaju bez recepta (eng. *Over The Counter*, OTC preparata), koji se koriste kao pomoć u liječenju urinarnih infekcija.



Slika 6. Hemijska struktura karvakrola.

Karvakrol apliciran intraperitonealno uspio je da snizi vrijednosti krvnog pritiska kod anesteziranih pacova, pokazujući na taj način svoj hipotenzivni efekat u *in vivo* sistemu.¹²⁷ Kada se primjenjivao oralno, karvakrol je uspio da snizi krvni pritisak kod spontano hipertenzivnih

pacova uz istovremeno smanjenje ukupnog perifernog vaskularnog otpora.^{128,129} Takođe je poznato da je karvakrol snažan vazorelaksans izolovanih krvnih sudova pacova.¹¹² Kombinacija antinflatarnog, antioksidativnog i vazodilatatornog dejstva čini karvakrol molekulom sa velikim potencijalom za primjenu u terapiji kardiovaskularnih oboljenja.

Više različitih jonskih kanala i signalnih puteva je uključeno u mehanizam vazodilatatornog dejstva karvakrola, čineći ga veoma kompleksnim. Aktivacija K_v kanala pomoću karvakrola dovela je do relaksacije prethodno kontrahovanih aorti pacova.¹³⁰ Takođe se pokazalo da je jedan od mehanizama vazorelaksantnog dejstva karvakrola i drugih monoterpenskih jedinjenja blokada L-tipa VGCC i sprečavanje ulaska Ca^{2+} jona u glatke mišićne ćelije.^{131,115}

Mnoga monoterpenska jedinjenja, među kojima su eugenol, timol i karvakrol, su dokazani aktivatori TRP kanala kao što je TRPV3.¹³² Povezanost između aktivacije TRPV3 pomoću navedenih monoterpenskih jedinjenja i nastanka vazodilatacije je već opisana na cerebralnim i uterinim arterijama pacova.^{68,133} Treba istaći da je karvakrol takođe veoma potentan aktivator TRPA1 kanala.⁸² Međutim sposobnost karvakrola da aktivacijom TRPA1 kanala dovede do vazodilatacije humanih krvnih sudova do sada nije ispitivana.

1.4 Kompjuterske metode koje se koriste u dizajnu i razvoju novih lijekova

Krajem devedesetih godina prošlog vijeka uočeno je da veliki broj novosintetisanih lijekova bude odbačen u fazi kliničkih ispitivanja, najčešće zbog nepovoljne apsorpcije, distribucije, metabolizma, ekskrecije ili toksičnosti (eng. *Absorption Distribution Metabolism Excretion Toxicity*, ADMET). Postalo je neophodno pronaći adekvatan način za prepoznavanje molekula koje bi se trebale isključiti još u početnim fazama istraživanja. *In silico* metode su privukle veliku pažnju industrije zbog mogućnosti da se testira veliki broj molekula različitih fizičko-hemijskih osobina i strukture, te da se jedinjenja sa nepovoljnim osobinama isključe još prije sinteze i *in vitro* ili *in vivo* ispitivanja.¹³⁴ U odnosu na klasični pristup razvoju novih lijekova metodom pokušaj-greška, *in silico* metode omogućavaju dizajniranje novih jedinjenja i predviđanje njihovih karakteristika, te svoju prednost pokazuju u značajnoj uštedi resursa. Tehnike kompjuterske hemije, molekulskog modelovanja i molekulskog dokinga objedinjene su pod

nazivom tehnike kompjuterski potpomognutog dizajna lijekova (eng. *Computer-Aided Drug Design*, CADD). CADD tehnike se dijele na dvije grupe na osnovu toga da li je poznata i dostupna 3D struktura ciljnog mjesta dejstva lijeka: dizajn zasnovan na strukturi ciljnog mjesta dejstva (eng. *Structure-Based Drug Design*, SBDD) i dizajn zasnovan na strukturi liganda (eng. *Ligand-Based Drug Design*, LBDD).¹³⁵

SBDD tehnika se koristi kada je poznata 3D struktura proteina koju možemo preuzeti iz proteinske baze podataka (eng. Protein Data Bank, PDB), ako je ona riješena kristalografski. U slučaju da nije, struktura se može dobiti modelovanjem na osnovu poznate sekvence aminokiselina. Metode koje spadaju u SBDD su:

1. Molekulski doking – određuje optimalnu konformaciju liganda na aktivnom mjestu receptora i opisuje interakcije između liganda i receptora.¹³⁶
2. Molekulska dinamika – procjenjuje interakcije između liganda i receptora tokom određenog vremenskog intervala.¹³⁷
3. Virtuelni skrining na osnovu ciljnog mjesta – vrši rangiranje kandidata iz određene baze podataka nakon fitovanja istih u aktivno mjesto receptora.¹³⁸
4. *De novo* dizajn – pronalaze se fragmenti koji imaju povoljne interakcije i fitovanje u aktivno mjesto receptora, a zatim se odabrani fragmenti povezuju u novu aktivnu molekulu.¹³⁹

Kada nije poznata 3D struktura ciljnog mjesta i kada nije moguće izvršiti modelovanje iste, koriste se LBDD tehnike. Ove tehnike počivaju na principu sličnosti, gdje se pretpostavlja da bi strukturno slična jedinjenja mogla ispoljavati sličnu aktivnost. Najviše korištene metode LBDD su:

1. Studija kvantitativnog odnosa strukture i dejstva (eng. *Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR) – upotrebom statističkih metoda povezuje strukturne karakteristike sa biološkom aktivnošću.¹³⁵
2. Modelovanje farmakofore – određivanje donora ili akceptora vodoničnih veza, anjonske i katjonske centre, aromatične regione ili njihove kombinacije koje ostvaruju poželjne interakcije sa ciljnim mjestom.¹⁴⁰

3. Virtualni skrining na osnovu strukture liganda – pretraživanje ogromnih baza jedinjenja s ciljem pronalaska onih koja imaju strukturnu sličnost sa poznatom aktivnom molekulom.¹⁴¹

1.4.1 Studija kvantitativnog odnosa strukture i dejstva (QSAR)

Studija kvantitativnog odnosa strukture i dejstva (eng. *Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR) jeste *in silico* metoda pomoću koje je moguće kvantifikovati vezu između strukture i biološkog dejstva molekula. Osnovni princip veze strukture i dejstva može se prikazati jednačinom:

$$\Phi = f(C)$$

gdje Φ predstavlja fiziološko dejstvo jedinjenja, a C njegovu hemijsku konstituciju. Ovakva analiza omogućava da se na osnovu hemijskih osobina malog broja strukturno sličnih jedinjenja, provjeri biološka aktivnost značajno većeg broja jedinjenja. U zavisnosti od toga da li se podaci o konformaciji same molekule i položaju njenih atoma uzimaju u izračunavanje kvantitativnog odnosa veze između strukture i dejstva, razlikujemo 2D-QSAR i 3D-QSAR. S obzirom da je za interakciju sa receptorom i ispoljavanje biološke aktivnosti velikog broja molekula, veoma bitna specifična prostorna konformacija same molekule, 3D-QSAR će obezbjediti preciznije informacije o strukturnim karakteristikama bitnim za dejstvo.

Razlikujemo četiri osnovne faze QSAR analize:

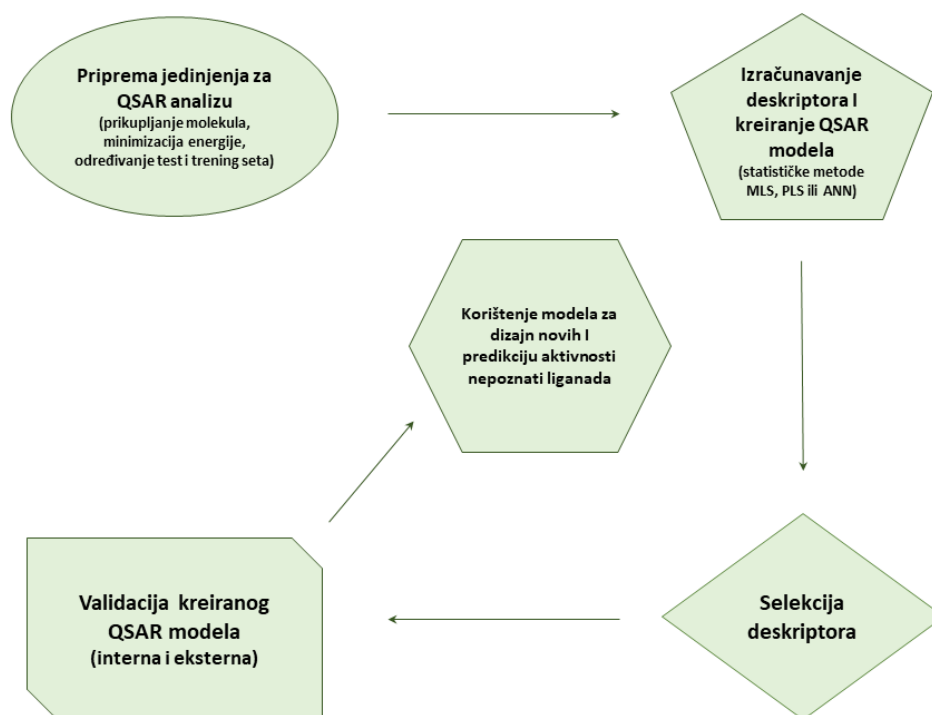
1. odabir jedinjenja i optimizacija njihovih struktura,
2. prevođenje struktura u deskriptore i odabir deskriptora,
3. kreiranje QSAR modela na osnovu eksperimentalnih vrijednosti biološke aktivnosti i izračunavanje deskriptora,
4. validacija QSAR modela (Slika 8).¹⁴²

Prvi korak na početku QSAR analize predstavlja odabir jedinjenja čiju strukturu i aktivnost želimo ispitivati. Odabrana jedinjenja se dijele na trening set, koji se koristi za kreiranje samog modela (minimalno 20 jedinjenja) i test set, koji se koristi za eksternu validaciju kreiranog modela

(minimalno 10 jedinjenja). Odgovori jedinjenja kao što su biološka aktinost ili toksičnost, izraženi su najčešće kao EC_{50} , IC_{50} ili LD_{50} , pri čemu raspon ovih vrijednosti može biti izuzetno širok, te se zbog toga primjenjuje logaritamska transformacija ovih vrijednosti (pEC_{50} , pIC_{50} ili pLD_{50}), što olakšava modelovanje.¹³⁵ Zatim je potrebno generisati optimizovane 3D strukture korištenjem kompjuterskih proračuna, da bi se dobio što je približnije moguće njihov pravi položaj u prostoru minimizujući njihove konformacione energije.

Računarske metode koje se koriste u tu svrhu su:

1. molekulske – ne uzimaju u obzir raspored elektrona, brze i relativno tačne (koriste se za optimizaciju velikih molekula),
2. kvantno mehaničke *ab initio* metode – uzimaju u proračun položaj elektrona, najpreciznije su, ali su računski i vremenski najzahtjevnije (npr. Hartree Fock metoda),
3. poluempirijske (eng. *semiempirical*) – kvantno mehaničke, relativno brze, a manje zahtjevne i preciznije od *ab initio* metoda (npr. AM1 i PM3 metode).¹⁴³



Slika 8. Šematski prikaz faza QSAR studije.

Za deskriptore se može reći da su oni banka informacija o strukturi molekule. Razlikujemo 0D (npr. broj atoma i veza), 1D (npr. broj fragmenata), 2D (topološki, strukturni, fizičko-hemijski parametri), 3D (geometrijski, sterni i zapreminski deskriptori) i više konformacijske deskriptore, te na osnovu toga, kao što je već pomenuto i same QSAR metode se dijele na 0D, 1D, 2D, 3D QSAR itd.¹⁴⁴ Vezivanje molekula sa receptorom odvija se putem nekovalentnih veza, pa su zbog toga sterni i elektronski efekti kao i lipofilnost molekule veoma značajni za ostvarivanje veze sa receptorom i ispoljavanjem bioloških efekata molekule. Današnji softveri omogućuju izračunavanje velikog broja deskriptora, te redukciju njihovog broja tako što se uklanjaju oni deskriptori sa konstantnom vrijednošću za sve opservacije i veoma malom varijansom. Kod 3D QSAR metodologije molekule se prije računanja deskriptora smještaju u trodimenzionalnu mrežu koja je izgrađena od tačaka u prostoru koje su raspoređene na odgovarajućoj udaljenosti jedna od druge tzv. *grid* tačaka. Zatim se u mrežu postavlja atom koji se naziva proba i za svaku *grid* tačku se izračunavaju sterne i elektrostatičke interakcije privlačenja i odbijanja između probe i cijele molekule. Tri probe koje se koriste su proton (H^+ ; za elektrostatičke interakcije), metilkarbonijum jon ($^+CH_3$; za sterne interakcije) i voda (H_2O ; za hidrofobne interakcije).¹³⁵ Poravnavanje ostalih molekula trening seta u 3D mreži i mjerenje njihovih sternih i elektrostatičkih polja predstavlja sljedeću fazu u 3D QSAR analizi.

U QSAR studijama se koriste razne statističke metode kako bi se proizveli odgovarajući modeli, a najčešće se upotrebljavaju multipla linearna regresija (eng. *Multiple Linear Regression*, MLR), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Squares Regression*, PLS) i vještačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Network*, ANN).

MLR se koristi u situacijama kada postoji značajno veći broj jedinjenja u odnosu na broj deskriptora i ovaj odnos bi trebao biti minimalno 5:1.¹⁴⁵ PLS je regresioni metod koji je manje osjetljiv od MLR modela i pogodan je kada postoji mnogo veći broj deskriptora u odnosu na broj jedinjenja. Metoda se zasniva na prevođenju postojećih originalnih varijabli u manji broj međusobno nezavisnih varijabli koje se nazivaju latentne varijable. Ovo omogućuje maksimalnu korelaciju između nezavisnih varijabli i odgovora koji se prati u studiji. Glavni nedostatak ove metode je generisanje velike količine rezultata koje nije lako interpretirati.¹³⁵ ANN jeste kompjuterski algoritam koji je inspirisan načinom obrade informacija u mozgu čovjeka. Sastoji se od više paralelno poredanih slojeva, gdje se prvi sloj naziva ulazni sloj i on prima podatke u obliku

nezavisnih varijabli koje se koriste za QSAR. Zatim se nalaze jedan ili više tzv. skrivenih slojeva koji učestvuju u nezavisnim izračunavanjima i prosljeđuju podatke između ulaznog i izlaznog sloja. Na kraju se nalazi izlazni sloj koji izračunava izlazne podatke iz mreže.¹⁴⁶

Validacija je osnova svakog kreiranog QSAR modela i predstavlja proces kojim se potvrđuje njegova pouzdanost. Razlikujemo internu i eksternu validaciju.

Interna validacija predstavlja proračune koji se vrše samo na molekulama iz trening seta. Najčešći parametri interne validacije su:

1. Koeficijent determinacije (R^2) – ukazuje na kvalitet fitovanja modela tj. koliko model dobro reprodukuje eksperimentalne podatke. Njegova vrijednost može biti od 0 do 1, pri čemu što je rezultat bliži 1, model bolje reprodukuje podatke.¹⁴³
2. Validacioni regresioni faktor unakrsne validacije (Q^2) – prilikom računanja između stvarnih i predviđenih vrijednosti molekula iz trening seta, koristi se princip LOO (eng. *Leave One Out*). LOO podrazumjeva kreiranje novog modela uz izostavljanje jednog jedinjenja, a zatim se novi model koristi da se predviti aktivnost izostavljenog jedinjenja. Dobijene razlike u predviđenim i stvarnim aktivnostima za jedinjenja iz trening seta koriste se dalje u određivanju Q^2 . Postupak se ponavlja dok svako jedinjenje ne bude izostavljeno jednom. Vrijednost ovog parametra treba biti $> 0,5$, da bi model imao zadovoljavajuću prediktivnu sposobnost.¹⁴³

Eksterna validacija vrši se pomoću jedinjenja koja nisu korištena u kreiranju samog modela (test set). Parametri koji se koriste za eksternu validaciju su:

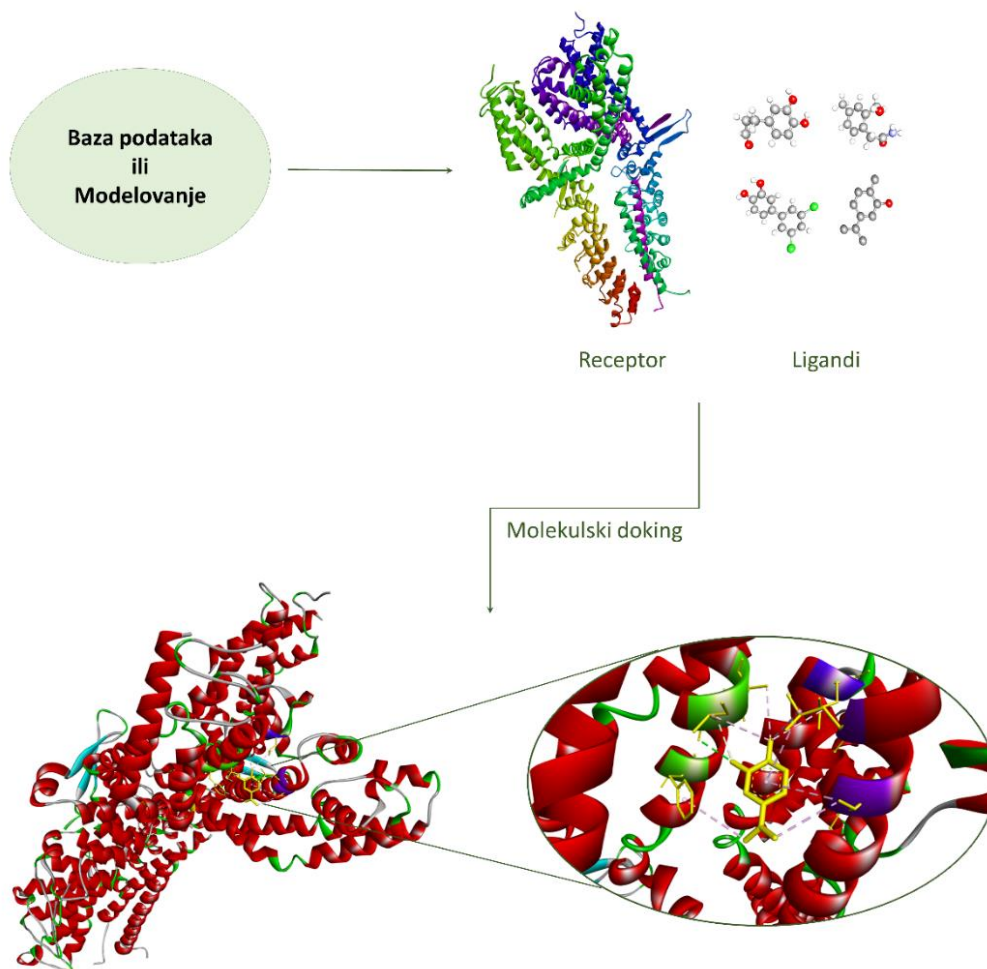
1. Prediktivni koeficijent korelacije (R^2_{pred}) – mjera sposobnosti modela da predvodi biološku aktivnost molekula iz test seta. Vrijednost ovog parametra $> 0,5$ ukazuje na dobru prediktivnu sposobnost kreiranog modela.¹⁴³
2. Metrički parametri (r^2_m) – koriste se kada je neophodan rigorozniji kriterijum validacije, kao što je slučaj kada je prisutan mali broj jedinjenja u test setu.¹⁴⁷ Vrijednosti parametara r^2_m i reverzni r^2_m (r'^2_m) trebaju biti veće od 0,5, a vrijednost delta r^2_m (Δr^2_m) manja od 0,2 da bi model bio prihvatljiv.

Iako validiran, QSAR model ne može pouzdano predviđati aktivnosti svih mogućih molekula, nego samo onih koji upadaju u njegov domen primjenjivosti. Odabir trening seta

definišu deskriptori i modelni odgovor domena primjenjivosti. Domen primjenjivosti nekog modela predstavlja teorijski obuhvaćene grupe hemijskih jedinjenja i samo karakteristike onih jedinjenja koja su obuhvaćena domenom primjenjivosti mogu biti pouzdano predviđene.¹⁴⁸

1.4.2 Molekulski doking i molekulska dinamika

Molekulski doking je gotovo neizostavan dio *in silico* studija, jer ispitivanje interakcije između liganda i proteina omogućava racionalniji pristup samom dizajnu novih farmakološki aktivnih molekula.¹⁴⁹ Prije početka samog molekulskog dokinga neophodno je pripremiti ligande i poznavati 3D strukturu proteina (Slika 9). Priprema liganda predstavlja provjeru jonizacionog stanja i stereoizomera liganda, a takođe je bitno provjeriti i format u kojem je sačuvana struktura liganda (najčešće se koristi Mol2 format). U proteinskoj bazi podataka (eng. *Protein Data Bank*, PDB) i sličnim bazama moguće je pronaći eksperimentalno određenu 3D strukturu odgovarajućeg proteina. Kod odabira strukture proteina za molekulski doking, uvijek je poželjno odabrati onu strukturu koja je eksperimentalno dobijena, kristalografijom ili NMR spektroskopijom.¹³⁵ Prednost se uvijek daje kristalografskim strukturama proteina u kompleksu sa ligandom (holoproteinske) u odnosu na strukture proteina bez liganda (apoproteinske). U slučaju da eksperimentalna struktura proteina nije određena, za molekulski doking može se koristiti i homologni model. Homologni model treba biti eksperimentalno validiran i on predstavlja kompjuterski modelovanu strukturu proteina koristeći kao referentnu eksperimentalno određenu strukturu poznatog proteina.¹²⁰ Priprema proteina obuhvata i dodavanje atoma vodonika koji nedostaju u kristalografskim strukturama, kao i uklanjanje molekula vode unutar mjesta vezivanja osim u slučaju kada su molekuli vode čvrsto vezani i doprinose ukupnom vezivanju liganda za protein.¹³⁵ Takođe je potrebno definisati i očekivano mjesto vezivanja liganda, prije početka sledeće faze.



Slika 9. Šematski prikaz molekulskog dokinga.

U drugoj fazi vrši se procjena i izračunavanje afiniteta vezivanja tj. energije kompleksa ligand–protein. Energija vezivanja kompleksa ligand–protein računa se korištenjem matematičkih funkcija koje se nazivaju scoring funkcije.¹³⁵ Ove funkcije izračunavaju razliku u slobodnoj energiji sistema kada je ligand u kompleksu sa proteinom i kada nije: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. U formuli ΔG predstavlja promjenu Gibsove slobodne energije interakcije ligand protein, ΔH promjenu entalpije, ΔS promjenu entropije i T standardnu temperaturu. Kada se formira kompleks njegova energija je manja u odnosu na zbirnu energiju svih molekula zbog čega je vrijednost Gibsove slobodne energije negativna. Pomoću scoring funkcija modeluju se ključne interakcije koje čine entalpijsku komponentru kao što su Van der Waalsove sile, vodonične veze i elektrostatičke interakcije.¹³⁵ Entroprijska komponenta se često izostavlja zbog složenosti modelovanja promjena

koje mogu uticati na entropiju samog sistema. Ligand se smješta u mrežu koja predstavlja energetska mapu uslovljenu karakteristikama samog mjesta vezivanja na proteinu, a zatim algoritam stvara veliki broj konformacija liganda istovremeno računajući energiju vezivanja za svaku pozu. Nakon višestrukog ponavljanja, program će predložiti više poza i rangirati ih po vrijednosti energije vezivanja od najmanje ka najvećoj. Takođe moguće je identifikovati i ključne aminokiseline koje ostvaruju interakciju sa određenim farmakoforima liganda, a zatim ove interakcije predstaviti grafički. Kao i kod ostalih *in silico* tehnika, neophodno je izvršiti validaciju doking modela. Osnovni parametar validacije predstavlja srednji kvadrat devijacije (eng. *Root Mean Square Deviation, RMSD*), a određuje se poređenjem dokovane sa pozom liganda iz kokristalizovanog kompleksa sa proteinom. Vrijednost ovog parametra treba da bude što je moguće bliža 0, a model je zadovoljavajući u predviđanju poze ako je vrijednost ovog parametra manja od 2 Å.¹³⁴

Molekulska dinamika često se nastavlja na molekulski doking i njome se određuje stabilnost protein–ligand kompleksa u funkciji vremena. Ovaj vremenski interval obično traje 100 ns do 1 μ s i u toku njega se dešavaju interakcije između atoma i sistema. Za proračunavanja u molekulskoj dinamici često je neophodno dosta vremena, a to zavisi i od kompleksnosti ispitivanog sistema i procesorske snage samog računara.¹³⁵ Da bi se razumjela stabilnost i ponašanje molekulskog sistema primjenom tehnike kao što je molekulska dinamika, potrebno je odrediti parametre poput ukupne potencijalne energije sistema, radijusa rotacije i RMSD vrijednosti.¹⁵⁰

Ukupna potencijalna energija predstavlja mjeru koja pokazuje zbir svih međuatomskih sila, uključujući veze, uglove i druge interakcije unutar sistema. U primjeru stabilne simulacije molekulske dinamike, ukupna potencijalna energija dostiže plato ili pokazuje minimalne fluktuacije oko bazalne vrijednosti, što je dokaz da je sistem dostigao ravnotežno stanje neophodno za sprovođenje biofizičkih analiza.¹⁵¹ Prilikom poređenja različitih derivata ili interakcija sa različitim ligandom, promjene u ukupnoj potencijalnoj energiji ukazuju na to kako modifikacije u strukturi utiču na stabilnost i reaktivnost same molekule u sistemu. Radijus rotacije je takođe značajan parametar u ocjeni stabilnosti samoga sistema. Veće vrijednosti radijusa rotacije ukazuju na manju kompaktnost između liganda i proteina. Širi raspon u vrijednostima ovog parametra označava postojanost molekule u različitim konformacijama kao odgovor na promjenu uslova sredine u kojoj se sistem nalazi.¹⁵¹ Ovo potencijalno može dovesti do različitih vidova interakcija

sa samim sistemom. RMSD vrijednost je uobičajeni parametar koji se koristi za procjenu konformacijske stabilnosti molekule u poređenju sa referentnom strukturom tokom trajanja simulacije. Očekivana vrijednost RMSD-a za sistem koji se nalazi u stabilnom stanju jeste u rasponu od 0 do 2 Å.¹⁵¹

1.4.3 ADMET predikcija

Da bi se procijenile krucijalne fizičko-hemijske i biološke osobine velikog broja kandidata u ranoj fazi otkrivanja lijekova neophodno je koristiti odgovarajuće *in silico* alatke. Glavna prednost *in silico* metoda u određivanju ADMET karakteristika jeste ušteda vremenskih i materijalnih resursa koji su često ograničavajući faktor u ranoj fazi razvoja lijekova. Tokom razvoja lijekova sinteza novih molekula usmjerava se na one kandidate koji će imati odgovarajuće ADMET osobine, zahvaljujući čemu će moći da postignu neohodnu efektivnu koncentraciju na svom mjestu dejstva.¹⁵² Određivanjem ovih karakteristika smanjuje se rizik da se sintetišu i ispituju molekule koje imaju veliku vjerovatnoću da budu odbačene u kasnijim fazama razvoja lijekova. Pouzdani *in silico* modeli za određivanje ADMET osobina jedinjenja, izuzetno su značajni u donošenju odluka prilikom rane faze dizajna lijekova i široko korišteni od strane farmaceutske industrije.¹⁵³ Softveri koji se koriste za ADMET predikciju zahvaljujući različitim modelima određuju karakteristike koje bi mogle biti prepreka za dalji razvoj lijeka kao što su mutagenost, kancerogenost, niska rastvorljivost, visoka lipofilnost i slično. Ove osobine je veoma teško posmatrati pojedinačno, te se zbog toga one grupišu u tzv. *risk score*-ove, što olakšava njihovu procjenu, a samim tim i upoređivanje molekula kandidata, na osnovu čega se dalje rangiraju u odnosu na broj procijenjenih prepreka koje ih očekuju tokom razvoja.

2 HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

1. Karvakrol dovodi do vazodilatacije izolovanih humanih krvnih sudova.
2. Aktivacija TRPA1 kanala uključena je u vazodilatatorni mehanizam dejstva karvakrola.
3. Novodizajnirane molekule imaju poboljšanu predviđenu aktivnost na TRPA1 kanalima u poređenju sa karvakrolom.
4. Novodizajnirana jedinjenja imaju bolje predviđene ADMET karakteristike u odnosu na karvakrol.
5. Interakcije između TRPA1 kanala i novodizajniranih jedinjenja su značajnije i snažnije u odnosu na karvakrol.

3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati mehanizam vazodilatatornog dejstva karvakrola na izolovanim humanim umbilikalnim arterijama:
 - ispitati ulogu endotela u vazodilataciji izazvanoj karvakrolom;
 - ispitati ulogu kalijumskih kanala u vazodilataciji izazvanoj karvakrolom;
 - ispitati ulogu kalcijumskih kanala u vazodilataciji izazvanoj karvakrolom;
 - ispitati ulogu TRP kanala u vazodilataciji izazvanoj karvakrolom;
2. Ispitati ulogu TRPA1 kanala u vazodilataciji mezenteričnih arterija izazvanoj karvakrolom pomoću specifičnog blokatora;
3. Određivanje kvantitativnog odnosa između strukture i dejstva agonista TRPA1, kreiranje i validacija 3D-QSAR modela;
4. Kompjutersko dizajniranje novih analoga karvakrola sa unaprijeđenom aktivnošću prema TRPA1 kanalima;
5. Predviđanje ADMET karakteristika karvakrola i novodizajniranih jedinjenja;
6. Ispitivanje interakcije između karvakrola i njegovih dizajniranih analoga i TRPA1 proteina koristeći molekulski doking i molekulsku dinamiku.

4 METODOLOGIJA

4.1 *In vitro* eksperimenti

4.1.1 Hemikalije i reagensi

Krebs–Ringer bikarbonatni rastvor i Krebs–Ringer bikarbonatni rastvor bez Ca^{2+} jona pripremljeni su korištenjem sledećih supstanci:

- Kalijum hlorid (KCl) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka);
- Natrijum hlorid (NaCl) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka);
- Magnezijum sulfat (MgSO_4) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka);
- Kalcijum hlorid (CaCl_2) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka);
- Glukoza ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka);
- Kalijum dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka);
- Natrijum karbonat (NaHCO_3) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka);
- Barijum hlorid (BaCl_2) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka);
- Etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA) (Lach-Ner s.r.o. Neratovice, Češka).

Ostale supstance:

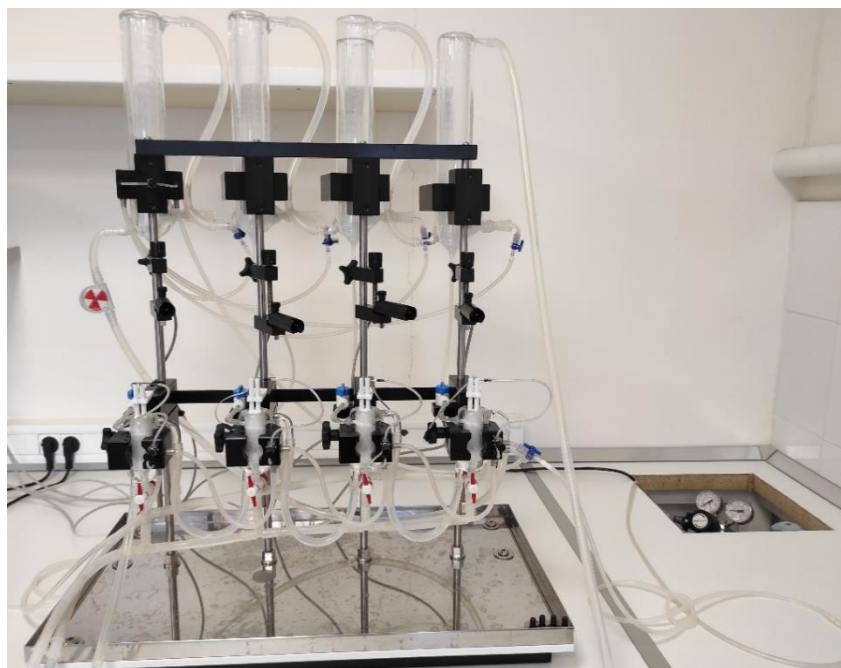
- Serotonin (5-HT; čistoća $\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
- Fenilefrin (PE; čistoća $\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
- Karvakrol (čistoća $\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
- Glibenklamid (GLB; čistoća $\geq 99\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
- Tetraetilamonijum (TEA; čistoća $\geq 99\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
- 4-aminopiridin (4-AP; čistoća $\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
- BAY K 8664 (čistoća $\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
- Izopentenil pirofosfat (IPP; čistoća $\geq 95\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
- A967079 (čistoća $\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD).

Takozvani „štok” rastvori su pripremljeni u destilovanoj vodi ili u 99,9 % etanolu, ovisno o rastvorljivosti supstance. Manje koncentracije su dobijene razblaživanjem sa destilovanom vodom, a razblaženja su čuvana na temperaturi od 0 do 4 °C.

4.1.2 Priprema sistema za izolovana tkiva

U nastavku teksta su opisani koraci koje neophodno pratiti kako bi se sistem za izolovana tkiva adekvatno pripremio prije početka eksperimenta.

- a) Pripremiti odgovarajući izotonični rastvor. Krebs–Ringer bikarbonatni rastvor (sastav: NaCl 118,3 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, glukoza 5,6 mM). Postoje i modifikovane verzije ovih rastvora koje ovisno o protokolu eksperimenta mogu npr. da sadrže manju koncentraciju Ca²⁺ jona. Količina pripremljenog rastvora varira u odnosu na zapreminu kupatilaca, kao i od njihovog broja. Najčešće se priprema 2 – 3 L ovog rastvora, s obzirom da su zapremine ćelija kupatilaca veoma često 10 – 20 mL i da se nalaze do maksimalno 4 kupatila povezana u jednom sistemu (Slika 7).
- b) Uključiti pumpu i grijač za medijum sistema za izolovana tkiva, te podesiti temperaturu na 37 °C.
- c) Uključiti računar i podesiti softver za očitavanje i mjerenje podataka u skladu sa uputama proizvođača.
- d) Provjeriti baždarenost transdjusera koji prenose signal izometričke tenzije tkiva.
- e) Napuniti kupatila izotoničnim rastvorom i pustiti da se ugrije na 37 °C.
- f) Povezati kupatila za izolovana tkiva sa 95 % O₂ / 5 % CO₂ gasnim sistemom i prekontrolisati dotok gasa u svako pojedinačno kupatilo.



Slika 7. Sistem za kupatila za izolovana tkiva i organe.

4.1.3 Uzorkovanje, priprema i postavljanje tkiva u kupatilo

Kao izvor preparata za sprovođenje ispitivanja mehanizama vazodilatacije izazvane karvakrolom korištene su humane umbilikalne arterije (HUA) dobijene iz pupčanika i humane mezenterične arterije (HMA) dobijene iz tkiva nakon resekcije prilikom abdominalnih operacija. Ova tkiva se smatraju medicinskim otpadom i predstavljaju široko rasprostranjen izvor preparata za ispitivanje vazoaktivnih supstanci.¹⁵⁴ HUA se veoma često koriste u ispitivanju vazoaktivnih supstanci zbog svoje široke dostupnosti.¹⁷ Usljed nedostatka inervacije, protok krvi i vaskularni tonus HUA je strogo regulisan vazoaktivnim supstancama, kao što su serotonin, homocistein, tromboksan, bradikinin i prostagladin $F2\alpha$, a što je veoma pogodno za ispitivanje mehanizma dejstva egzogenih vazoaktivnih molekula.^{155,156} S druge strane, HMA oslikavaju sistemsku cirkulaciju i omogućavaju izučavanje uloge endotela i inervacije u mehanizmima nastanka vazoaktivnih promjena.

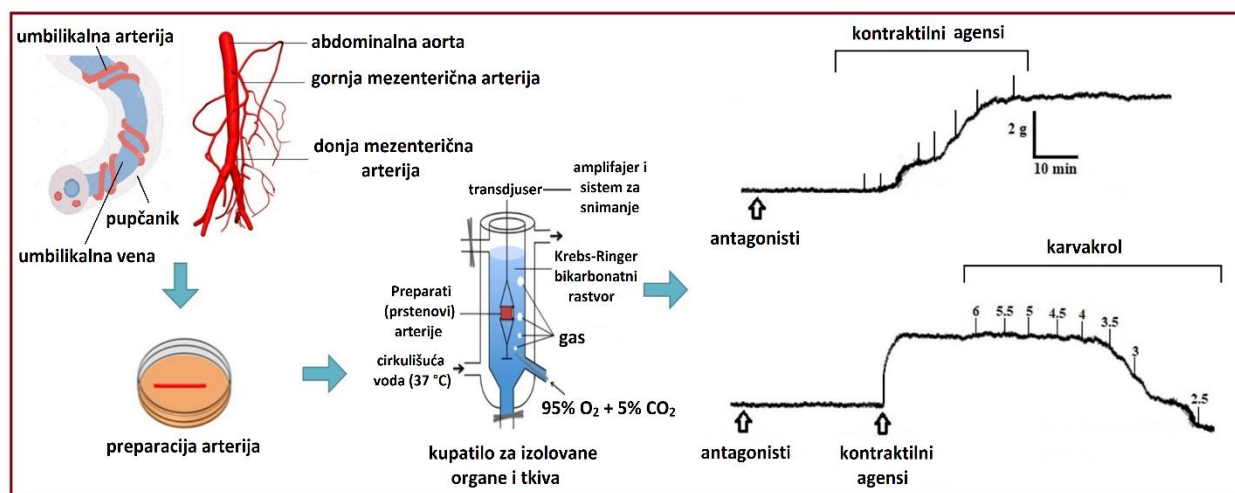
Nakon sakupljanja biološkog materijala na Univerzitetском kliničkom centru u Banjoj Luci, uzorci su transportovani do Centra za biomedicinska istraživanja, Medicinskog fakulteta u

Banjoj Luci, poštujući proceduru transporta putem hladnog lanca. Zaprimljeni uzorci su skladišteni na temperaturi od 4 °C i korišteni za eksperimente u toku narednih 48 sati. HUA i HMA prvo su u potpunosti očišćene od vezivnog i masnog tkiva, a zatim su isječene u prstenove dužine 2 – 3 mm. Čitav ovaj postupak se sprovodio u Petrijevoj posudi na ledu kako bi se maksimalno očuvala vitalnost samih preparata. Nakon što su preparati isječeni, dvije nerđajuće kukice provučene su kroz lumen prstena HUA ili HMA, a zatim su preparati uronjeni u komoru zapremine 10 mL ispunjenu Krebs–Ringer bikarbonatnim rastvorom (37 °C i pH=7) koji je aerizovan smjesom 95 % O₂ i 5 % CO₂ (Slika 10). Jedna kukica je bila povezana za pretvarač (MDE, SN: 20K0910) koji je prikačen za pojačivač snage (MDE, SN: 20K0912) i sistemom za snimanje (isoSys SOFT-02 program) na računaru, dok se druga kukica vezala za fiksni nosač u komori, omogućavajući na taj način podešavanje pasivne tenzije preparata.

4.1.4 Određivanje optimalnih eksperimentalnih uslova

Da bi se odredili optimalni eksperimentalni uslovi u pogledu zatezanja i inkubacije preparata, testirane su različite sile zatezanja i vremenski intervali inkubacije. Nakon postavljanja u kupatilce, svi preparati ostavljeni su 30 minuta kako bi postigli ravnotežno stanje. Zatim su podijeljeni u četiri grupe, od kojih je svaka grupa preparata bila zategnuta na jednu od sledećih pasivnih tenzija: 0,5 g, 1 g, 2 g ili 4 g. Kada se postigne zadata pasivna tenzija u medijum je dodavan KCl (40 mM) u tri vremenske tačke: 30, 60 i 120 minuta. Između svakog dodavanja medijum u kupatilkima je promijenjen nekoliko puta i pasivna tenzija preparata je ponovo podešena na zadanu vrijednost. Takođe je ispitano da li ponovljene inicijalne kontrakcije sa KCl doprinose boljem odgovoru preparata na spoljašnje stimuluse pomoću kontraktilnih agenasa. U jednoj grupi preparati su kontrahovani samo jednom dozom KCl (40 mM) nakon 120 minuta, dok su u drugoj grupi preparati bili kontrahovani u tri vremenske tačke: 30, 60 i 120 minuta. Odgovori preparata obe grupe nakon 120 minuta su međusobno upoređeni. Nakon određivanja optimalnih eksperimentalnih uslova, svi preparati su bili izloženi istima prije početka eksperimentalnih protokola, koji će biti opisani u nastavku teksta. Da bi se u potpunosti potvrdili optimalni eksperimentalni uslovi, upoređene su dvije krive koncentracija-odgovor za 5-HT (0,001 – 30

$\mu\text{mol/L}$) koje su dobijene korištenjem dvije različite pasivne tenzije i dva različita perioda inkubacije (1 g i 60 minuta ili 2 g i 120 minuta).



Slika 10. Šematski prikaz metodologije kupatila za izolovane organe i tkiva.

4.1.5 Eksperimentalni protokoli za određivanje vazoaktivnosti karvakrola i ispitivanje njegovog mehanizma dejstva

4.1.5.1 Prvi protokol – određivanje krive koncentracija-odgovor za karvakrol

Cilj ovog protokola bilo je određivanje koncentracijsko zavisnog vazodilatatornog dejstva karvakrola na izolovane HUA. Nakon pripreme preparata i izlaganja istih prethodno određenim optimalnim eksperimentalnim uslovima, preparati su prekontrahovani sa 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT-a. Jednom kada kontrakcija 5-HT-a dostigne ravnotežno stanje, rastuće koncentracije karvakrola su dodavane u kupatilce kumulativno u rasponu od 1 do 3000 $\mu\text{mol/L}$. Koncentracije su dodavane u koracima od po pola logaritma, a svaka sledeća koncentracija je dodata kada je postignut plato prethodne koncentracije. Da bi se procijenila vaskularna aktivnost karvakrola, takođe su dobijene i kontrolne krive rastvarača (smješe vode i etanola koje su dodavane kumulativno u omjerima i zapreminama koji odgovaraju koncentracijama od 1 do 3000 $\mu\text{mol/L}$). Vazodilatatorni efekat karvakrola izražen je kao procenat relaksacije u odnosu na kontrakciju 5-HT-a.

4.1.5.2 *Drugi protokol – ispitivanje uloga kalijumskih kanala u vazodilatatornom efektu karvakrola*

Da bi se ispitala uloga različitih kalijumskih kanala koji bi mogli biti uključeni u mehanizam vazorelaksantnog dejstva karvakrola na HUA, korišteni su odgovarajući blokatori ovih kanala. Kada su preparati pripremljeni za eksperiment, sledeći blokatori su dodavani u kupatilce i inkubirani 30 minuta:

- 1 $\mu\text{mol/L}$ GLB (blokator K_{ATP} kanala),
- 1 mmol/L 4-AP (blokator K_{v} kanala),
- 1 mmol/L TEA (blokator K_{Ca} kanala).

Po završetku inkubacije blokatora, preparati su prekontrahovani sa 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT-a, a kada je postignuto ravnotežno stanje rastuće koncentracije karvakrola (1 – 3000 $\mu\text{mol/L}$) su kumulativno dodavane u kupatilce na prethodno opisan način. Uticaj kalijumskih kanala na mehanizam vazodilatatornog dejstva karvakrola procijenjen je poređenjem krivih koncentracija-odgovor karvakrola u prisustvu i odsustvu ispitivanih blokatora.

4.1.5.3 *Treći protokol – ispitivanje uloge NO u vazodilatatornom efektu karvakrola*

Ispitivanje uloge NO u mehanizmu vazorelaksantnog dejstva karvakrola na HUA ispitano je korištenjem specifičnog antagoniste eNOS, enzima odgovornog za sintezu NO u endotelu krvnih sudova. Nakon pripreme, preparati su inkubirani 30 minuta sa 0,1 mmol/L L-NAME (inhibitor eNOS), a zatim prekontrahovani sa 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT-a. Na postignut plato 5-HT prekontrakcije dodavane su kumulativno rastuće koncentracije karvakrola (1 – 3000 $\mu\text{mol/L}$). Značaj NO u vazorelaksantnom efektu karvakrola procijenjen je poređenjem krivih koncentracija-odgovor karvakrola u prisustvu i odsustvu L-NAME.

4.1.5.4 *Četvrti protokol – ispitivanje uticaja karvakrola na kontrakciju izazvanu serotoninom*

Da bi se ispitao uticaj karvakrola na kontrakciju izazvanu 5-HT-om dvije različite koncentracije karvakrola (0,3 mmol/L i 1 mmol/L) inkubirane su u medijumu 30 minuta prije kumulativnog dodavanja rastućih koncentracija serotonina (0,001 – 30 $\mu\text{mol/L}$). Dobijene krive poređene su sa kontrolnom krivom koncentracija-odgovor 5-HT.

4.1.5.5 *Peti i šesti protokol – ispitivanje uloga L-tipa voltažno zavisnih Ca^{2+} kanala u vazodilatatornom efektu karvakrola*

Da bi se ispitala uloga L-tipa VGCC u mehanizmu vazorelaksantnog dejstva karvakrola na HUA, sprovedena su dva različita protokola.

U prvoj seriji eksperimenata, nakon pripreme preparata, Krebs–Ringer bikarbonatni medijum u kupatilcima zamjenjen je sa Krebs–Ringer bikarbonatnim medijumom bez Ca^{2+} . Nakon toga preparati su podijeljeni u četiri različite grupe:

- Prva grupa je inkubirana 30 minuta sa 0,3 mmol/L karvakrola,
- Druga grupa je inkubirana 30 minuta sa 1 mmol/L karvakrola,
- Treća grupa je inkubirana 30 minuta sa 10 μ mol/L nikardipina (NCP; blokator L-tipa VGCC),
- Četvrta grupa je inkubirana 30 minuta sa rastvaračem (smješa vode i etanola).

Po završetku inkubacije rastuće koncentracije $BaCl_2$ (0,01 – 30 mmol/L) dodavane su kumulativno, na način da se sljedeća koncentracija dodaje tek onda kada efekat prethodne koncentracije postigne plato. U odsustvu Ca^{2+} jona, Ba^{+} joni prolaze kroz L-tipa VGCC i dovode do nastanka kontrakcije, što omogućuje ispitivanje uloge ovih kanala. NCP je dobro poznati blokator L-tipa VGCC i u ovom protokolu se koristio kao pozitivna kontrola za poređenje inhibitornog efekta karvakrola na L-tip VGCC. Poređenjem krivi koncentracija-odgovor $BaCl_2$ dobijenih u prisustvu dvije različite koncentracije karvakrola, rastvarača ili NCP-a omogućila je procjenu uloge L-tipa VGCC u mehanizmu dejstva karvakrola.

Druga serija eksperimenata sprovedena je u Krebs–Ringer bikarbonatnom medijumu, gdje su preparati nakon pripreme takođe bili podijeljeni u četiri grupe:

- Prva grupa je inkubirana 30 minuta sa 0,3 mmol/L karvakrola,
- Druga grupa je inkubirana 30 minuta sa 1 mmol/L karvakrola,
- Treća grupa je inkubirana 30 minuta sa 10 μ mol/L NCP,
- Četvrta grupa je inkubirana 30 minuta sa rastvaračem (smješa vode i etanola).

Nakon završetka inkubacije, kumulativno rastuće koncentracije BAY K 8644 (0,1 – 30 $\mu\text{mol/L}$), koji je selektivni aktivator L-tipa VGCC, su dodavane u medijum na način da se sledeća koncentracija dodaje onda kada se postigne plato efekta prethodne koncentracije. Krive koncentracija-odgovor za BAY K 8644, u prisustvu dvije različite koncentracije karvakrola, NCP-a ili rastvarača, međusobno su upoređene.

4.1.5.6 Sedmi protokol – ispitivanje uloge TRPA1 kanala u vazodilatatornom efektu karvakrola

Uloga TRPA1 kanala u mehanizmu vazorelaksantnog dejstva karvakrola na HMA, ispitivana je primjenom neselektivnog (IPP) i selektivnog (A-967079) antagoniste ovih kanala. Nakon što su preparati izloženi optimalnim eksperimentalnim uslovima, inkubirani su 30 minuta sa 10 $\mu\text{mol/L}$ IPP ili sa 1 $\mu\text{mol/L}$ A967079, a zatim su prekontrahovani sa 1 $\mu\text{mol/L}$ PE-a. Karvakrol je dodavan u kumulativnim rastućim koncentracijama (1 – 3000 $\mu\text{mol/L}$), a svaka sljedeća koncentracija je dodavana tek kada prethodna koncentracija postigne *steady state*. Radi procjene značaja TRPA1 kanala u mehanizmu dejstva, kontrolna kriva koncentracija-odgovor za karvakrol je upoređena sa krivama dobijenim u prisustvu antagonista.

4.1.6 Etičko odobrenje

Sakupljanje uzoraka i sprovođenje eksperimenata na izolovanim humanim umbilikalnim i mezenteričnim arterijama odobreno je od strane Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske (Broj rješenja: 01-19-491-2/23).

4.1.7 Statistička analiza

Statistička analiza sprovedena je u programu SigmaPlot 14.0, dok su dijagrami i grafikoni ilustrovani pomoću programa GraphPad Prism 6.0. U statističkoj obradi podataka korištena je dvosmjerna analiza varijacije (eng. *two-way analysis of variance*, *two-way ANOVA*). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška srednje vrijednosti (eng. *Standard Error of*

Mean, SEM) i smatrani su statistički značajnim ukoliko je vjerovatnoća nulte hipoteze bila manja od 5 % ($p < 0,05$).

4.2 *In silico* eksperimenti

4.2.1 Kompjuterski programi

- ChemDrawUltra 7.0.0 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, SAD, 2002)
- Chem3DUltra 7.0.0 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, SAD, 2002)
- Gaussian 98 (Revision A.7) (Gaussian, Inc., Pittsburgh, SAD 1998)
- MarvinSketch 15.9.21.0 (ChemAxon, Budimpešta, Mađarska 2015)
- Pentacle 1.0.7 (Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italija 2013)
- ADMET Predictor 6.5 (Simulations Plus, Inc., Lancaster, SAD 2013)
- AutoDockTools4 (The Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA 1989)
- Discovery Studio Visualizer 4.1.0.14169; Accelrys Inc.: San Diego, CA, USA, 2014.
- YASARA Structure v.20.12.24.2.64 software

4.2.2 Kreiranje i validacija 3D-QSAR modela i određivanje domena primjenjivosti

Prvi korak na početku QSAR analize predstavlja odabir hemijskih jedinjenja čiju strukturu i aktivnost želimo ispitivati. Pored literature, najveći izvor podataka o jedinjenjima i njihovoj strukturi i aktivnosti može se pronaći u hemijskim bazama podataka kao što je ChEMBL. U bazi podataka ChEMBL pronađeno je 29 jedinjenja slične i jednostavne hemijske strukture koja ispoljavaju aktivnost prema TRPA1 kanalima. Odabrane molekule predstavljaju eksperimentalni *data set*. Kao ulazni kriterijum potrebno je da je aktivnost jedinjenja određena na osnovu mjerenja influksa Ca^{2+} jona fluorescentnim testom prilikom aktivacije humanih TRPA1 kanala ispoljenih na HEK293 ćelijskoj liniji. Aktivnost je izražena kao EC_{50} vrijednost, a za potrebe 3D-QSAR modelovanja izračunat je negativni dekadni logoritam EC_{50} vrijednosti, čime se dobijaju pEC_{50}

vrijednosti kao zavisne varijable. Ukupan broj jedinjenja je nasumično podijeljen na trening set (20 jedinjenja) i test set (9 jedinjenja). Trening set se koristio prilikom kreiranja samog modela, dok je test set korišten za eksternu validaciju kreiranog modela. Pomoću programa MarvinSketch 15.9.21.0. određen je dominantni oblik za sva jedinjenja pri fiziološkoj pH vrijednosti, pri čemu se samo jedno jedinjenje nalazi u jonizovanom obliku. 3D struktura dominantnih oblika jedinjenja je kreirana u programu Chem3DUltra 7.0.0 dok je energetska minimizacija kreiranih struktura izvršena pomoću Gaussian softvera u sklopu ovog programa. Za minimizaciju energije prvo je korištena semiempirijska PM3 metoda, a zatim je energija jedinjenja dodatno minimizirana preciznijom Hartree-Fock/3-21G metodom.^{157,158} Kreiranje QSAR modela urađeno je u programu Pentacle, koji koristi deskriptore nezavisne od poravnanja (eng. *Grid-Independent Descriptors*, GRIND) dobijenih iz molekulskih polja interakcija. Za proračun molekulskih polja interakcija korištene su 4 različite probe: DRY proba (hidrofobne interakcije), O proba (akceptor vodoničnih veza), N1 proba (donor vodoničnih veza) i TIP proba (sterne interakcije).¹³⁵ Nakon toga su izdvojeni čvorni regioni (povoljna interakcija između receptora i liganda) pomoću ALMOND algoritma. GRIND deskriptori izračunati su pomoću algoritma dosledno velike auto i unakrsne korelacije (eng. *Consistently Large Auto and Cross Correlation*, CLACC), a vrijednosti su predstavljene u obliku korelograma, gdje svaki pik predstavlja jednu varijablu (interakciju između dva čvorna regiona). Selekcija najkorisnijih varijabli izvršena je upotrebom frakcionog faktorskog dizajna (eng. *Fractional Factorial Design*, FFD). Postupak je ponavljan sve dok se nisu dobile najbolje vrijednosti parametara interne validacije. PLS regresionom metodom analiziran je odnos dobijenih varijabli i aktivnosti (pEC_{50}). Maksimalan broj latentnih varijabli (LV) podešen je na 5, a zatim je odabran model sa optimalnim brojem LV.

Nakon kreiranja 3D-QSAR modela odrađena je interna i eksterna validacija istog. Parametri interne validacije izračunati korištenjem molekula iz trening seta treba da imaju zadovoljavajuće vrijednosti (R^2 što je moguće bliže vrijednosti 1, dok Q^2 treba da ima vrijednost $> 0,5$). Q^2 se računa po principu LOO na način da se kreira novi model, tako što se izostavi jedno jedinjenje, a zatim se novi model koristi da se predvidi aktivnost izostavljenog jedinjenja. Razlike između predviđenih i stvarnih aktivnosti svih jedinjenja iz trening seta korištene su da bi se izračunala predviđena rezidualna suma kvadrata ili PRESS (eng. *Predicted Residual Sum of Squares*), a pomoću nje dalje se izračunavaju Q^2 i RMSE (eng. *Root-mean-square error*).

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{PRESS}{n}}$$

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum(Y_{obs}(training) - \bar{Y}_{training})^2}$$

Da bi se model smatrao pouzdanim, neophodna je i eksterna validacija pomoću molekula iz test seta. Vrijednosti parametara eksterne validacije takođe moraju da budu zadovoljavajuće (R_{pred}^2 , r_m^2 , $r_m'^2$, $\bar{r}_m^2 > 0,5$ i $\Delta r_m^2 < 0,2$).

$$R_{pred}^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs}(test) - \bar{Y}_{pred}(test))^2}{\sum(Y_{obs}(test) - \bar{Y}_{training})^2}$$

Domen primjenjivosti predstavlja teorijski prostor definisan vrijednostima deskriptora i prirodom jedinjenja iz trening seta, unutar kojeg QSAR model može pouzdano predvidjeti biološke ili hemijske odgovore, ograničavajući tako njegovu primjenu na jedinjenja koja pripadaju tom prostoru.^{159,160}

Najčešći pristupi koji se koriste za definisanje domena primjenjivosti jesu:

1. pristup zasnovan na rasponima vrijednosti molekulskih deskriptora,
2. geometrijske metode,
3. metode zasnovane na udaljenosti od modela,
4. funkcija gustine vjerovatnoće i
5. pristup zasnovan na rasponima vrijednosti modelovanog odgovora.

Koristeći pristup standardizacije Roy i saradnici su razvili alat za određivanje domena primjenjivosti koji je javno dostupan.¹⁶¹

4.2.3 Molekulski doking

Poznavanje strukture liganda i proteina i njihova priprema neophodna je prije početka molekulskog dokinga. Struktura proteina može biti modelovana, a moguće je i preuzeti poznatu strukturu proteina iz neke od baza podataka. U PDB bazi podataka preuzeta je cryo-EM struktura

TRPA1 receptora u kompleksu sa ligandom. U programu AutoDockTools 1.5.6 dodani su polarni vodonici i naelektrisanja na strukturu liganda, a takođe su podešene i odgovarajuće torzije. Protein je pripremljen u istom programu na način da su dodani polarni vodonici i naelektrisanja i da su uklonjeni molekuli vode. Kokristalizovani ligand je postavljen u centar tzv. *grid box*-a na mjestu vezivanja liganda za protein i kreiran je doking *grid*, čije se tačke nalaze na razmaku od 1 Å. Zabilježene su koordinate kokristalizovanog liganda na veznom mjestu, koje su dalje korištene tokom dokovanja ispitivanih molekula. Ispitivane molekule su prije početka molekulskog dokinga pripremljene na isti način kao i kokristalizovani ligand. Da bi se molekulski doking mogao smatrati pouzdanim, neophodna je njegova validacija. Određivanje vrijednosti srednjeg kvadratnog korijena devijacije ili RMSD urađeno je u programu Discovery Studio Visualizer v4.1 poređenjem izračunate konformacije liganda sa njegovom preuzetom konformacijom iz kokristalizovanog kompleksa sa proteinom. Vrijednost RMSD parametra mora da bude manja od 2 Å, da bi model bio validan. Vizuelni prikaz interakcija molekula sa specifičnim aminokiselinama na veznom mjestu proteina urađen je takođe u programu Discovery Studio Visualizer v4.1.

4.2.4 Molekulska dinamika

Molekulska dinamika se nastavlja na molekulski doking, u kojem su određeni najstabilniji kompleksi protein–karvakrol i protein–novodizajnirani agonist TRPA1 receptora. Za sprovođenje simulacije korišten je program YASARA Structure v.20.12.24.2.64, gdje su optimizovane vodonične veze i pKa vrijednosti za zadatu pH vrijednost (7,4). Simulacija je snimana u trajanju od 50 ns koristeći AMBER 14 silno polje, a eksperimentalni uslovi za temperaturu i pritisak bili su 298 K i jedna atmosfera. Tri validaciona parametra su određena: ukupna potencijalna energija snimanog sistema, radijus rotacije i RMSD vrijednost promjena konformacije liganda tokom simulacije.

4.2.5 ADMET predikcija

Da bi se odredile ADMET karakteristike koje bi mogle predstavljati ograničavajući faktor u daljem razvoju novih molekula korišten je program ADMET Predictor (TM) 11.0, 64-bit (pristupljeno preko *cloud-a*). 2D strukture karvakrola i novodizajniranih jedinjenja u obliku .mol fajla su učitane u program, čije je predviđanje ADMET karakteristika koncipirano na različitim QSAR modelima. Predviđeni su ukupni rizici za apsorpciju i distribuciju, mutagenost i toksikološki rizik, kao i da li su novi molekuli odgovarajući supstrati za CYP porodicu enzima.

5 REZULTATI

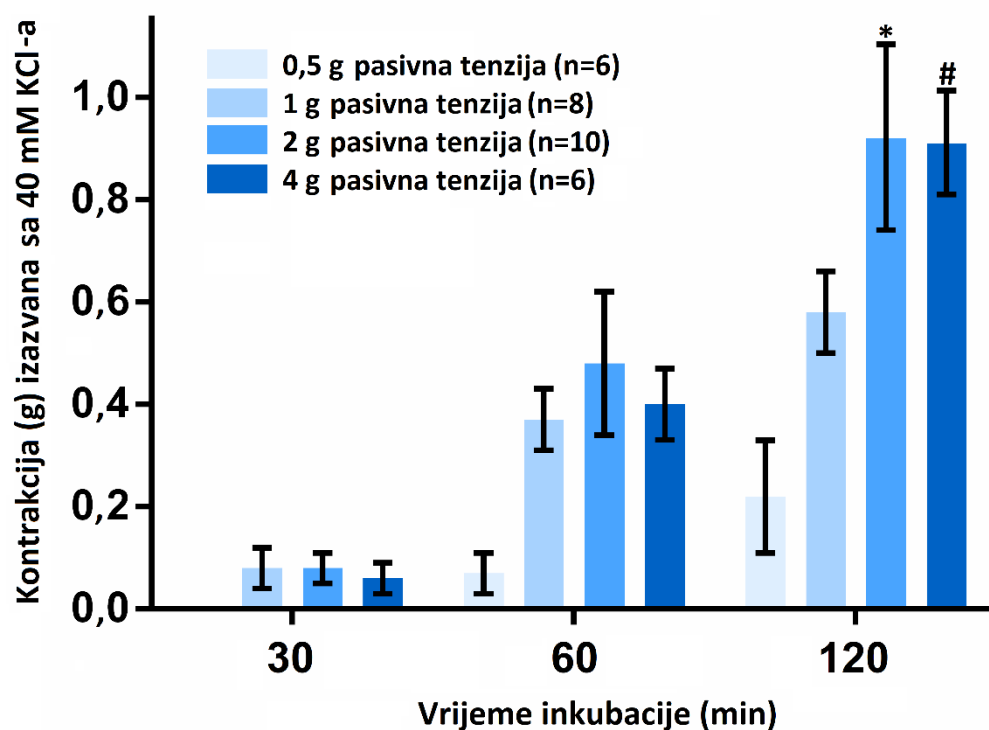
5.1 Rezultati *in vitro* ispitivanja na izolovanim humanim arterijama

5.1.1 Rezultati određivanja optimalnih eksperimentalnih uslova za sprovođenje studija vazoaktivnosti na humanim krvnim sudovima metodologijom kupatila za izolovana tkiva

Preparati HUA pokazali su različite odgovore na izazivanje kontrakcije sa 40 mM KCl pri drugačijim silama zatezanja preparata i periodima inkubacije. Oni preparati koji su bili zategnuti na 0,5 g pasivne tenzije i inkubirani 30 minuta nisu pokazali nikakav odgovor na KCl, dok s druge strane preparati koji su bili zategnuti 1, 2 ili 4 g pasivne tenzije, pokazali su veoma slabe kontrakcije nakon 30 minuta inkubacije. Sa produženjem vremena inkubacije na 60 minuta, svi uzorci su pokazali jače kontrakcije u poređenju sa onima koje su zabilježene nakon inkubacije od 30 minuta. Preparati koji su bili zategnuti na pasivnu tenziju od 1, 2, ili 4 g, dali su jače kontrakcije u odnosu na preparate koji su bili zategnuti na 0,5 g, ali je statistička značajnost potvrđena samo za grupu preparata koja je imala pasivnu tenziju od 2 g. Dalje produžavanje vremena inkubacije na 120 minuta rezultovalo je značajnim povećanjem kontrakcija za preparate čija je pasivna tenzija bila 2 ili 4 g. Međutim, dodatno povećanje sile zatezanja rastezanja sa 2 g na 4 g nije bilo praćeno jačom kontrakcijom, kao što bi se očekivalo (Slika 11). Na osnovu dobijenih rezultata određeno je da su zatezanje na pasivnu tenziju od 2 g i inkubacija u trajanju od 120 minuta optimalni eksperimentalni uslovi za sprovođenje eksperimenata na izolovanim humanim arterijama.

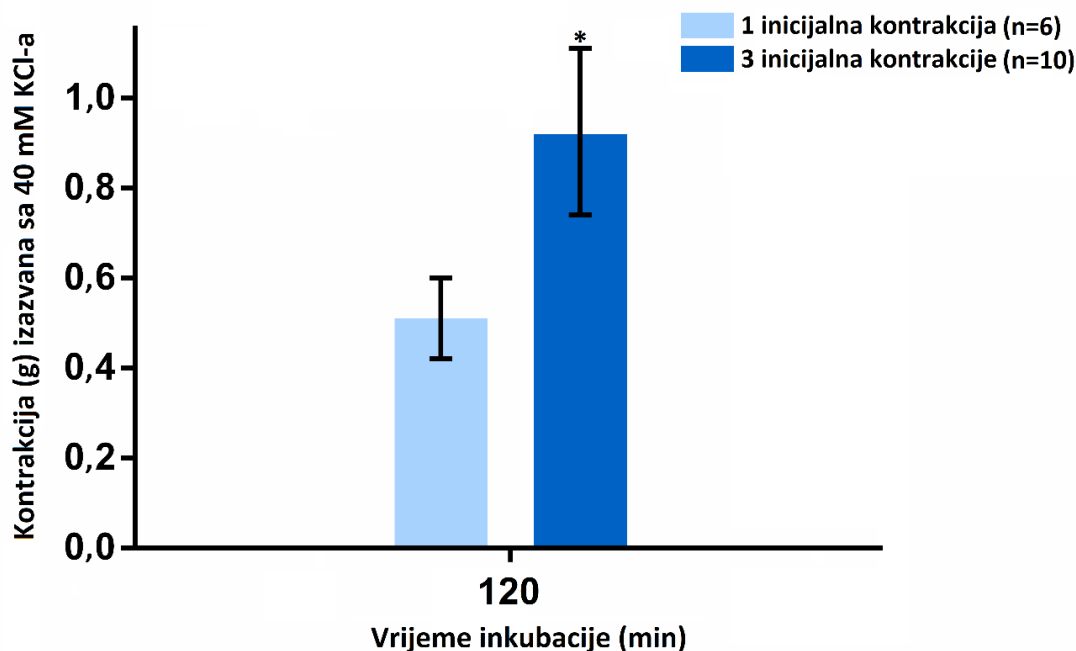
Vazoaktivni odgovor preparata na kontrakciju indukovanu sa 40 mM KCl bio je značajno snažniji kada su preparati bili prethodno izloženi pobuđivanju kontraktilne mašinerije u odnosu na preparate koji nisu. Upoređivanje kontrakcije preparata izazvanih KCl-om nakon 120 minuta, pokazalo je bolji odgovor kada su isti već prethodno bili kontrahovani sa KCl-om u dvije vremenske tačke (30 i 60 minuta) u odnosu na preparate koji su kontrahovani samo nakon 120 minuta (Slika 12). Ovi rezultati ukazuju da je za optimalni odgovor preparata izolovanih humanih arterija neophodno pokrenuti procese uključene u regulaciju vazoaktivnosti, na način da se

iniciraju tri kontrakcije (u vremenskim tačkama 30, 60 i 120 minuta) tokom trajanja inkubacionog perioda od 120 minuta.



Slika 11. Poređenje KCl-indukovanih kontrakcija pri različitim silama zatezanja i vremenskim periodima inkubacije.

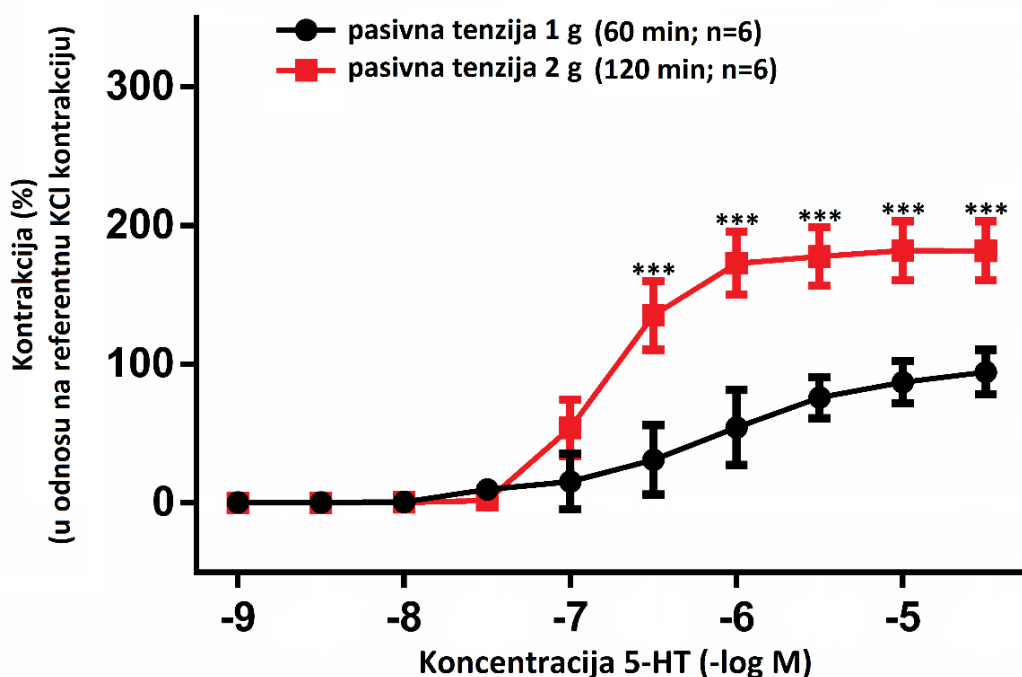
Preparati su bili podešeni na: 0,5 g (n = 6), 1 g (n = 8), 2 g (n = 10) ili 4 g (n = 6), a svaka grupa je bila inkubirana 30 minuta, 60 minuta i 120 minuta. Rezultati (srednja vrijednost $\pm$ SEM) su izraženi u gramima KCl-indukovane kontrakcije. * $p < 0,05$ (2 g u poređenju sa 0,5 g); # $p < 0,05$ (4 g u poređenju sa 0,5 g).



Slika 12. Poređenje KCl-indukovanih kontrakcija nakon jedne i tri inicijalne kontrakcije.

Jedna grupa preparata ($n = 10$) bila je kontrahovana sa tri inicijalne kontrakcije sa 40 mM KCl-om (30, 60 i 120 minuta), dok je druga grupa preparata ($n = 6$) kontrahovana samo jednom sa 40 mM KCl (120 minuta). Rezultati (srednja vrijednost $\pm$ SEM) su izraženi u gramima KCl-indukovane kontrakcije u vremenskoj tački 120 minuta. * $p < 0,05$.

Kontrakcije izazvane 5-HT-om na preparatima HUA koji su bili zategnuti na 2 g pasivne tenzije i inkubirani 120 minuta, bile su značajno jače u poređenju sa kontrakcijama koje su dobijene na preparatima koji su bili zategnuti na 1 g pasivne tenzije i inkubirani 60 minuta (Slika 13).

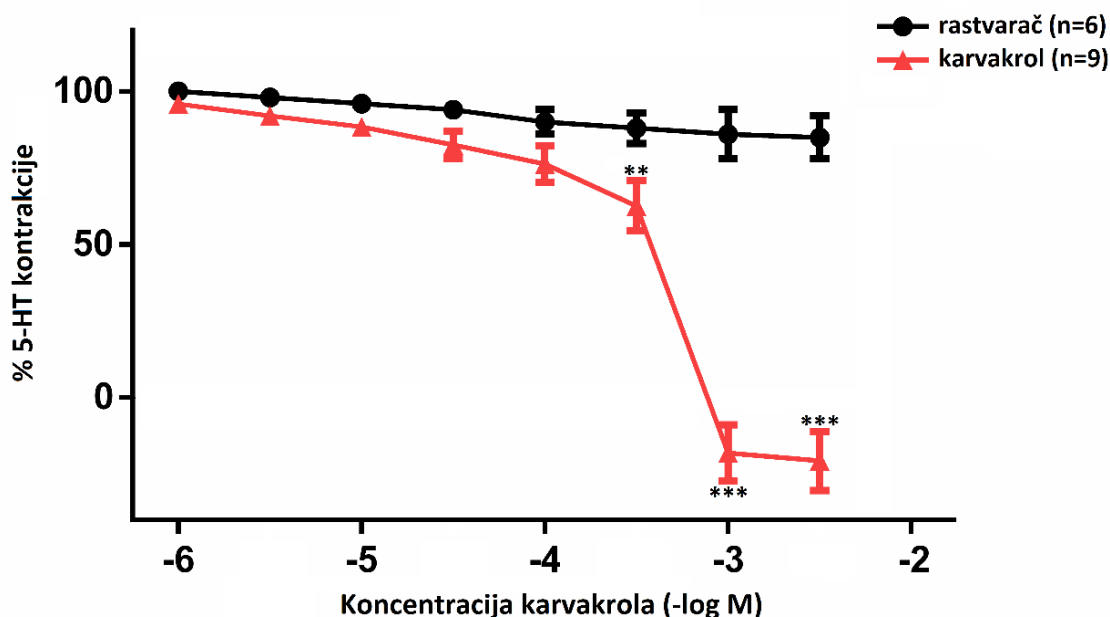


Slika 13. Kriva koncentracija-odgovor za 5-HT pri različitim eksperimentalnim uslovima.

Grafikon prikazuje kumulativnu kontrakciju HUA izazvanu 5-HT-om ($0,001 - 30 \mu\text{mol/L}$) nakon zatezanja preparata na 1 g pasivne tenzije i inkubacije 60 minuta ili nakon zatezanja preparata na 2 g pasivne tenzije i inkubacije od 120 minuta. Vrijednosti su izražene kao procenat u odnosu na referentnu kontrakciju izazvanu sa 40 mM KCl (srednja vrijednost $\pm$ SEM); *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu krivu 5-HT.

5.1.2 Rezultati za određivanje krive koncentracija-odgovor za karvakrol

U prvom setu eksperimenata, nakon kontrakcije izazvane sa $1 \mu\text{mol/L}$ 5-HT, karvakrol je dodavan u rastućim kumulativnim koncentracijama u rasponu od 1 do $3000 \mu\text{mol/L}$. Karvakrol je izazvao postepen pad vaskularnog tonusa, sve do koncentracije od 1 mmol/L , koja je proizvela značajnu vazorelaksaciju (Slika 14). Određena je EC_{50} vrijednost za vazorelaksantni efekat karvakrola, i ona je iznosila $442,13 \pm 33,8 \mu\text{mol/L}$ (srednja vrednost $\pm$ SEM). S obzirom da su najznačajniji efekti postignuti sa koncentracijama karvakrola od $300 \mu\text{mol/L}$ i 1 mmol/L , ove koncentracije su izabrane kao reprezentativne za dalja ispitivanja.

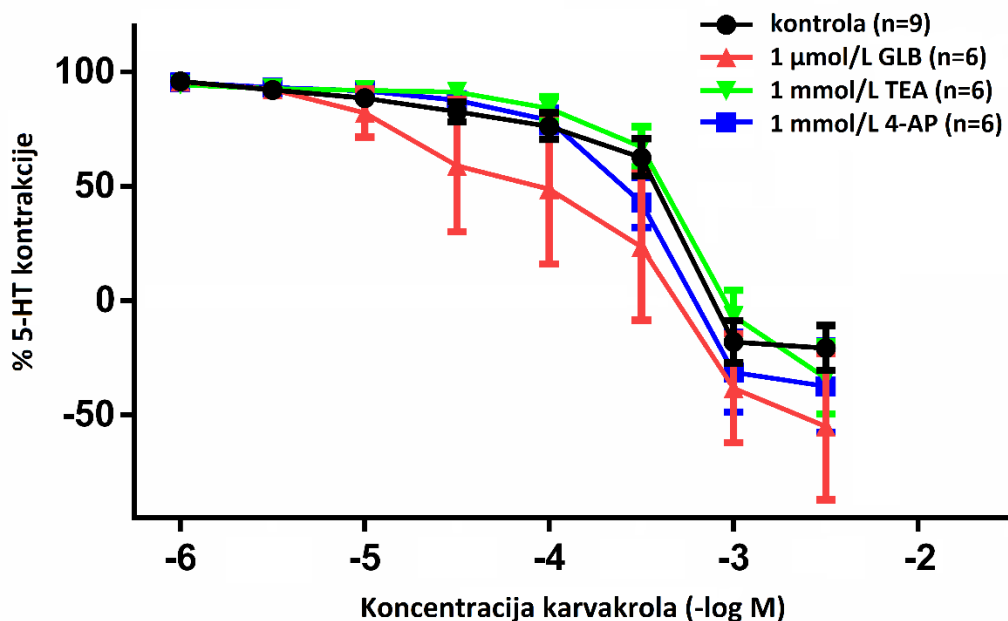


Slika 14. Kriva koncentracija-odgovor za karvakrol.

Grafikon prikazuje vazorelaksantni efekat karvakrola (1 – 3000 μ M) na HUA prethodno kontrahovanim sa 1 μ mol/L 5-HT. Vrijednosti su izražene kao procenat primarne kontrakcije izazvane 5-HT-om (srednja vrijednost $\pm$ SEM). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu krivu rastvarača.

5.1.3 Rezultati mjerenja vazorelaksantnog odgovora karvakrola u prisustvu različitih blokatora kalijumskih kanala

Blokatori različitih kalijumskih kanala, kao što su TEA, GLB i 4-AP, nisu pokazali značajnu promjenu u odgovoru prekontrahovanih preparata na vazodilataciju izazvanu karvakrolom (Slika 15). Pri poređenju EC_{50} vrijednosti, kao i pri poređenju maksimalnih efekata u prisustvu i odsustvu blokatora, nije pronađena statistička značajnost.

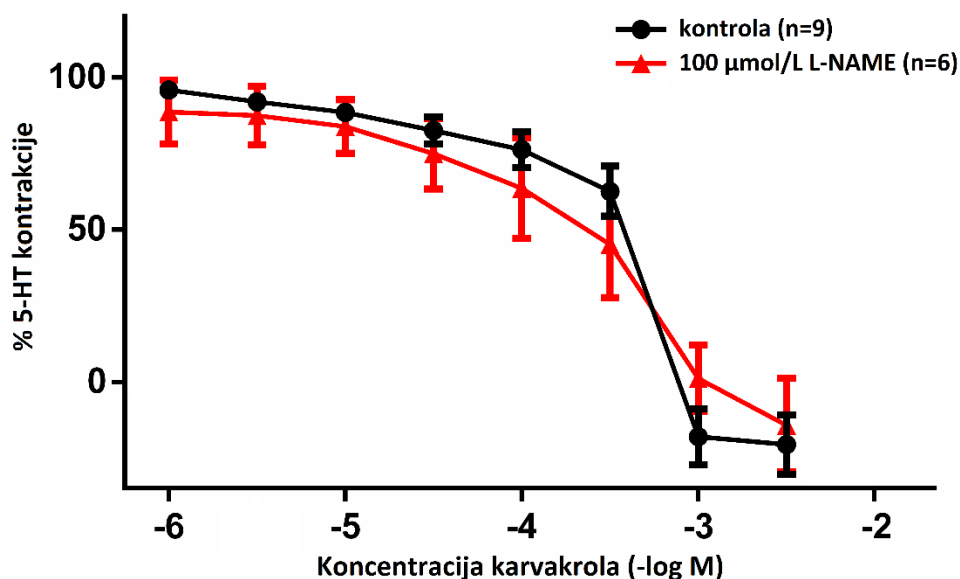


Slika 15. Krive koncentracija-odgovor karvakrola u prisustvu različitih blokatora kalijumskih kanala.

Grafikon prikazuje vazorelaksantni efekat karvakrola (1 – 3000 μmol/L) na HUA inkubiranim sa GLB (1 μmol/L), 4-AP (1 mmol/L) ili TEA (1 mmol/L) tokom 30 minuta i prekontrahovanih sa 1 μmol/L 5-HT. Vrijednosti su izražene kao procenat primarne kontrakcije izazvane 5-HT-om (srednja vrijednost ± SEM).

5.1.4 Rezultati mjerenja vazorelaksantnog odgovora karvakrola u prisustvu L-NAME (inhibitora enzima endotelne NO sintetaze)

Na Slici 16 predstavljen je uticaj inhibitora enzima eNO sintetaze na vazorelaksantni efekat karvakrola. Inkubacija preparata HUA 30 minuta sa L-NAME (N–nitro–L–arginin metilestar; inhibitor NO sintetaze) nije dovela do značajnih promjena u vazorelaksantnom efektu karvakrola na izolovane HUA (Slika 16). Nije bilo značajnosti u EC_{50} vrijednosti i maksimalnom efektu u poređenju sa kontrolnom krivom koncentracija-odgovor karvakrola.

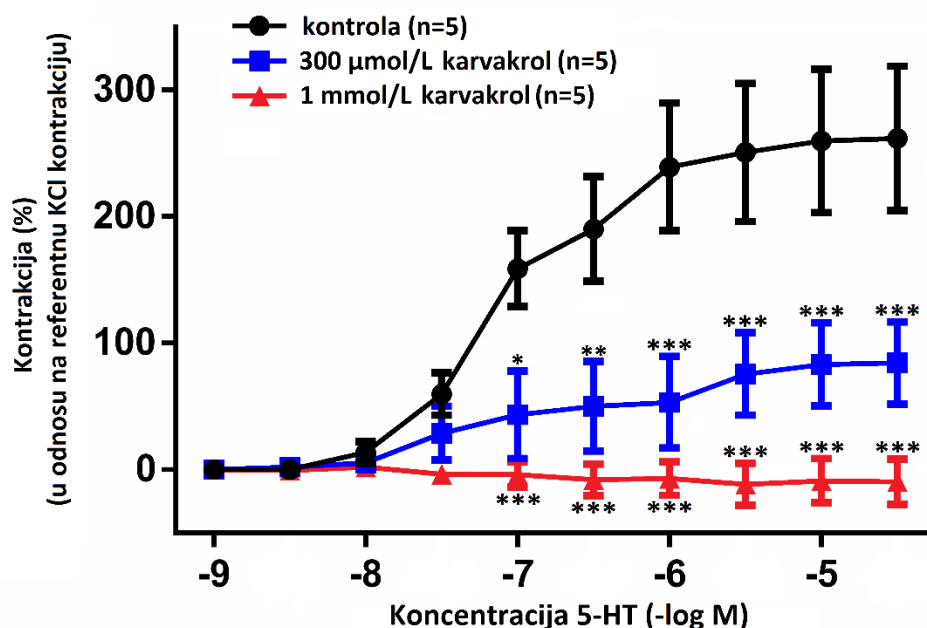


Slika 16. Kriva koncentracija-odgovor karvakrola u prisustvu L-NAME-a.

Grafikon prikazuje vazorelaksantni efekat karvakrola ($1 - 3000 \mu\text{mol/L}$) na HUA inkubiranim sa L-NAME ($100 \mu\text{mol/L}$), tokom 30 minuta i prekontrahovanih sa $1 \mu\text{mol/L}$ 5-HT. Vrijednosti su izražene kao procenat primarne kontrakcije izazvane 5-HT-om (srednja vrijednost $\pm$ SEM).

5.1.5 Rezultati mjerenja inhibitornog efekta karvakrola na izometrijsku kontrakciju izazvanu 5-HT-om

Kriva koncentracija-odgovor za 5-HT, dobijena dodavanjem kumulativnih koncentracija 5-HT ($0,001 - 30 \mu\text{mol/L}$), pokazala je značajan pad na niže vrijednosti kontrakcije, kada su preparatai HUA prethodno bili inkubirani sa karvakrolom (Slika 17). U prisustvu $0,3 \text{ mmol/L}$ karvakrola, statistička značajnost je zabilježena za poslednjih šest koncentracija. S druge strane, prisustvo 1 mmol/L karvakrola potpuno je spriječilo nastanak kontrakcije izazvane 5-HT-om, a primijećena je i značajna razlika između efekta dvije koncentracije karvakrola na kontrakciju posredovanu 5-HT-om.

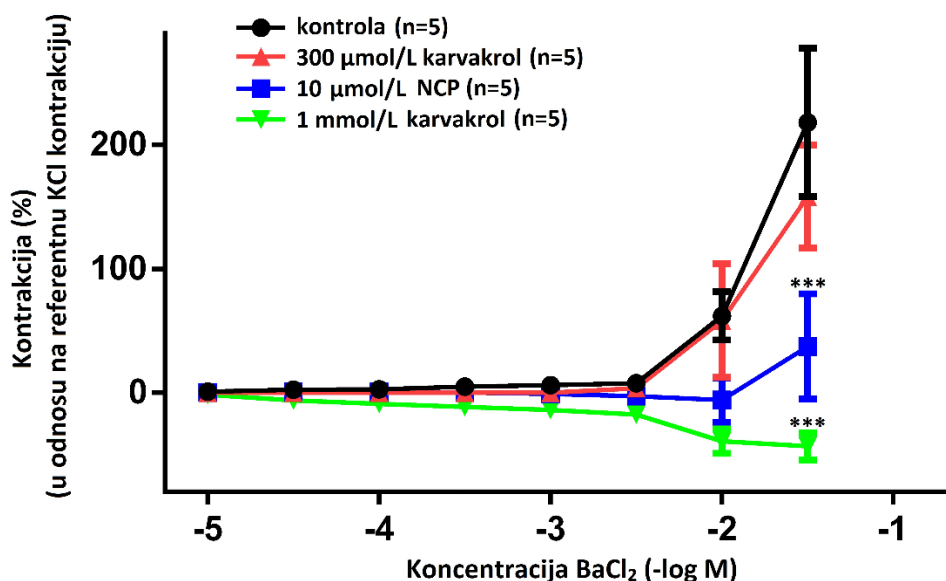


Slika 17. Kriva koncentracija-odgovor kontrakcije 5-HT u prisustvu karvakrola.

Grafikon prikazuje kumulativnu kontrakciju HUA izazvanu 5-HT-om (0,001 – 30 µmol/L) nakon inkubacije u rastvoru sa karvakrolom (300 µmol/L ili 1 mmol/L). Vrijednosti su izražene kao procenat u odnosu na referentnu kontrakciju izazvanu sa 40 mM KCl (srednja vrijednost ± SEM); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu krivu 5-HT.

5.1.6 Rezultati mjerenja inhibitornog efekta karvakrola na izometrijsku kontrakciju izazvanu BaCl₂-om u medijumu bez Ca²⁺ jona

Inkubacija HUA-a u Krebs–Ringer bikarbonatnom medijumu bez Ca²⁺ jona sa 300 µmol/L karvakrola nije pokazala značajnu promjenu u BaCl₂ koncentracijsko-zavisnoj kontrakcionoj krivoj u poređenju sa kontrolnom krivom (Slika 18). Efekat najviše koncentracije BaCl₂ (30 mmol/L) značajno je smanjen kada su preparati inkubirani 30 minuta sa NCP (10 µmol/L), koji je korišten kao pozitivna kontrola. Slično tome, prisustvo 1 mmol/L karvakrola je u potpunosti poništilo kontrakciju izazvanu BaCl₂, čak prouzrokujući pad vaskularnog tonusa ispod početne vrijednosti. Između efekta NCP-a i 1 mmol/L karvakrola na kontrakciju izazvanu BaCl₂, nije bilo značajnije razlike.

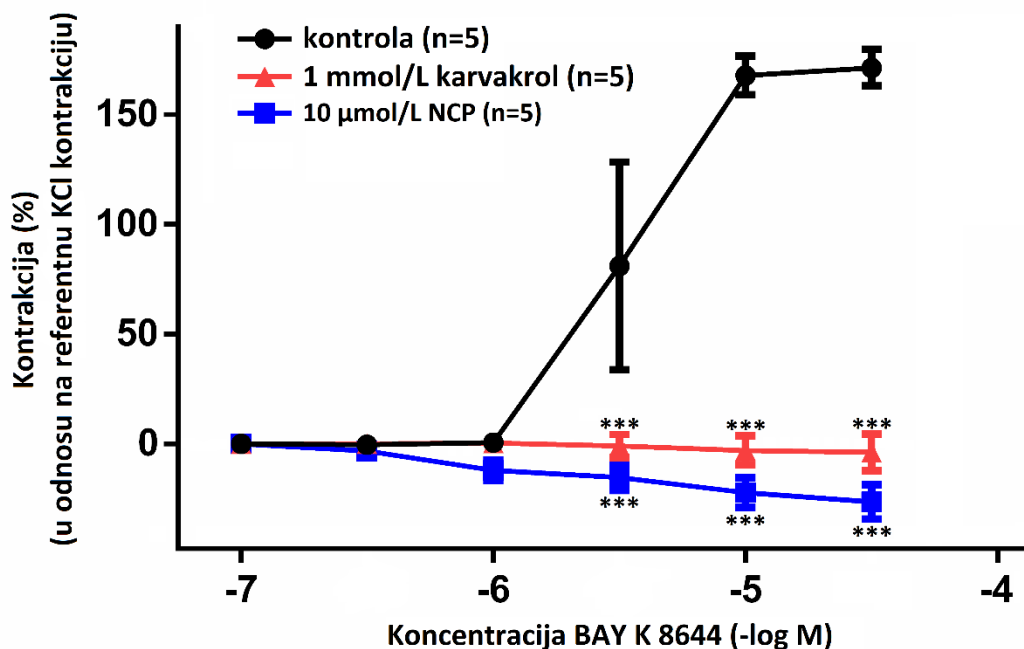


Slika 18. Kriva koncentracija-odgovor kontrakcije BaCl₂ u prisustvu karvakrola i NCP-a.

Grafikon prikazuje kumulativnu kontrakciju HUA izazvanu BaCl₂-om (10 – 30000 µmol/L) nakon inkubacije u rastvoru bez Ca²⁺ jona (pH = 7,4) sa karvakrolom (300 µmol/L ili 1 mmol/L) ili sa NCP-om (10 µmol/L). Vrijednosti su izražene kao procenat u odnosu na referentnu kontrakciju izazvanu sa 40 mM KCl (srednja vrijednost ± SEM); *** p < 0,001 u odnosu na kontrolnu krivu BaCl₂.

5.1.7 Rezultati mjerenja inhibitornog efekta karvakrola na izometrijsku kontrakciju izazvanu specifičnim agonistom L-tipa Ca²⁺ kanala (BAY K 8644)

Kada su HUA inkubirane 30 minuta sa dodatkom 1 mmol/L karvakrola u medijum, odgovor preparata na kontrakciju izazvanu BAY K 8644 bio je značajno umanjen. Sličan odgovor zabilježen je kada je u medijum bio inkubiran NCP, koji je korišten kao pozitivna kontrola (10 µmol/L). Upoređujući krive koncentracija-odgovor dobijene u prisustvu karvakrola ili NCP-a sa kontrolnom krivom za BAY K 8644, statistički značajna razlika je pronađena za tri najviše koncentracije (Slika 19).



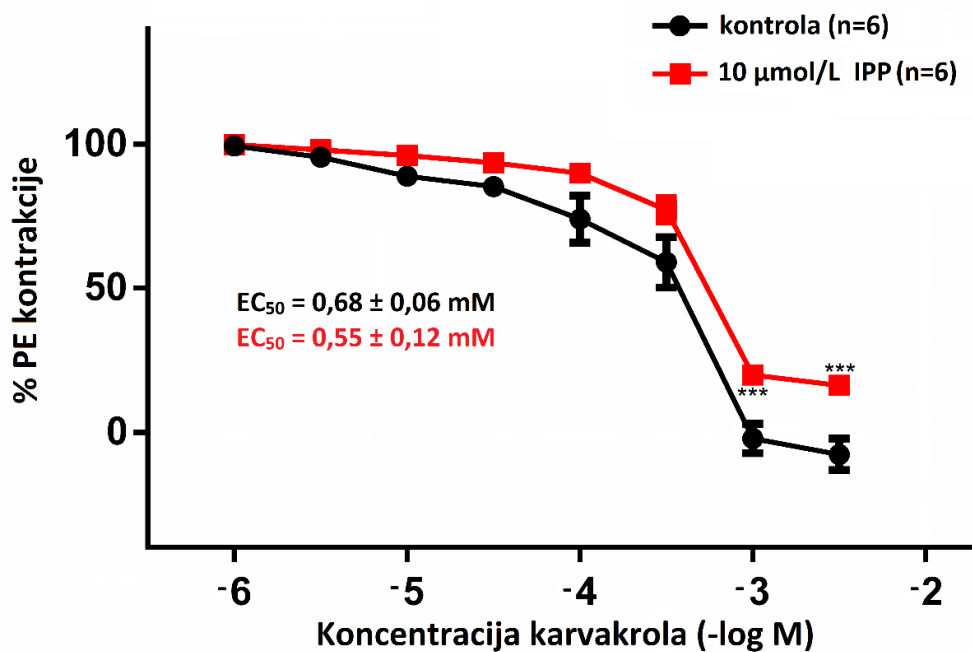
Slika 19. Kriva koncentracija-odgovor kontrakcije BAY K 8644 u prisustvu karvakraola i NCP-a.

Grafikon prikazuje kumulativnu kontrakciju HUA izazvanu BAY K 8644 (0,1 – 30 µmol/L) nakon inkubacije sa karvakraolom (1 mmol/L) ili sa NCP-om (10 µmol/L). Vrijednosti su izražene kao procenat u odnosu na referentnu kontrakciju izazvanu sa 40 mM KCl (srednja vrijednost ± SEM); *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu krivu BAY K 8644.

5.1.8 Rezultati mjerenja vazorelaksantnog odgovora karvakraola u prisustvu IPP ili A967079

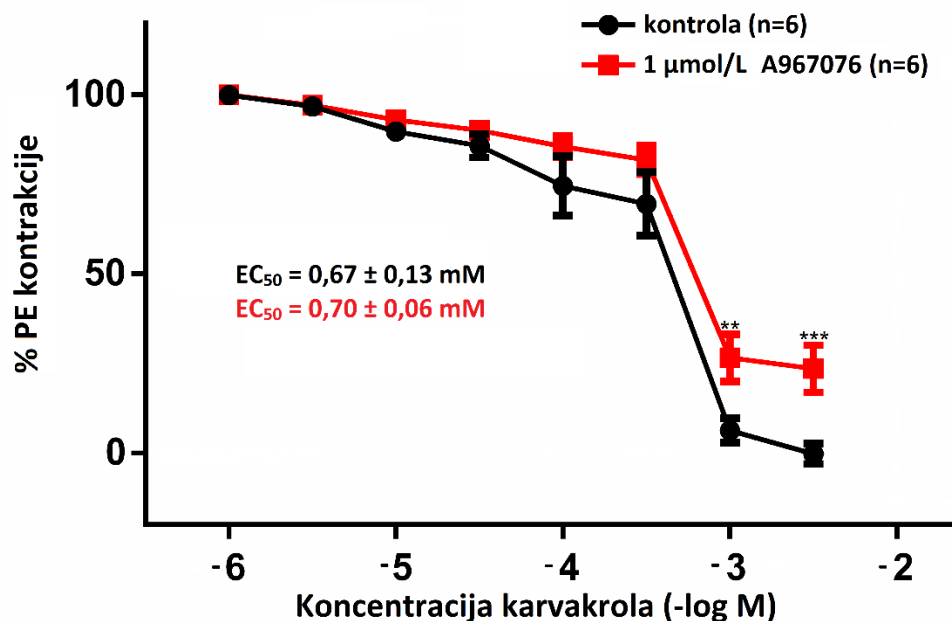
Nakon preinkubacije preparata HMA sa neselektivnim antagonistom TRPA1 kanala (10 µM IPP), maksimalni efekat vazorelaksacije izazvan sa 3 mM karvakraola smanjen je sa 107,6 % na 83,7 % (Slika 20). Slični rezultati su zabilježeni kada su preparati inkubirani 30 minuta sa selektivnim blokatorom TRPA1 kanala (1 µM A967079) (Slika 21). Maksimalni efekat karvakraola bio je značajno umanjen u prisustvu A967079 ili IPP, dok je njegova potentnost pokazala malu ili

nikakvu promjenu, što se vidi iz minimalnih razlika u EC_{50} vrijednostima. Iako je maksimalni efekat karvakrolom-indukovane vazodilatacije bio smanjen u prisustvu blokatora IPP ili A967079, karvakrol je i dalje izazvao vazorelaksaciju prekontrahovanih HMA pri visokim koncentracijama.



Slika 20. Kriva koncentracija-odgovor karvakrola u prisustvu IPP-a.

Grafikon prikazuje vazorelaksantni efekat karvakrola (1–3000 $\mu\text{mol/L}$) na HMA inkubiranih sa IPP-om (10 $\mu\text{mol/L}$), tokom 30 minuta i prekontrahovanih sa 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT. Vrijednosti su izražene kao procenat primarne kontrakcije izazvane 5-HT-om (srednja vrijednost $\pm$ SEM). *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu krivu karvakrola.



Slika 21. Kriva koncentracija-odgovor karvakrola u prisustvu A967076.

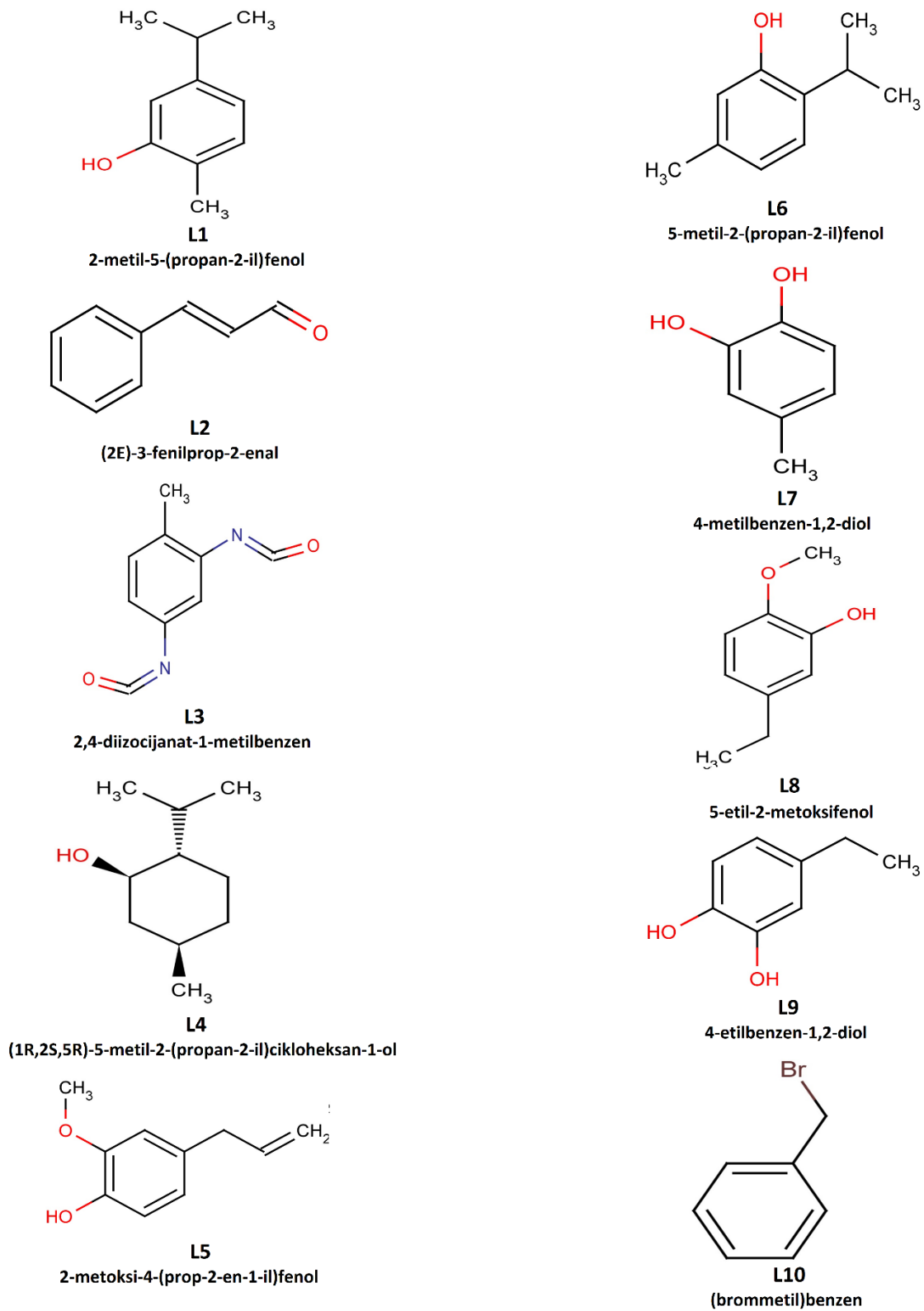
Grafikon prikazuje vazorelaksantni efekat karvakrola (1 – 3000 $\mu\text{mol/L}$) na HMA inkubiranih sa A967076 (1 $\mu\text{mol/L}$), tokom 30 minuta i prekontrahovanih sa 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT. Vrijednosti su izražene kao procenat primarne kontrakcije izazvane 5-HT-om (srednja vrijednost $\pm$ SEM). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu krivu karvakrola.

5.2 Rezultati *in silico* eksperimenata

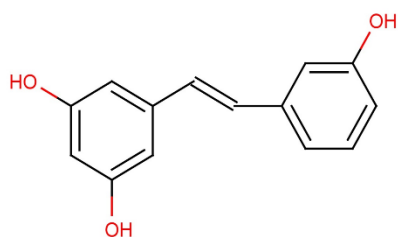
5.2.1 Rezultati 3D-QSAR studije na TRPA1 agonistima

Za sva jedinjenja koja su odabrana za dataset, prikupljeni su podaci o njihovoj eksperimentalnoj aktivnosti na humanim TRPA1 kanalima ispoljenim na ćelijskoj liniji HEK293. Pokriven je opseg aktivnosti od 3,83 do 5,06 logaritamskih jedinica. Odabrani dataset podijeljen je na trening set, koji je činilo 20 jedinjenja i test set koji je sačinjen od 9 jedinjenja koja su korištena za eksternu validaciju modela (Slike 22, 23, 24). Pouzdan 3D-QSAR model za predviđanje aktivnosti TRPA1 agonista kreiran je korištenjem molekula iz trening seta. U početku je čitav set GRIND varijabli korišten za izradu PLS modela kako bi se odredile značajne farmakofore. Da bi se dobio model koji nije previše prilagođen podacima (eng. *non-over-fitted*

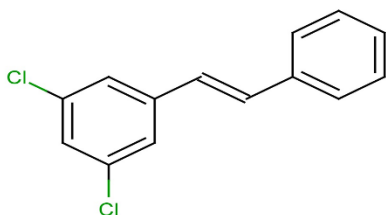
model), broj varijabli je smanjen korištenjem FFD algoritma. U Tabeli 3 može se vidjeti da vrijednosti parametara interne validacije ($R^2 = 0,83$ and $Q^2 = 0,59$), kao i vrijednosti parametara eksterne validacije ($R_{pred}^2 = 0,84$; $r_m^2 = 0,76$; $\bar{r}_m^2 = 0,61$; $r_m'^2 = 0,69$; $\Delta r_m^2 = 0,14$) ukazuju na dobru prediktivnu sposobnost kreiranog 3D-QSAR modela. Takođe je određen i domen primjenjivosti modela koji se računa pomoću vrijednosti deskriptora koji su odabrani za formiranje konačnog modela. Nakon izvršenih proračuna, ustanovljeno je da u trening setu nema autlajera i da jedinjenja iz test seta spadaju u domen primjenjivosti modela. Ovo ukazuje na to da kreirani model pouzdano predviđa aktivnosti jedinjenja iz test seta. Dobra prediktivna sposobnost kreiranog modela može se takođe primijetiti na grafiku eksperimentalnih naspram predviđenih vrijednosti, gdje ravnomjerna raspodjela pEC₅₀ vrednosti oko regresione krive ukazuje na blaga odstupanja između eksperimentalnih i predviđenih aktivnosti za sve jedinjenja u datasetu (Slika 25).



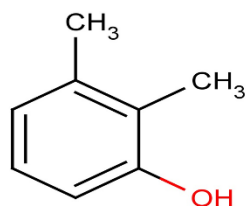
Slika 22. Hemijske strukture jedinjenja iz trening seta L1–L10.

**L11**

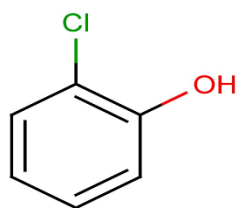
5-[(E)-2-(3-hidroksifenil)etenil]benzen-1,3-diol

**L12**

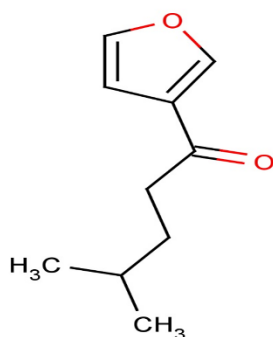
1,3-dihlor-5-[(E)-2-feniletetil]benzen

**L13**

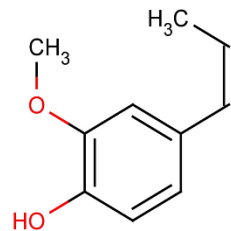
2,3-dimetilfenol

**L14**

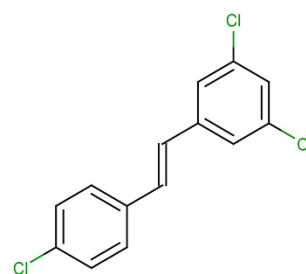
2-hlorfenol

**L15**

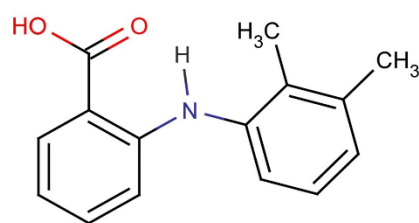
1-(furan-3-il)-4-metilpentan-1-on

**L16**

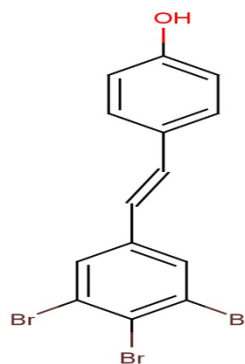
2-metoksi-4-[(1Z)-prop-1-en-1-il]fenol

**L17**

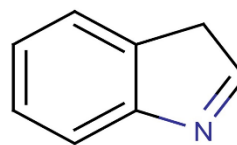
1,3-dihlor-5-[(E)-2-(4-hlorfenil)etenil]benzen

**L18**

2-[(2,3-dimetilfenil)amino]benzojeva kiselina

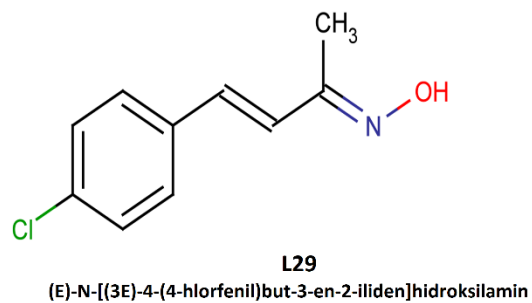
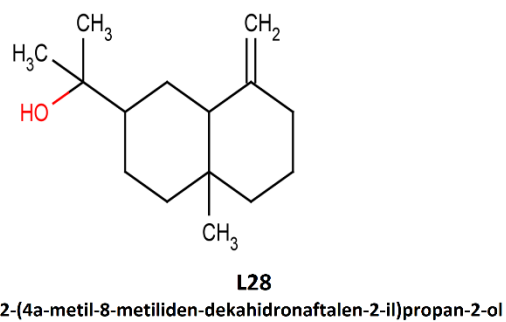
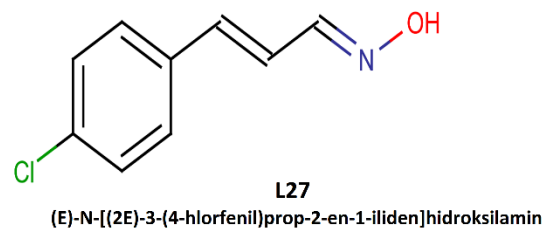
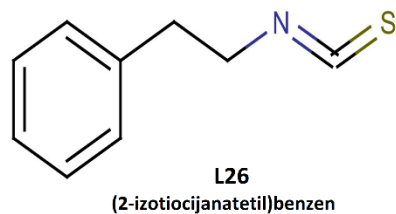
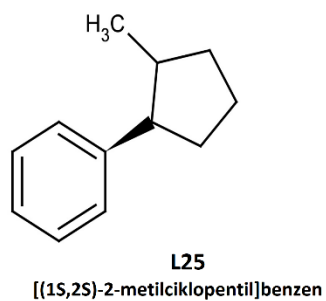
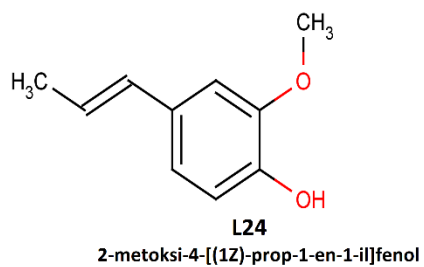
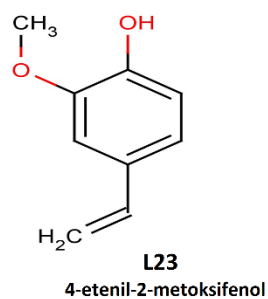
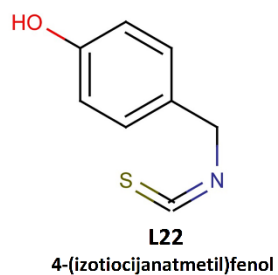
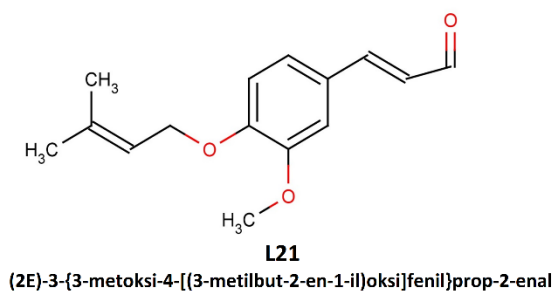
**L19**

4-[(E)-2-(3,4,5-tribromfenil)etenil]fenol

**L20**

3H-indol

Slika 23. Hemijske strukture jedinjenja iz trening seta L11–L20.

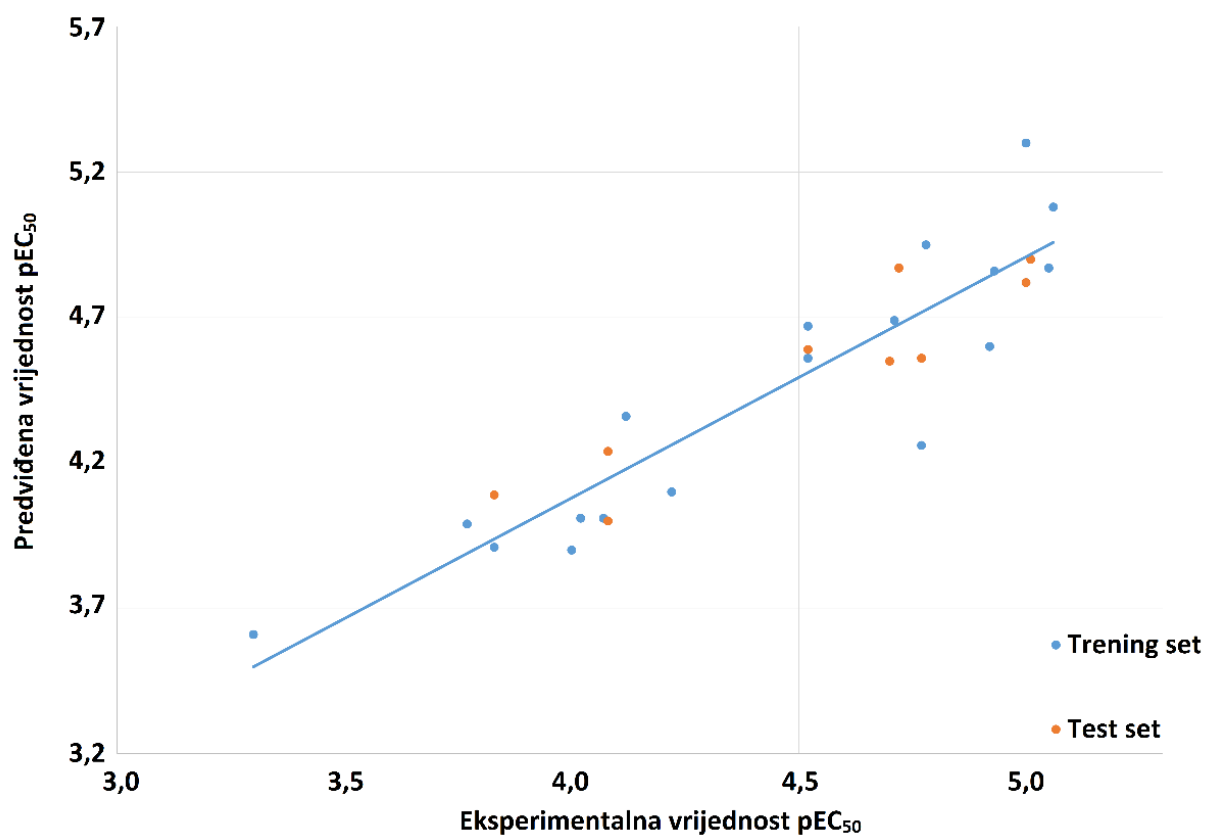


Slika 24. Hemijske strukture jedinjenja iz test seta L21–L29.

Tabela 3. Eksperimentalne i predviđene aktivnosti jedinjenja iz dataseta, kao i vrijednosti parametara interne i eksterne validacije.

Trening set					
Jedinjenja	Eksperimentalni pEC ₅₀	Predvideni pEC ₅₀	Jedinjenja	Eksperimentalni pEC ₅₀	Predvideni pEC ₅₀
L1	4,77	4,26	L12	4,52	4,59
L2	5,05	4,87	L13	4,07	4,01
L3	5,00	5,30	L14	3,30	3,61
L4	4,02	4,01	L15	4,71	4,69
L5	3,77	3,99	L16	3,83	3,91
L6	4,22	4,10	L17	4,52	4,56
L7	4,93	4,86	L18	4,78	4,95
L8	4,00	3,90	L19	5,00	4,82
L9	5,06	5,08	L20	4,12	4,36
L10	4,92	4,60	R² = 0,83 Q² = 0,59		
L11	4,52	4,67			
Test set					
Jedinjenja	Eksperimentalni pEC ₅₀	Predvideni pEC ₅₀	Jedinjenja	Eksperimentalni pEC ₅₀	Predvideni pEC ₅₀
L21	5,01	4,90	L27	4,72	4,87
L22	4,70	4,55	L28	4,08	4,00
L23	4,08	4,24	L29	4,52	4,59
L24	3,83	4,09	R²_{pred} = 0,84 RMSEP = 0,16		

L25	4,77	4,56	$r_m^2 = 0,76$	$r_m'^2 = 0,61$
L26	5,00	4,82	$\bar{r}_m^2 = 0,69$	$\Delta r_m^2 = 0,14$



Slika 25. Grafik eksperimentalnih u odnosu na predviđene vrijednosti pEC₅₀ za kreirani 3D-QSAR model.

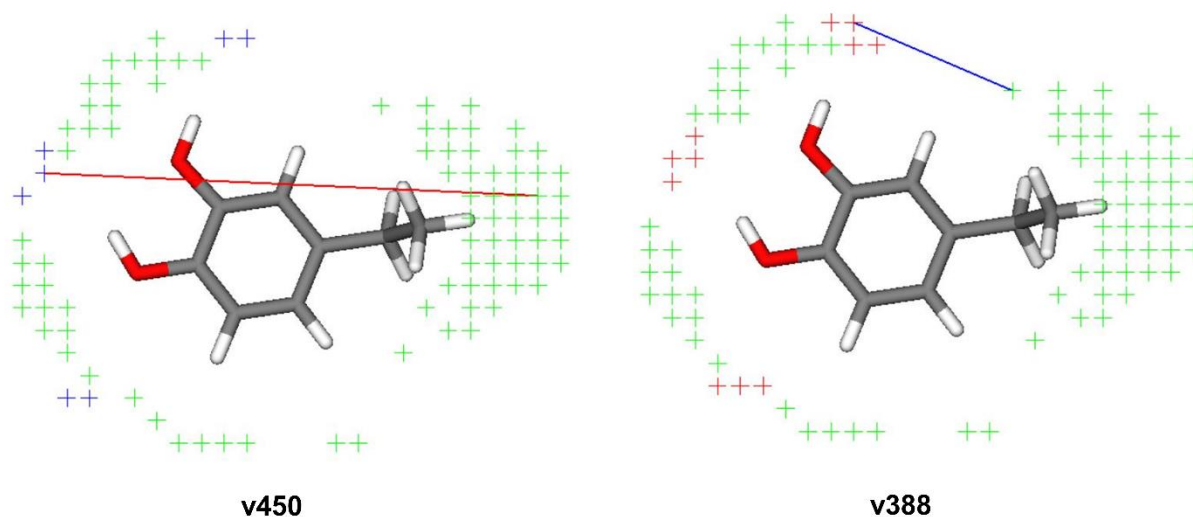
Najznačajnije GRIND varijable koje imaju pozitivan ili negativan uticaj na aktivnost prema TRPA1 kanalima prikazane sa detaljnim opisom u Tabeli 4.

Tabela 4. Najznačajnije GRIND varijable i njihov uticaj na aktivnost prema TRPA1 kanalima.

Variable	Par čvorova	Rastojanje [Å]	Uticaj	Opis
450	N1 - TIP	10,8 – 11,2	+	Rastojanje između akceptora vodonične veze i sternog regiona na benzenovom prstenu
397	O - TIP	8,4 – 8,8	-	Rastojanje između donora vodonične veze i sternog regiona na benzenovom prstenu
350	O - N1	8,4 – 8,8	+	Rastojanje između donora i akceptora vodonične veze na benzenovom prstenu
106	N1 - N1	4,8 – 5,2	+	Rastojanje između dva akceptora vodonične veze na benzenovom prstenu
115	N1 - N1	8,4 – 8,8	+	Rastojanje između dva akceptora vodonične veze na benzenovom prstenu
51	O - O	1,6 – 2,0	+	Rastojanje između dva donora vodonične veze na benzenovom prstenu
60	O - O	5,2 – 5,6	+	Rastojanje između dva donora vodonične veze na benzenovom prstenu
68	O - O	8,4 – 8,8	+	Rastojanje između dva donora vodonične veze na benzenovom prstenu
388	O - TIP	4,8 – 5,2	-	Rastojanje između donora vodonične veze i sternog regiona na benzenovom prstenu
406	O - TIP	12,0 – 12,4	-	Rastojanje između donora vodonične veze i sternog regiona na benzenovom prstenu

Kreirani 3D-QSAR model identifikovao je da rastojanje od 10,8 do 11,2 Å između akceptora vodonične veze i sternog regiona na benzenovom prstenu ima pozitivan uticaj na

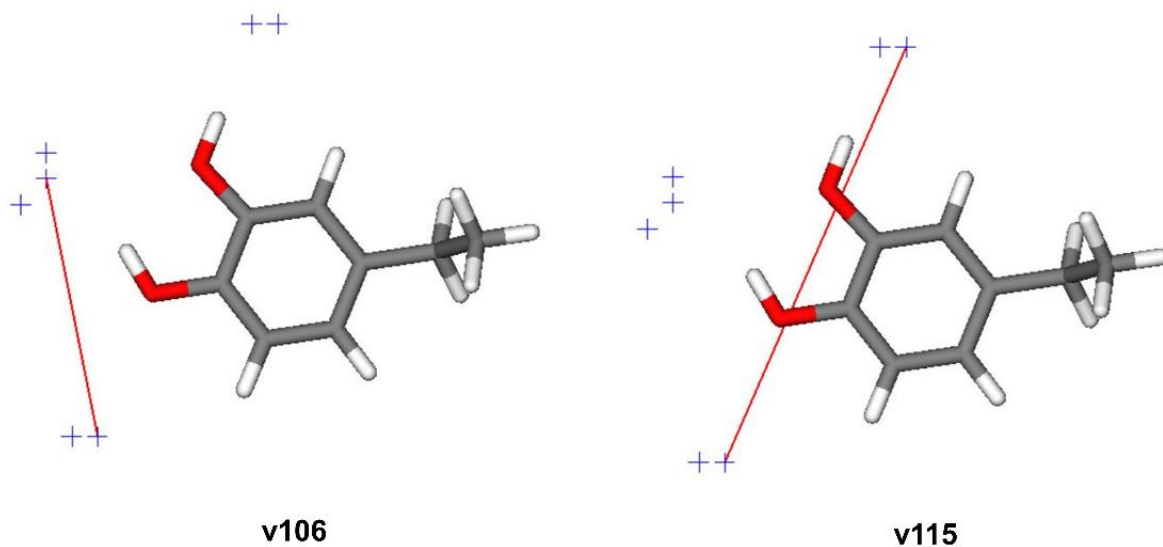
biološko dejstvo (Slika 26; v450; N1-TIP). Prema modelu, rastojanje od 4,8 do 5,2 Å između sternog regiona i donora vodonične veze imalo bi negativan uticaj na aktivnost (Slika 26; v388; O-TIP).



Slika 26. 3D-QSAR farmakoforni prikaz jedinjenja L9 (I dio).

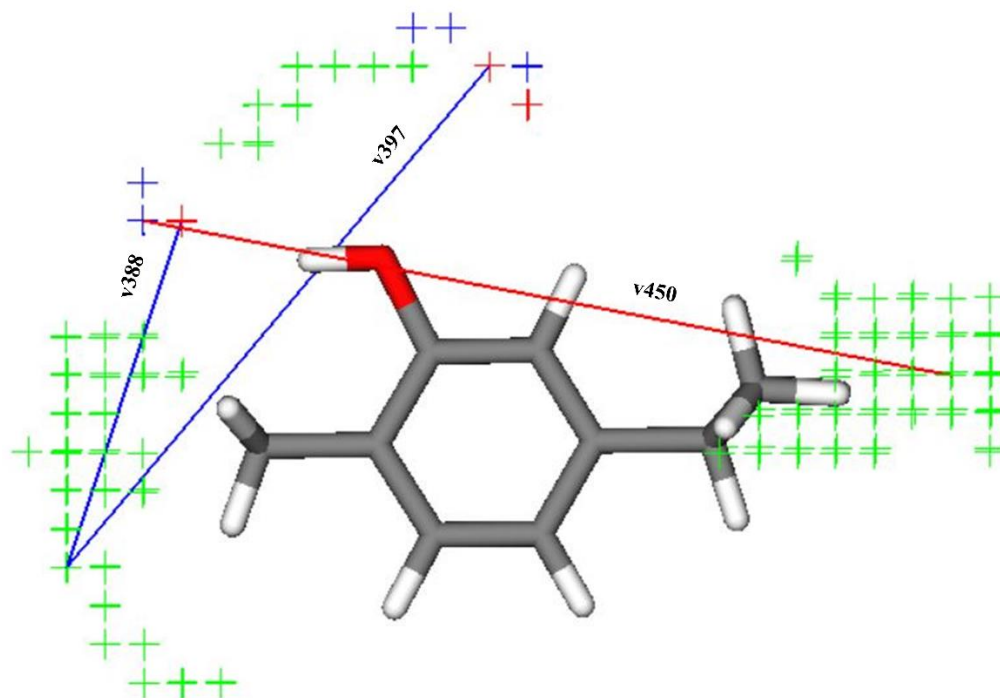
TIP-probe su prikazane u zelenom, O-probe su prikazane u crvenom, dok su N1-probe prikazane u plavom. Varijable sa pozitivnom interakcijom su prikazane kao crvene linije, dok su varijable sa negativnom interakcijom prikazane kao plave linije.

Na osnovu modela, rastojanje od 4,8 do 5,2 ili od 8,4 do 8,8 Å između dva akceptora vodoničnih veza pokazalo je značajan doprinos poboljšanju biološke aktivnosti (Slika 27; v106, v115; N1-N1).



Slika 27. 3D-QSAR farmakoforni prikaz jedinjenja L9 (II dio).

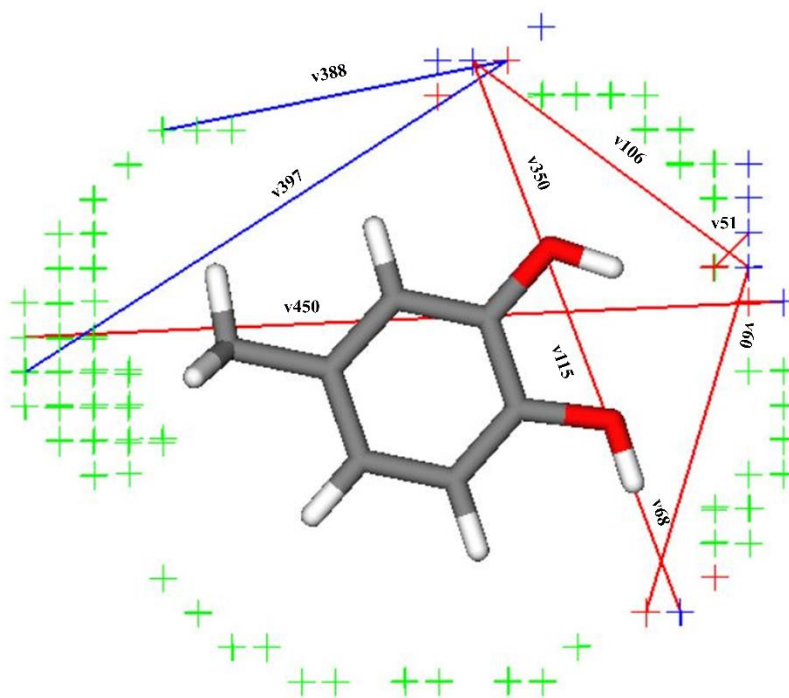
TIP-probe su prikazane u zelenom, O-probe su prikazane u crvenom, dok su N1-probe prikazane u plavom. Varijable sa pozitivnom interakcijom su prikazane kao crvene linije.



Slika 28. 3-D QSAR farmakoforni prikaz pozitivnih i negativnih varijabli na karvakrolu.

TIP-probe su prikazane u zelenom, O-probe su prikazane u crvenom, dok su N1-probe prikazane u plavom. Varijable sa pozitivnom interakcijom su prikazane kao crvene linije, dok su varijable sa negativnom interakcijom prikazane kao plave linije.

Prisustvo fenolne funkcionalne grupe u hemijskoj strukturi karvakrola ima pozitivan uticaj na biološku aktivnost ovog jedinjenja prema TRPA1 kanalima (Slika 28, v450). S druge strane, položaj između metil i fenolne grupe na strukturi karvakrola rezultuje negativnim varijablama kada su sterni region i donor vodonične veze na rastojanjima od 8,4 do 8,8 Å (v397) ili od 4,8 do 5,2 Å (v388).



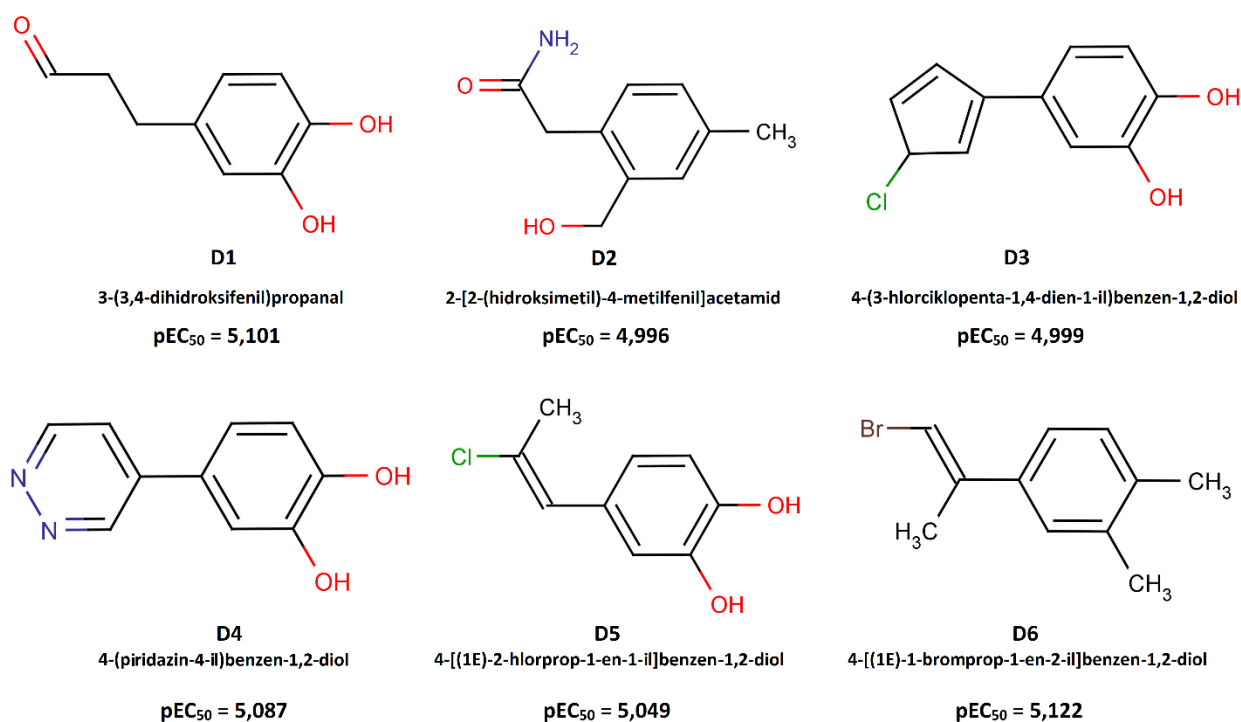
Slika 29. 3D-QSAR farmakoforni prikaz pozitivnih i negativnih varijabli na jedinjenju L7.

TIP-probe su prikazane u zelenom, O-probe su prikazane u crvenom, dok su N1-probe prikazane u plavom. Varijable sa pozitivnom interakcijom su prikazane kao crvene linije, dok su varijable sa negativnom interakcijom prikazane kao plave linije.

Prikaz i uticaj svih najznačajnijih varijabli opisanih u Tabeli 4, sa izuzetkom varijable v406, može se vidjeti na strukturi jedinjenja L7, koje je jedno od najaktivnijih jedinjenja u trening setu ($pEC_{50} = 4,93$) (Slika 29).

5.2.2 Rezultati dizajniranja novih jedinjenja

S obzirom da je karvakrol poznato jedinjenje koje djelimično ispoljava svoj vazorelaksantni efekat preko TRPA1 kanala ($pEC_{50} = 4,77$), izvršena je promjena njegove strukture u cilju dizajna novih TRPA1 agonista sa poboljšanom aktivnošću. Opisane interakcije korištene su kao vodič prilikom modifikacije strukture karvakrola u dizajnu novih jedinjenja. Dizajnirano je šest novih jedinjenja, za koja je potvrđena bolja aktivnost prema TRPA1 kanalima u poređenju sa karvakrolom (Slika 30).



Slika 30. Hemijske strukture dizajniranih jedinjenja.

5.2.3 Rezultati predviđanja ADMET karakteristika novodizajniranih jedinjenja

Iako su sva novodizajnirana jedinjenja pokazala optimalne ADMET karakteristike, samo četiri jedinjenja su imala bolji ADMET rizik u poređenju sa karvakrolom, dok je jedno jedinjenje imalo identičnu vrijednost predviđenog ADMET rizika kao i karvakrol (Tabela 5). Među ovim jedinjenjima, molekula D2 pokazala je najmanji ADMET rizik koji je jednak 0.

Tabela 5. Predviđene ADMET karakteristike za karvakrol i novodizajnirana jedinjenja.

Jedinjenja	Predviđeni peC_{50}	LogBBB	S+PrUnbnd	S+Pgp	Pravilo 5	CYP_rizik	CYP_kod	TOX_MUT_rizik	TOX_MUT_kod	TOX_rizik	TOX_kod	ADMET_rizik	ADMET_kod	SynthDiff
karvakrol	4,26	0,26	18,3	No	0	2,7	1A2; 2C9; CL	0	/	0	/	2,7	1A2; 2C9; CL	1,49
D1	5,10	-0,22	50,0	Yes	0	1	CL	0,6	S_97	1	HEPX	2	HEPX; CL	2,09
D2	5,00	-0,66	70,4	Yes	0	0	/	0	/	0	/	0	/	1,82
D3	5,00	0,14	8,9	Yes	0	1	CL	0,6	NIHS	1	HEPX	2	HEPX; CL	3,92
D4	5,09	-0,26	25,9	No	0	0,3	CL	1,2	m_97; NIHS	3	Xm; HEPX; MUT	3,3	Xm; HEPX; MUT; CL	2,41
D5	5,05	0,22	13,7	No	0	1	CL	0,6	m_97	1	HEPX	2	HEPX; CL	2,46
D6	5,12	0,22	15,9	Yes	0	1,7	2C19; CL	0,6	m_97	1	HEPX	2,7	HEPX; 2C19; CL	2,60

LogBBB (logoritam particionog koeficijenta Mozak/Krv), S+PrUnbnd (% nevezan za proteine plazme), S+Pgp (supstrat za P-glikoprotein), Pravilo 5 (Lipinski pravilo 5), CYP_rizik (rizik vezan za P450 oksidaciju: od 0 do 6), CL

(visok mikrozomalni klirens), 1A2 (visok 1A2 klirens), 2C19 (visok 2C19 klirens), 2C9 (visok 2C9 klirens), TOX_MUT_rizik (rizik za mutagenost: od 0 do 5,4), m_97 and S_97 (rizik za pozitivan Ames test sa (m*) ili bez (S*) mikrozomalne aktivacije sojeva *Salmonella typhimurium* TA97), NIHS (mutagenost u skladu sa podacima nacionalnog instituta za zdravstvene nauke Japana), TOX_rizik (toksikološki rizik: od 0 do 6), Xm (kacerogenost kod miševa), HEPX (hepatotoksičnost), MUT (Ames pozitivan), ADMET_rizik (ukupni ADMET rizik: od 0 do 22) fu (nevezana frakcija), Kow (lipofilnost), SynthDiff (kompleksnost sinteze: od 0 do 10).

Predviđeni SynthDiff score za sva jedinjenja je nizak, ukazujući na jednostavnu sintezu ovih jedinjenja (Tabela 5). Pored karvakrola čiji je skor 1,52, jedinjenje D2 takođe ima nisku vrijednost 1,82, dok su skorovi za ostala jedinjenja veći od 2.

5.2.4 Rezultati molekuskog dokinga

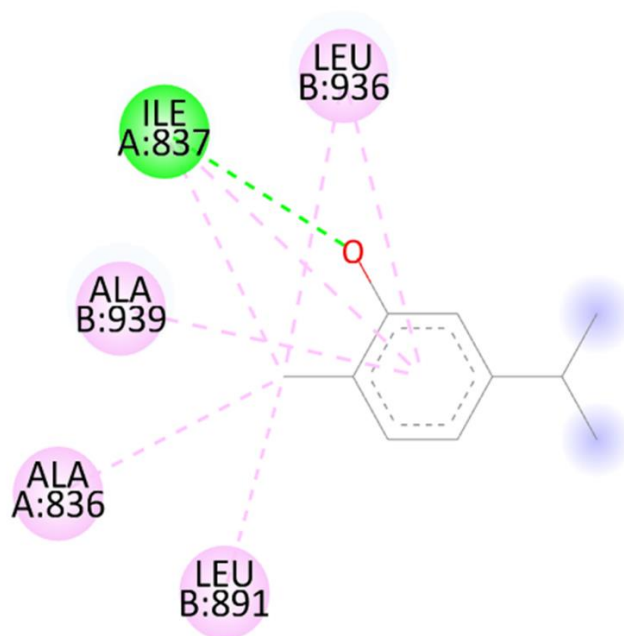
Struktura TRPA1 proteina, kokristalizovanog liganda i dizajniranih jedinjenja pripremljene su na opisan način prije definisanja mjesta vezivanja na osnovu položaja kokristalizovanog liganda. Sva novodizajnirana jedinjenja imala su nižu energiju vezivanja u poređenju sa karvakrolom (Tabela 6). Takođe je važno spomenuti da su sva novodizajnirana jedinjenja ostvarila barem jednu vodoničnu vezu sa nekom od aminokiselina u aktivnom mjestu TRPA1 proteina. Dokovanje novodizajniranih molekula izvršeno je korištenjem dobijenih koordinata iz koordinatnog okvira. Pouzdanost studije potvrđena je izračunavanjem RMSD vrijednosti, koja je za kreirani model iznosila 0,42 Å, što ukazuje na vjerodostojnost modela.

Tabela 6. Rezultati molekuskog dokinga za karvakrol i novodizajnirana jedinjenja.

*Aminokiseline sa kojima jedinjenja ostvaruju vodoničnu vezu su boldovane.

Jedinjenja	Energija vezivanja [kcal/mol]	Aminokiselina s kojom intereaguju*
karvakrol	-5,2	Ala (B:939); Leu (B:936); Leu (B:891); Ala (A:836); Ile (A:837)
D1	-5,4	Ser (B:943) ; Ala (B:939); Phe (A:841); Gln (B:940)
D2	-6,0	Ala (A:836); Leu (B:891); Ile (A:837); Leu (B:936); Phe (A:841); Gln (B:940)
D3	-5,7	Phe (A:841); Ile (A:837); Leu (B:936) ; Ala (A:836) ; Tyr (A:840); Ala (B:939)
D4	-5,8	Ala (B:939) ; Leu (B:936); Ile (A:837); Ser (B:887)
D5	-5,4	Ile (A:837); Leu (B:936) ; Phe (A:841); Tyr (A:840)
D6	-5,2	Ile (A:837); Leu (B:936)

U strukturi karvakrola benzenov prsten i metil grupa ostvaruju nekoliko alkil i pi-alkil interakcija sa dvije aminokiseline leucin (A:836; B:939) i dvije aminokiseline alanin (B:891; B:936) u veznom mjestu TRPA1 kanala, dok fenolna funkcionalna grupa ostvaruje značajnu vodoničnu vezu sa aminokiselinom izoleucin u položaju A:837 (Slika 31).



Interakcije

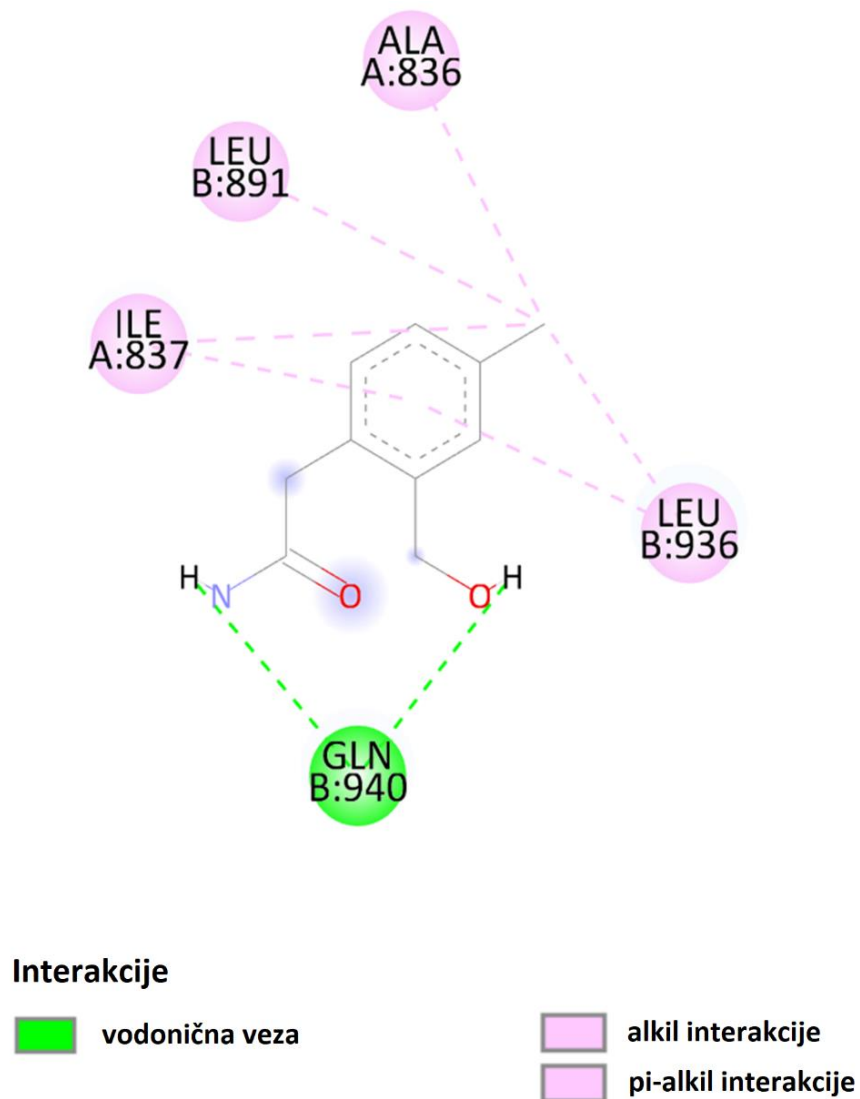
 vodonična veza

 alkil interakcije

 pi-alkil interakcije

Slika 31. Prikaz najznačajnijih interakcija karvakrola u veznom mjestu TRPA1 kanala.

Novodizajnirano jedinjenje D2 imalo je najnižu energiju vezivanja, a pored identičnih alkil i pi-alkil interakcija kao i karvakrol, preko hidroksilne i amidne funkcionalne grupe ostvarilo je dvije vodonične veze sa aminokiselinom glutamin u položaju B940 (Slika 32).

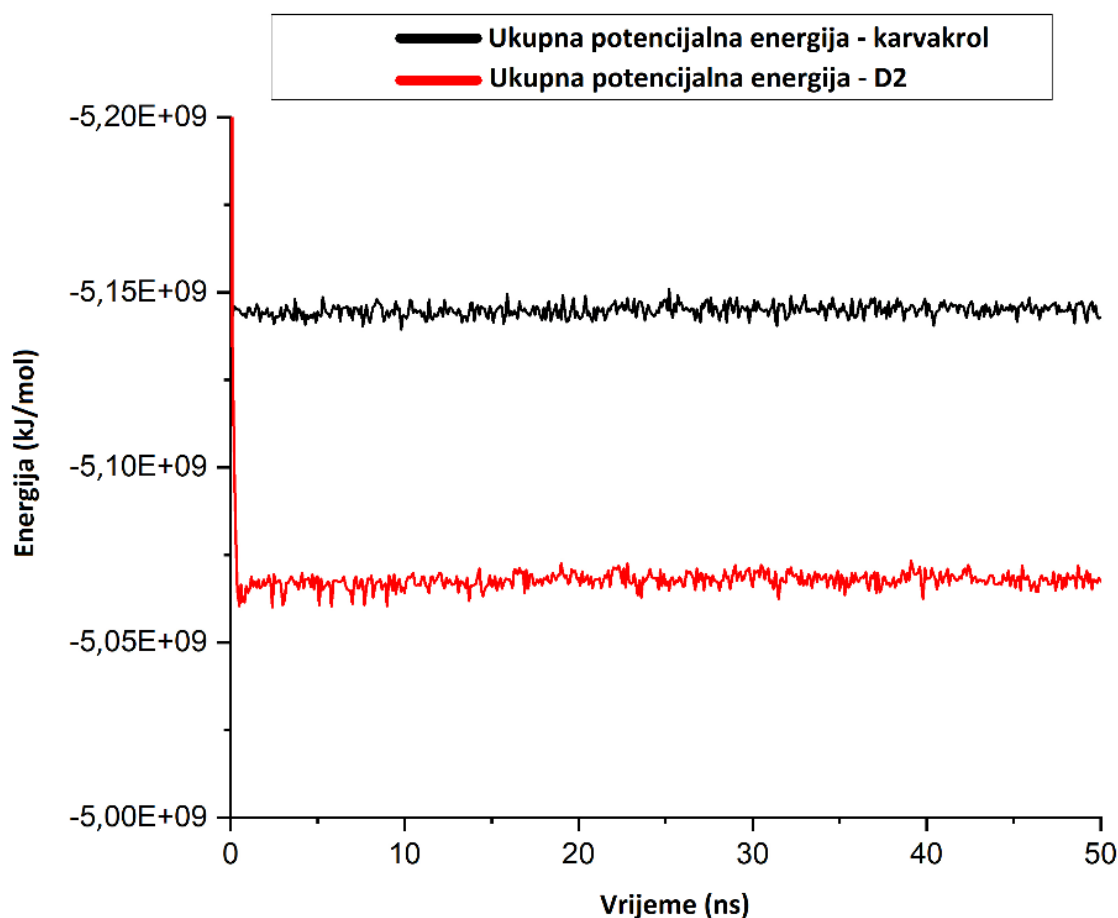


Slika 32. Prikaz najznačajnijih interakcija novodizajniranog jedinjenja D2 u veznom mjestu TRPA1 kanala.

5.2.5 Rezultati simulacije molekulske dinamike

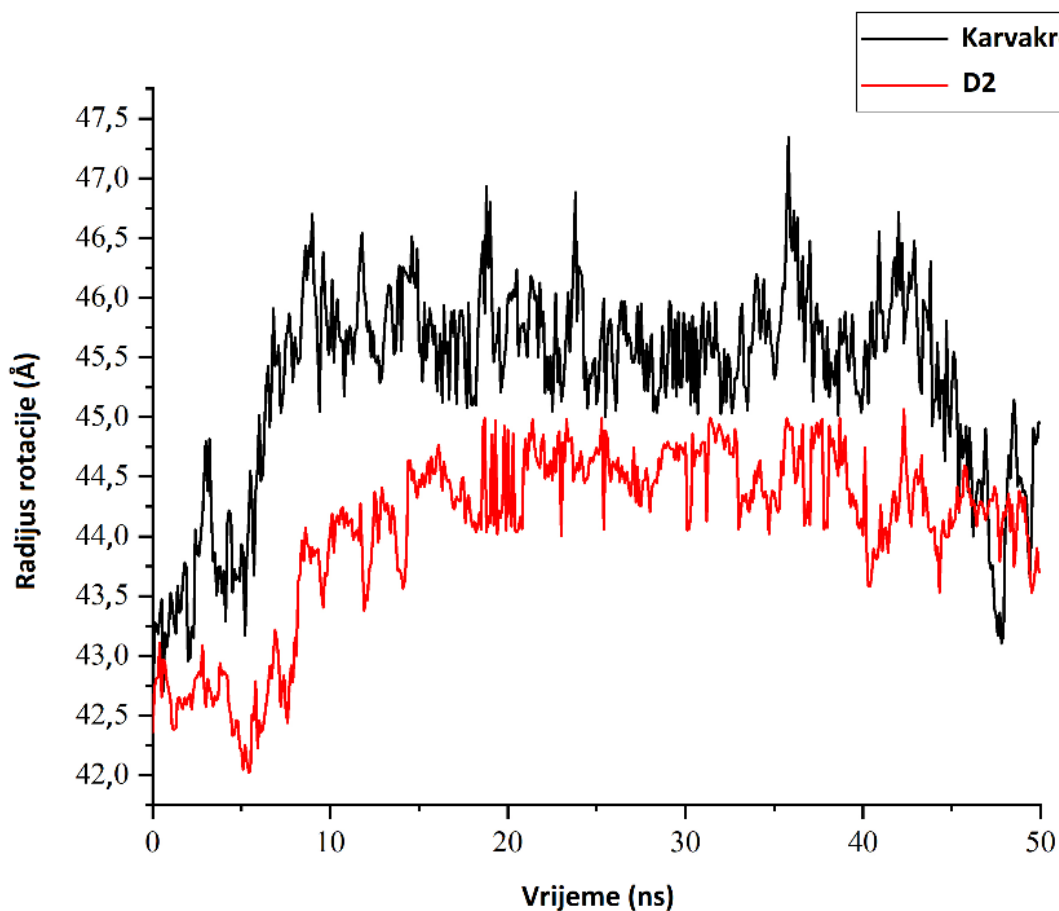
U toku molekulske simulacije obe supstance, karvakrol i D2, relativno brzo postižu stabilno stanje, što se može vidjeti po izravnanju njihovih krivih ukupne potencijalne energije (Slika 33.). Karvakrol se nalazi na nižem nivou ukupne potencijalne energije (oko $-5,15 \times 10^9$

kJ/mol) tokom čitave simulacije, što ukazuje da je karvakrol u stabilnijoj konfiguraciji u poređenju sa molekulom D2, čija vrijednost ukupne potencijalne energije osciluje oko $-5,05\text{E}+09$ kJ/mol.



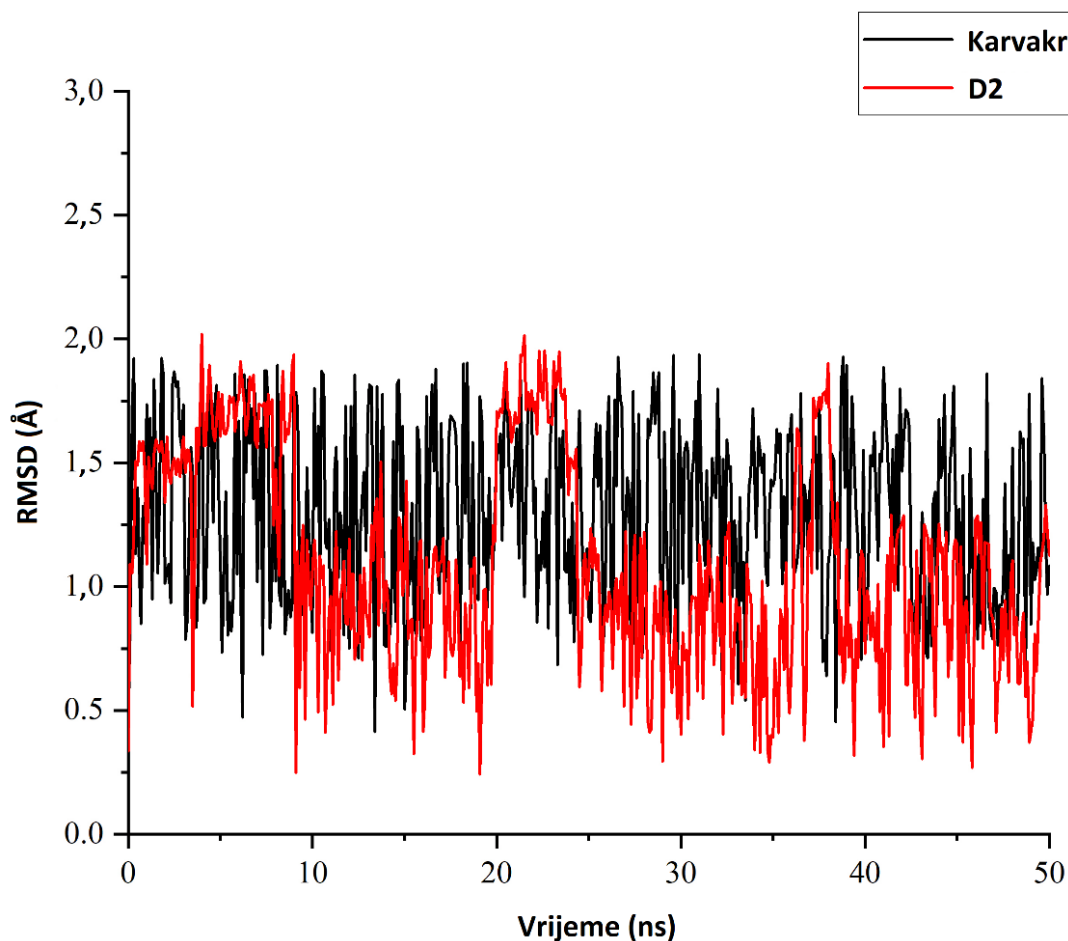
Slika 33. Ukupna potencijalna energija sistema.

Vrijednosti radijusa rotacija za karvakrol u početku osciliraju između $43,5 \text{ \AA}$ i $47,5 \text{ \AA}$, a kasnije se dodatno stabilizuju u rasponu između $44,5 \text{ \AA}$ i $46,5 \text{ \AA}$ u periodu od 50 ns do 100 ns simulacije. S druge strane, jedinjenje D2 konstantno održava niže vrijednosti radijusa rotacije, prvo u rasponu od $42,5 \text{ \AA}$ do $45 \text{ \AA}$, a kasnije u rasponu između $43,5 \text{ \AA}$ i $44,5 \text{ \AA}$ (Slika 34).



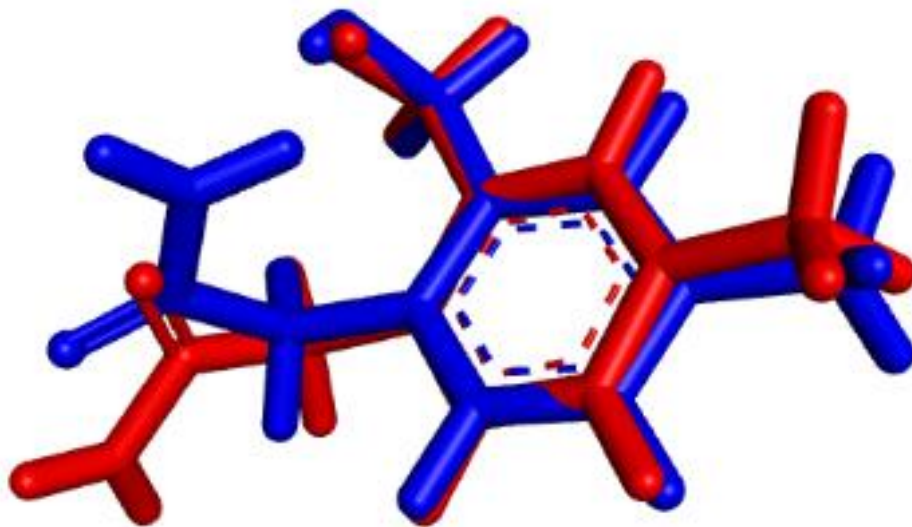
Slika 34. Radijus rotacije karvakrola i novodizajniranog jedinjenja D2.

RMSD je uobičajeni parametar koji se koristi za procjenu konformacione stabilnosti molekula u odnosu na referentnu strukturu tokom trajanja simulacije molekulske dinamike. Karvakrol pokazuje RMSD vrijednosti koje osciluju u rasponu između približno 0,5 Å i 2,25 Å, a slične vrijednosti osredene su i za molekulu D2 (Slika 35).



Slika 35. RMSD vrijednosti kompleksa TRPA1 sa karvakrolom ili D2.

Studija molekuskog dokinga predložila je optimalnu konformaciju novodizajniranog jedinjenja D2 za interakciju sa TRPA1 kanalom. Na Slici 36 prikazano je poređenje ove konformacije sa konformacijom koja je imala minimalnu energiju tokom simulacije molekulske dinamike. Izračunata RMSD vrijednost između ovih konformacija iznosila je 0,31 Å, što dodatno potvrđuje konformacionu stabilnost molekule D2 tokom simulacije, čiji sistem imitira fiziološke uslove.



Slika 36. Preklapanje konformacije molekule D2 iz studije molekulskog dokiga (plava) sa konformacijom molekule D2 koja je imala minimalnu energiju tokom simulacije molekulske dinamike (crvena).

6 DISKUSIJA

Da bi se vazoreaktivni odgovori karvakrola na HUA i HMA mogli adekvatno ispitati pomoću metodologije kupatila za izolovane organe i tkiva, bilo je neophodno odrediti optimalne eksperimentalne uslove za pripremu preparata ovih arterija prije početka eksperimentalnog protokola. Određivanje optimalnih uslova i optimizacija metodologije kupatila za izolovane organe već je izvršena za neke humane arterije kao što su izolovane humane plućne arterije i humane arterije placente.¹⁶²⁻¹⁶⁴ U pogledu eksperimentalnih uslova određeni su optimalna sila zatezanja preparata kao i vremenski period inkubacije istih u medijumu, a takođe je ispitan i uticaj višestrukog izazivanja kontrakcije pomoću KCl-a.

Bertrand i saradnici su pokazali da je za pouzdano mjerenje farmakoloških svojstava potrebno zategnuti preparate HUA na 5 ili čak 6 g pasivne tenzije, dok su neke druge istraživačke grupe u istu svrhu predložile silu pasivne tenzije od 4 g tokom inkubacije u trajanju od 4 sata.¹⁶⁵⁻

¹⁶⁷

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da se vazokonstriktorni odgovor HUA na 40 mM KCl-a povećavao direktno proporcionalno povećavanju pasivne sile zatezanja kao i povećavanju vremenskoga perioda inkubacije. Maksimalni odgovor na izazivanje kontrakcije sa KCl-om postignut je kada su preparati bili zategnuti na 2 g sile pasivne tenzije i inkubirani tokom 120 minuta.¹⁵⁴ Uprkos tome što nakon 120 minuta nije bilo značajne razlike između odgovora onih preparata koji su bili zategnuti na 2 g i 4 g sile pasivne tenzije, sila istezanja od 4 g je značajno teža za postići te je često rezultovala nestabilnošću preparata. Zbog toga su na osnovu ovog ispitivanja sila zatezanja od 2 g i period inkubacije preparata od 120 minuta preporučeni kao optimalni eksperimentalni uslovi za pripremu i adaptaciju preparata krvnih sudova u kupatilu za izolovane organe i tkiva.¹⁵⁴ Ovi rezultati su saglasni sa većinom sprovedenih studija gdje je pokazano da su sila zatezanja preparata od 2 g i vremenski period inkubacije u trajanju od 2 sata optimalni za sprovođenje farmakoloških studija na izolovanim arterijama.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Treba istaći da osetljivost HUA na KCl nije bila pod značajnim uticajem sile istezanja, jer nije pronađena statistički značajna razlika u odgovorima između preparata koji su bili zategnuti na 1, 2, ili 4 g pasivne tenzije. Slični rezultati opisani su na izolovanim krvnim sudovima placente.¹⁶⁵ S druge

strane, razlike u kontrakcijama bile su značajne kada se međusobno uporede više sile zatezanja sa najnižom ispitivanom silom zatezanja od 0,5 g. Važno je spomenuti da je kod preparata HUA zategnutih na minimalnu ispitivanu pasivnu tenziju od 0,5 g, vrijeme inkubacije imalo veći efekat na osetljivost preparata na KCl, jer su kontrakcije izostale nakon 30 minuta inkubacije, dok je produženje vremena inkubacije dovelo do povećanja odgovora preparata.

Da bi se procijenio funkcionalni integritet preparata HUA, u većini istraživanja autori su koristili KCl kao referentni pokretač kontrakcije, pri čemu su primjenjivani različiti protokoli za postizanje prvobitnog referentnog odgovora na KCl. U jednoj studiji koncentracija KCl koja je izazvala maksimalnu konstrikciju za preparate HUA bila je 80 mM, dok je koncentracija KCl za postizanje submaksimalnog odgovora, varirala od 20 mM do 60 mM.¹⁶⁹ Kao što je već spomenuto, različite istraživačke grupe imale su različite protokole za postizanje referentnog kontraktilnog odgovora. Bertrand i saradnici koristili su koncentraciju od 100 mM KCl, obično ponavljajući izazivanje kontrakcije 3 do 4 puta, dok su Tufan i saradnici koristili 40 mM KCl za izazivanje kontraktilnog odgovora i ponavljali su ga dva puta, pri čemu je druga kontrakcija korištena kao referentna.^{165,166} Estañ i saradnici su utvrdili da je 40 mM KCl optimalna koncentracija za postizanje submaksimalne kontrakcije u fetoplacentnim krvnim sudovima.¹⁶² Uzimajući u obzir rezultate svih prethodno navedenih istraživanja, odlučeno je da se KCl koristi kao referentni kontraktilni agens u koncentraciji od 40 mM. Naši rezultati su pokazali da su veće kontrakcije postignute nakon višestrukog tj. trostrukog izazivanja kontrakcije sa 40 mM KCl u poređenju samo sa jednim dodavanjem KCl. Ponovljena membranska depolarizacija indukovana KCl-om dovela je do produžene aktivacije voltažno zavisnih Ca^{2+} kanala, kao i oslobađanja Ca^{2+} jona iz njegovih intracelularnih depoa.¹⁷¹ Ovaj mehanizam najvjerovatnije stoji iza prisustva snažnijeg odgovora preparata HUA na ponovljenu kontrakciju KCl-om. Takođe je moguće da je tokom višestrukog izazivanja kontrakcije veća količina Ca^{2+} jona ostala zarobljena u ćeliji, što je uzrokovano neadekvatnom eliminacijom Ca^{2+} jona u toku svakog perioda mirovanja.¹⁷²

Odavno je poznato da je 5-HT jedan od najmoćnijih vazokonstriktora HUA.¹⁶⁹ Njegova koncentracija u umbilikalnim krvnim sudovima pri rođenju iznosila je oko 0,1 $\mu\text{mol/L}$.¹⁷³ Ovo saznanje je ujedno i odredilo opseg koncentracija 5-HT koje se najčešće koriste za sprovođenje *in vitro* studija na izolovanim krvnim sudovima pupčanika.^{167,174,175} U ovom istraživanju je pokazano da je vazokonstriktorni odgovor preparata HUA na 5-HT pokazao zavisnost od primjene različitih

eksperimentalnih uslova tj. različitih sila zatezanja i vremena inkubacije samih preparata. Efikasnost 5-HT pri izazivanju vazokonstrikcije bila je značajno veća kada su preparati bili izloženi pasivnoj tenziji od 2 g i inkubacionom periodu od 120 minuta.¹⁵⁴ Međutim, osetljivost preparata na 5-HT nije bila pogođena ni kada su preparati bili zategnuti na 1 g i inkubirani tokom 60 minuta, iako je vazokonstriktorni odgovor bio slabiji. Tufan i saradnici su pokazali da je maksimalna kontrakcija izazvana sa 5-HT na HUA, izražena kao procenat KCl-indukovane kontrakcije, iznosila približno 130 %.¹⁶⁶ Dayioglu i saradnici primjenjivajući iste eksperimentalne uslove kao Tufan i saradnici (4 g sile zatezanja i 240 minuta inkubacionog perioda), postigli su maksimalnu kontrakciju od približno 145 %.¹⁶⁷ Veća maksimalna kontrakcija izazvana 5-HT-om (približno 180 %) postignuta je u ovoj studiji primjenom manje sile zatezanja (2 g) i kraćeg vremena inkubacije (120 minuta). Stoga su prednosti ovakvog pristupa ušteda vremena i napora prilikom postizanja optimalnih eksperimentalnih uslova, a sve u cilju kako bi preparati izolovanih krvnih sudova dali adekvatne odgovore u toku sprovođenja eksperimentalnih protokola.

Iako je nekoliko studija već pokazalo vazorelaksantni efekat karvakrola na pacovskim arterijama, njegova vazorelaksantna aktivnost ispitana je i na humanim krvnim sudovima.¹³¹ Kao sastojak eteričnih ulja, sposobnost karvakrola da dilatira glatke mišiće prvo je opisana na izolovanim matericama pacova.¹⁷⁶ Iako karvakrol može izazvati hipotenzivni efekat indukujući vazodilataciju, tačan mehanizam njegovog delovanja još uvek nije u potpunosti objašnjen. Dodavanje rastućih koncentracija karvakrola izazvalo je snažnu vazodilataciju preparata HUA prethodno kontrahovanih sa 5-HT-om. Procijenjena vrijednost EC_{50} za vazorelaksantni efekat karvakrola iznosila je $442,13 \pm 33,8 \mu\text{mol/L}$ (srednja vrijednost $\pm$ SEM), što je značajno više u poređenju sa vrijednostima određenim na aorti pacova i radijalnoj arteriji uterusu pacova ($78,80 \pm 11,91 \mu\text{mol/L}$ i $93 \pm 7 \mu\text{mol/L}$).^{112,131,133} Razlika u odgovoru između krvnih sudova eksperimentalnih životinja i ljudi mogla bi biti posljedica fizioloških razlika među vrstama, kao i razlika u angažovanju određenih mehanizama odgovornih za njihovu vaskularnu aktivnost. Pored toga, poznato je da su HUA otpornije na vazorelaksante u poređenju sa bazilarnim arterijama kod ljudi.¹⁷⁷

S obzirom na odsustvo inervacije u pupčanoj vrpici, protok krvi u HUA je strogo regulisan autakoidima iz cirkulacije, kao što su 5-HT, histamin, bradikinin, angiotenzin i oksitocin.¹⁷⁴ Ove molekule, zajedno sa egzogenim supstancama, regulišu vaskularni tonus krvnih sudova pupčanika

mijenjajući aktivnost receptora i/ili jonskih kanala. Proučavanje mehanizama dejstva ovih molekula bilo je veoma značajno u razumijevanju njihove uloge u održavanju homeostaze vaskularnog tonusa. Kao što je prethodno spomenuto serotonin je najznačajniji vazokonstriktor HUA. 5-HT_{2A} i 5-HT_{1B/D} su receptori koji su odgovorni za vazokonstrikciju izazvanu 5-HT-om u HUA.¹⁷⁸ Tokom trećeg trimestra u regularnim trudnoćama, osjetljivost receptora 5-HT_{1B/1D} se povećava, a značajan porast osjetljivosti primjećen je kod žena sa preeklampsijom, dok aktivnost 5-HT_{2A} receptora ostaje nepromijenjena tokom čitave trudnoće.¹⁷⁹

Uzimajući u obzor koliko je 5-HT bitan u regulaciji vaskularnog tonusa HUA i kakva je njegova uloga u patogenezi preeklampsije, korišten je kao vazokonstriktor da bi se ispitala vazorelaksantna aktivnost karvakrola. Pored već spomenutog vazorelaksantnog efekta karvakrola na prekontrakciju izazvanu 5-HT-om, karvakrol, prethodno inkubiran u medijumu, uspio je da spriječi nastanak kontrakcije izazvane 5-HT-om.¹³¹ Pri koncentraciji od 300 $\mu\text{mol/L}$ karvakrol je značajno umanjio kontrakciju izazvanu 5-HT-om, dok je koncentracija od 1 mmol/L karvakrola u potpunosti eliminisala 5-HT kontrakciju. Ovi rezultati ukazuju da karvakrol vjerovatno može interferirati sa farmakomehaničkim povezivanjem, blokirajući na taj način priliv Ca^{2+} jona izazvan dejstvom agonista na receptor. Receptor 5-HT_{2A} pripada grupi G protein vezanih receptora i konkretno je vezan sa G α proteinom, čija aktivacija povećava intracelularni IP₃, dok su receptori 5-HT_{1B/D} koji pripadaju istoj grupi receptora povezani sa G α_i proteinom, čija aktivacija inhibiše adenilat ciklazu.¹⁷ Oba ova procesa dovode do oslobađanja Ca^{2+} jona iz intracelularnih skladišta i nastanka kontrakcije.¹⁷ Nastanak kontrakcije izazvan 5-HT-om u velikoj mjeri zavisi od ovih mehanizama, koji karvakrol uspijeva da nadvlada pri visokim koncentracijama. Slični rezultati pronađeni su na aorti pacova, gdje je ista koncentracija karvakrola u potpunosti inhibirala kontrakciju izazvanu PE-om (agonist α_1 -adrenergičkih receptora takođe povezanih sa G α proteinom).^{112,180}

Kalijumski kanali imaju izrazito značajnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa, kako HUA, tako i ostalih krvnih sudova.¹⁸¹ Prisustvo i funkcionalnost K ν i BK Ca kanala, kao i njihova uključenost u vaskularnoj aktivnosti HUA, je uveliko potvrđena, dok sa druge strane, nema dovoljno informacija koje bi jasno ukazale na postojanje K ATP kanala u HUA.¹⁸² U ovom istraživanju pokazano je da ni GLB (antagonista K ATP kanala), ni 4-AP (antagonista K ν), kao ni TEA (blokator BK Ca , SK Ca i IK Ca) ne mogu antagonizovati vazorelaksantni efekat karvakrola.¹³¹

Slični rezultati su pronađeni na izolovanoj aorti pacova, gdje TEA i GBL nisu imali efekta na vazodilataciju posredovanu karvakrolom, dok su 4-AP i hinin (neselektivni K_v antagonista) uspjeli da interferiraju i umanje vazorelaksaciju izazvanu karvakrolom.¹³⁰ Testai i sradnici su pretpostavili da je angažovanje K_v kanala usko povezano sa endotelnim zavisnim mehanizmom djelovanja karvakrola na izolovanim pacovskim aortama.¹³⁰

Pored kalijumskih kanala u regulaciji vaskularnog tonusa izrazito su uključeni i L-tip VGCC, koji su ranije u literaturi bili okarakterisani kao kalcijumski kanali osjetljivi na dihidropiridinske agoniste.¹⁸³ Dihidropiridini, među kojima se nalazi i NCP, smanjuju ulazak ekstracelularnih Ca^{2+} jona blokiranjem L-tipa VGCC, što posljedično dovodi do vazodilatacije HUA.¹⁸³ Učešće L-tipa VGCC u mehanizmu vazorelaksantnog dejstva karvakrola na HUA ispitano je u ovoj studiji. Snažan inhibitorni efekat na L-tip VGCC postignut je inkubacijom 1000 $\mu\text{mol/L}$ karvakrola u Krebs–Ringer bikarbonatnom medijumu bez Ca^{2+} jona.¹³¹ U odsustvu Ca^{2+} jona, Ba^{2+} joni prolaze kroz L-tip VGCC i izazivaju kontrakciju, stoga je na ovaj način vrlo jednostavno ispitati ulogu ovih kanala u mehanizmima regulacije vaskularnog tonusa. U poređenju sa kontrolnom krivom $BaCl_2$, primijećeno je da je inhibitorni efekat karvakrola na kontrakciju izazvanu $BaCl_2$ veoma sličan efektu NCP-a koji je poznati blokator L-tipa VGCC i koji je korišten kao pozitivna kontrola u ovoj studiji. Pri višoj koncentraciji karvakrol je čak potpuno blokirao nastanak kontrakcije posredovane $BaCl_2$ -om. Inhibitorni efekat karvakrola na L-tip VGCC potvrđen je korištenjem *patch-clamp* tehnike na miocitima mezenteričnih arterija pacova.¹⁸⁴ Nekoliko studija pokazalo je inhibitorni efekat drugih monoterpenkih jedinjenja takođe prirodnog porijekla na L-tip VGCC u glatkim mišićnim ćelijama. Citral je blokirao L-tip VGCC u glatkim mišićima aorte pacova, 1,8-cineol u dušniku pacova, dok je inhibitorni efekat (-) karveola u HUA nasličniji prikazanim rezultatima za karvakrol.^{185,186,115} BAY K 8644 je specifični agonista L-tipa VGCC, koji se široko koristi u eksperimentalnim uslovima za proučavanje ovih kanala.¹⁸⁷ Monoterpenka jedinjenja poput karveola i perilil alkohola blokirali su BAY K 8644-indukovanu kontrakciju na izolovanoj aorti pacova, pokazujući uključenost L-tipa VGCC u njihov mehanizam dejstva.¹⁸⁸ U sprovedenom istraživanju, slično prethodno opisanim nalazima karvakrol je uspio da spriječi kontrakciju izazvanu BAY K 8644. Stoga se može reći da je relaksantno djelovanje karvakrola, kao i ostalih monoterpena na glatke mišiće, barem djelimično ostvareno inhibicijom L-tipa VGCC.

Ulazak jona kalcijuma u ćeliju može dovesti do aktivacije enzima citosolna NOS u endotelnim ćelijama krvnih sudova, što dalje može prouzrokovati vazodilataciju.¹⁸⁹ Utvrđeno je da mentol, još jedan monoterpen, izaziva NO-zavisnu vazodilataciju pojačavajući prliv Ca^{2+} jona u ćeliju putem aktivacije TRPM8 kanala.¹⁹⁰ Ova vazodilatacija bila je značajno smanjena u prisustvu L-NAME (inhibitor endotelne NO sintetaze), koji je spriječio aktivaciju NOS.¹⁹⁰ Međutim, rezultati eksperimenata sprovedenih u ovom istraživanju nisu pokazali nikakvu promjenu u vazodilatatornom dejstvu karvakrola pod uticajem L-NAME. Ovo je u skladu sa ranijim rezultatima opisanim za uticaj L-NAME na efekat karvakrola na aorti pacova.^{112,130}

U prisustvu IPP-a (neselektivni TRP antagonista) ili A967079 (selektivni TRPA1 antagonista), maksimalni efekat vazodilatacije izazvane karvakrolom je bio umanjen, ali je on pri većim koncentracijama i dalje uspijevaio da izazove vazorelaksaciju prekontrahovanih HMA.¹⁵¹ Ovo ukazuje da su TRPA1 kanali djelimično uključeni u mehanizam vazorelaksantnog dejstva karvakrola. Karvakrol je takođe poznat agonista TRPA1 kanala, čija aktivacija može aktivirati dalje mehanizme koji rezultiraju relaksacijom krvnih sudova. Moguće je da karvakrol aktivira TRPA1 kanale na endotelnim ćelijama krvnih sudova, koji dovode do influksa Ca^{2+} jona i aktivacije K_{Ca} , koja vodi ka hiperpolarizaciji membrane endotelnih ćelija koja se putem MEGJ prenosi na glatke mišićne ćelije krvnih sudova.⁹⁴ Karvakrol bi takođe mogao aktivirati TRPA1 kanale na nervnim završecima u krvnim sudovima i dovesti do oslobađanja CGRP koji izaziva vazodilataciju.⁹⁴ U posljednjih nekoliko godina, postoji veliki broj studija koje istražuju ulogu TRP kanala u regulaciji vaskularnog tonusa, sa posebnim naglaskom na TRPA1 kanale. Bautista i saradnici su pokazali da aktivacija TRPA1 kanala na perivaskularnim nervnim završecima može izazvati vazodilataciju izolovanih mezenteričnih arterija pacova.¹⁰² Nekoliko studija je prikazalo da su formaldehid, cink pirition i α -pinen takođe izazvali vazorelaksaciju mezenteričnih arterija miševa predlažući aktivaciju TRPA1 kanala kao vodeći mehanizam vazodilatatornog dejstva ovih molekula.¹⁹¹⁻¹⁹⁴ Poznato je da aktivacija TRPA1 kanala može dovesti do neurogene vazodilatacije ili vazodilatacije zavisne od endotela kod izolovanih arterija životinja.^{68,195} Topikalna primjena cinamaldehida (agonista TRPA1 kanala) na podlakticu čovjeka izaziva crvenilo ukazujući na povećanje protoka krvi u koži, koje može biti umanjeno primjenom selektivnog antagoniste TRPA1 kanala pod nazivom LY3526318.¹⁹⁵ Takođe, intravenozno ubrizgana niža doza cinamaldehida izazvala je značajan hipotenzivni efekat kod divljih miševa u poređenju sa TRPA1

nokaut miševima.¹⁰¹ Uzimajući u obzir prethodno navedeno, evidentan je značaj TRPA1 kanala u regulaciji vaskularnog tonusa, koji bi, uzimajući u obzir da njihova inhibicija dovodi do nastanka vazodilatacije, mogli biti ciljno mjesto od interesa za razvoj novih terapijskih mogućnosti.

In silico metode su uveliko prisutne i koriste se u razvoju novih lijekova. U ovoj studiji primjena *in silico* tehnika omogućila je dizajn novih molekula čija je struktura zasnovana na strukturi karvakrola, a koje bi imale bolju aktivnost na TRPA1 kanalima, što bi moglo dovesti do boljeg vazorelaksantnog efekta. Do sada je razvijen pouzdan QSAR model za identifikaciju i predikciju inhibitornog efekta na TRPA1 kanale među već poznatim, odobrenim supstancama, dok je model za predikciju agonističkog efekta na TRPA1 kanale po prvi put razvijen u ovoj studiji.¹⁹⁶

Korištenjem jedinjenja iz trening seta kreiran je pouzdan 3D-QSAR model za predikciju pEC₅₀ vrijednosti za agoniste TRPA1 kanala. Parametri interne i eksterne validacije pokazali su zadovoljavajuće vrijednosti, a nijedno jedinjenje iz trening seta nije bilo izvan određenog domena primjenjivosti. Važno je napomenuti da je opseg eksperimentalnih pEC₅₀ vrijednosti za jedinjenja koja su odabrana za *data set* relativno uzak (3,30 – 5,06). Međutim, ovaj opseg pEC₅₀ vrijednosti je tipičan među malim molekulima za koje se zna da aktiviraju TRPA1, kao što je i sam karvakrol. Pozitivni i negativni uticaji prisutnih funkcionalnih grupa opisani su kada su one izložene različitim probama. Varijabla v450 identifikovana je kod većine jedinjenja koja imaju izrazito dobru aktivnost na TRPA1 kanalima, a to su jedinjenja L1, L2, L3, L6, L7, L9, L11, L15, L18 i L19. Ova varijabla pokazuje da sterna region i akceptor vodonične veze kada se nađu na udaljenosti od 10,8 do 11,2 Å favorizuju pozitivnu interakciju. Zbog toga je fenolna funkcionalna grupa kod novodizajniranih jedinjenja postavljena u meta ili para položaj u odnosu na sterna region na benzenovom prstenu, kako bi omogućilo formiranje povoljne interakcije. Pozitivan uticaj različitih rastojanja između dva donora vodonične veze opisan je varijablama v51 (1,6 do 2 Å), v60 (5,2 do 5,6 Å) i v68 (8,4 do 8,8 Å). Ove varijable primijećene su na svega nekoliko jedinjenja iz trening seta među kojima se nalazi i najaktivnije jedinjenje u trening setu L9, a pored njega tu su još jedinjenja L7 i L11. Na osnovu ovih varijabli u novodizajniranim jedinjenjima dvije fenolne grupe postavljene su međusobno u orto položaj na benzenovom prstenu, što je pokazalo pozitivan efekat na njihovu biološku aktivnost. Negativan uticaj različitih udaljenosti između donora vodonične veze i sternog regiona, koje mogu dovesti do smanjenja biološke aktivnosti, okarakterisan je varijablama v388 (4,8 do 5,2 Å), v397 (8,4 do 8,8 Å) i v406 (12 do 12,4 Å). Sve tri negativne

varijable identifikovane su kod jedinjenja L11, dok je varijabla v388 prisutna još kod L1, L6, L7, L9 i L19, a varijabla v397 kod jedinjenja L1, L7 i L9. Uzimajući u obzir opisane negativne varijable sam položaj jedne ili dvije fenolne grupe i sternog regiona na određenom rastojanju mogao bi imati negativan uticaj na aktivnost u novodizajniranim jedinjenjima.

Karvakrol je u ovoj *in silico* studiji odabran kao polazno jedinjenje na kojem su vršene strukturne modifikacije kako bi se dizajnirala nova jedinjenja sa pojačanim sposobnostima da aktiviraju TRPA1 kanale. Opisane interakcije u 3D-QSAR modelu korištene su kao smjernice za sprovođenje strukturnih promjena karvakrola, što je dovelo do dizajna šest jedinjenja sa poboljšanom pEC₅₀ vrijednosti. Uzimajući u obzir da je hemijska struktura karvakrola prilično jednostavna, razumljivo je da čak i male promjene u njegovoj strukturi mogu stvoriti nova jedinjenja sa značajno izmijenjenom efikasnošću na TRPA1 kanalima. Zamjena metil grupe u strukturi karvakrola sa hidroksilnom funkcionalnom grupom pokazala se kao važna adaptacija kod gotovo svih jedinjenja sa poboljšanom aktivnošću. Na poziciji 4C na benzenovom prstenu, različite funkcionalne grupe, kao što su benzen, 1,3-dihlorbenzen, hlorbenzen, 1-hlorciklopentan-2,4-dien, piridazin, propanal, 1-bromprop-1-en-2-il i 1-hlorprop-1-en-1-il su pokazale doprinos aktivnosti.¹⁵¹ Ove funkcionalne grupe predstavljaju steričke regione koji se nalaze na optimalnoj udaljenosti od fenolne funkcionalne grupe, da bi se ispoljio pozitivan efekat na aktivnost.

Predviđene pEC₅₀ vrijednosti za novodizajnirana jedinjenja bile su više u poređenju sa eksperimentalnom pEC₅₀ vrijednošću za karvakrol (koja iznosi 4,77) i nešto više u poređenju sa pEC₅₀ vrijednostima ostalih jedinjenja korišćenih za kreiranje modela (Tabela 3). Iako je validacija modela bila uspješna, pokazujući na taj način da je kreirani model pouzdan alat za predviđanje pEC₅₀ vrijednosti za aktivnost na TRPA1 kanalima, neophodna su dalja istraživanja kako bi se odredila EC₅₀ vrijednost ovih jedinjenja u eksperimentalnim *in vitro* uslovima. Jedinjenje D2 je pokazalo poboljšanu aktivnost, iako se njegova struktura blago razlikuje od ostalih novodizajniranih molekula. Osim D2, sva ostala dizajnirana jedinjenja imaju kateholnu strukturu u osnovi. Samo prisustvo dvije hidroksilne funkcionalne grupe koje se nalaze u orto položaju moglo bi dovesti do formiranja intramolekularnih vodoničnih veza i na taj način otežati interakciju sa receptorom. Međutim, pokazano je da su jake intramolekularne vodonične veze kod katehola moguće samo u slabo intereagujućim rastvaračima, dok su u jako intereagujućim rastvaračima, poput vode, intramolekularne vodonične veze slabe i brzo se gube.¹⁹⁷ Callear-a i saradnici su

eksperimentalno pokazali da se vodonici na hidroksilnim funkcionalnim grupama dopamina u prostoru orijentišu na način da favorizuju formiranje intermolekularnih vodoničnih veza umjesto intramolekularnih vodoničnih veza u samoj strukturi katehola.¹⁹⁸ Jedinjenje D1 sadrži aldehidnu funkcionalnu grupu, dok su jedinjenja D5 i D6 alkeni. Obe grupe jedinjenja su visoko reaktivne i mogle bi potencijalno da se kovalentno vežu za aminokiselinske ostatke u TRPA1 kanalima, posebno za cistein, što ih čini manje povoljnim kandidatima za sintezu i dalja ispitivanja. Ovaj rizik treba detaljno sagledati i procijeniti prije daljih *in vitro* studija. S obzirom da su sva novodizajnirana jedinjenja male molekule, moguće je da pokazuju promiskuitet i da interaguju i sa drugim receptorima pored TRPA1. Takođe, mnogi TRP kanali dijele strukturne sličnosti koje bi mogle olakšati takve interakcije. Sam karvakrol, osim što aktivira TRPA1, može aktivirati i TRPV3 kanale.¹⁹⁹ Ovo svakako treba uzeti u obzir prilikom određivanja selektivnosti ovih jedinjenja.

Fizičko-hemijske i biološke karakteristike novodizajniranih jedinjenja procijenjene su kako bi se eliminisale molekule sa potencijalno neodgovarajućim ADMET osobinama u ranim fazama razvoja lijeka. Samo četiri jedinjenja su imala bolji ADMET rizik u odnosu na karvakrol. Jedinjenje D2 je imalo najnižu vrijednost ADMET rizika jednaku 0.¹⁵¹ Sva jedinjenja su pokazala mali rizik za mikrozomalni klirens i hepatotoksičnost, kao i sposobnost da dovedu do nastanka mutacija, osim jedinjenja D2, kod kojeg se ti rizici ne predviđaju. Važno je napomenuti da je ovaj model ograničen samo na predviđanje metabolizma koji se odvija putem CYP enzima. S obzirom da su skoro sva D jedinjenja kateholi, postoji mogućnost da ova jedinjenja budu supstrati za katehol O-metiltransferazu (eng. *Catechol-O-methyltransferase*, COMT) i da samim tim imaju značajno kraće poluvrijeme eliminacije. Jedinjenje D2 nije katehol i stoga ne može biti metabolisano putem COMT-a, što ga dodatno favorizuje u odnosu na ostala novodizajnirana jedinjenja. Svakako je neophodno sprovesti dalja *in vitro* i *in vivo* istraživanja, kako bi se precizno procijenile kompletne ADMET karakteristike ovih jedinjenja.

Detaljna procjena težine sinteze, bilo konceptualno ili putem *in silico* metoda, ključna je za selekciju molekula za sintezu i testiranje tokom ranih faza otkrića lijekova. Korišćenje *in silico* modela u ovu svrhu značajno ubrzava proces selekcije kandidata koji se mogu razmatrati za sintezu. Predviđeni SynthDiff skor za sva jedinjenja je nizak, što ukazuje na jednostavnost sinteze novodizajniranih jedinjenja. Jedinjenje D2 pokazalo je veoma nisku vrijednost skora od 1,52.¹⁵¹ U

poređenju sa ADMET Predictor primjerima za benzen čija je vrijednost skora 0 i riboflavin čija je vrijednost 4, može se reći da bi sinteza jedinjenja D2 trebala biti prilično jednostavna. Svakako treba imati u vidu da faktori poput kreativnosti hemičara, stručnosti u organskoj hemiji, dostupne polazne sirovine i laboratorijska oprema mogu značajno uticati na proces hemijske sinteze novih jedinjenja.

Dok je svrha kreiranog 3D-QSAR modela bila predviđanje aktivnosti poznatih kao i novodizajniranih jedinjenja na TRPA1 kanalima, studija molekuskog dokinga omogućava dublje razumijevanje načina vezivanja i interakcije između samih molekula i aktivnog mjesta na TRPA1 proteinu. TRPA1 kanal se sastoji od četiri identične podjedinice koje su raspoređene u strukturu tetramera, pri čemu svaka podjedinica sadrži šest transmembranskih heliksa.²⁰⁰ Džep za vezivanje se formira između prva četiri transmembranska heliksa (S1-S4) jedne podjedinice i dva transmembranska heliksa (S5-S6) njene susjedne podjedinice.⁶³ S obzirom na to da se karvakrol nekovalentno veže i aktivira TRPA1 kanale, 3D struktura TRPA1 kanala sa ko-kristalizovanim nekovalentno vezanim ligandom (PDB kod: 6X2J) korišćena je za kreiranje modela molekuskog dokinga.⁶³ Na ovaj način se unaprijed znalo očekivano vezno mjesto za ligande koji sa TRPA1 kanalima stupaju u nekovalentnu interakciju. Rezultati su pokazali da sva novodizajnirana jedinjenja sa boljim predviđenim aktivnostima takođe imaju i niže energije vezivanja u poređenju sa karvakrolom, što ukazuje na njihovu sposobnost da formiraju stabilniji kompleks sa TRPA1 kanalom.¹⁵¹ Posmatranjem interakcija karvakrola sa TRPA1, može se vidjeti da aminokiselinski ostaci Ala (A:836), Leu (B:891) i Leu (B:936) stvaraju alkilnu interakciju sa metil grupom karvakrola, dok Leu (B:936), pored ove alkilne interakcije, zajedno sa Ala (B:939) stvara Pi-alkilnu interakciju sa benzenovim prstenom na karvakrolu. Pored ovih interakcija, Ile (A:837) kreira i važnu vodoničnu vezu sa fenolnom grupom karvakrola. Prisustvo hidroksilnih funkcionalnih grupa, koje mogu da djeluju i kao donori i kao akceptori vodoničnih veza, omogućava novodizajniranim molekulama da stvaraju vodonične veze sa aminokiselinskim ostacima na mjestu vezivanja na TRPA1 kanalima.²⁰¹ Aminokiselinski ostaci koji intereaguju sa jedinjenjem D2 odgovaraju aminokiselinskim ostacima koji intereaguju sa karvakrolom (Ala (A:836), Leu (B:891), Leu (B:936) i Ile (A:837)).¹⁵¹ Jedinjenje D2 takođe gradi dvije vodonične veze preko azota iz amidske i hidroksilne funkcionalne grupe sa aminokiselinskim ostatkom Gln (B:940). Niža energija vezivanja kao i ineterakcija sa istim aminokiselinama na mjestu vezivanja

kao karvakrol i dodatna vodonična veza, čine jedinjenje D2 najboljim kandidatom za studiju molekulske dinamike.

Studija molekulske dinamike omogućava detaljniju procjenu stabilnosti kompleksa karvakrol–TRPA1 i D2–TRPA1. Evaluacija parametara kao što su ukupna potencijalna energija, radijus okretanja i RMSD vrijednosti tokom simulacije molekulske dinamike ključna je za razumijevanje stabilnosti i ponašanja molekulskih sistema.¹⁵⁰ Svaki od ovih parametara nudi jedinstven uvid u dinamiku i potencijalnu efikasnost molekula, koji je izrazito značajan u razvoju lijekova i biohemijskim istraživanjima.

Zbir svih međuatomskih sila, uključujući veze, uglove, diedralne uglove i nekovalentne interakcije unutar sistema prikazuje se kroz vrijednost ukupne potencijalne energije koja je osnovna mjera u simulaciji molekulske dinamike. U toku stabilne simulacije molekulske dinamike potencijalna energija obično brzo dostiže plato ili ima minimalne fluktuacije oko osnovne vrijednosti. To sugerise da je molekulski sistem dostigao ravnotežno stanje, koje je neophodno za dalje precizne biofizičke analize i proračune. Uticaj stukturnih modifikacija na stabilnost i reaktivnost samih molekula može se odrediti praćenjem promjene u vrijednosti potencijalne energije različitih liganada ili derivata koji interaguju sa receptorom. I karvakrol i jedinjenje D2 veoma brzo postižu stabilno ravnotežno stanje, s tim da karvakrol ima nižu vrijednost ukupne potencijalne energije ukazujući na to da se on nalazi u stabilnijoj konformaciji.¹⁵¹ S druge strane, fluktuacije koje se javljaju kod jedinjenja D2 iako minimalne, izraženije su nego kod karvakrola, što sugerise nešto manju stabilnost ili dinamičnije strukturno prilagođavanje tokom trajanja simulacije. Obzirom na to da je karvakrol poznati agonista TRPA1 kanala, niži i stabilniji energetski profil ukazuje na to da je njegova interakcija sa receptorom energetski povoljnija.²⁰²

Kompleks karvakrol–TRPA1 pokazuje veći radijus rotacije u cjelini, što ukazuje na to da je ovaj kompleks manje kompaktan u poređenju sa kompleksom D2–TRPA1.¹⁵¹ Veće fluktuacije mogu sugerisati da kompleks karvakrola prolazi kroz više konformacionih promjena tokom ovog perioda simulacije. S druge strane, novodizajnirano jedinjenje D2 održava konstantno niži radijus rotacije, što ukazuje na manje konformacionih promjena u poređenju sa karvakrolom. Veći raspon i viša vrednost radijusa rotacije takođe mogu ukazivati i na to da se karvakrol može naći u

različitim konformacijama u zavisnosti od promjena u okruženju, što mu potencijalno omogućava različite interakcije sa TRPA1 proteinom.

RMSD je osnovni parametar na osnovu čije se vrijednosti vrši procjena konformacione stabilnosti molekula u odnosu na referentnu strukturu tokom vremena trajanja simulacije molekulske dinamike. S obzirom na zadovoljavajuće vrijednosti ovog parametra koje pokazuju krive za oba liganda, može se zaključiti da karvakrol i D2 jednom kada postignu konformaciju koja je kompatibilna sa mjestom vezivanja na proteinu mogu održavati interakcije sa većom dosljednošću.¹⁵¹ Takođe povoljna vrijednost RMSD parametra dobijena upoređivanjem optimalne konformacije za novodizajnirano jedinjenje D2 dobijenom nakon molekuskog dokinga sa konformacijom koja je imala najnižu energiju tokom simulacije molekulske dinamike ukazuje na izrazitu konformacionu stabilnost ovog jedinjenja.¹⁵¹

7 ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata eksperimentalnih protokola na izolovanim HUA i HMA, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Optimalni eksperimentalni uslovi za postizanje adekvatnih rezultata prilikom ispitivanja vazoaktivnosti na HUA i HMA metodologijom kupatila za izolovane organe i tkiva, podrazumijevaju zatezanje preparata na pasivnu tenziju od 2g, inkubaciju od 120 minuta i trostruko izazivanje kontrakcije sa 40 mM KCl-a.
2. Karvakrol izaziva snažnu vazodilataciju izolovanih HUA i HMA.
3. Blokada kalijumskih kanala (K_v , K_{ATP} , K_{Ca}) nije uticala na vazorelaksaciju HUA izazvanu karvakrolom, isključujući na taj način njihovu ulogu u mehanizmu dejstva karvakrola.
4. Inhibicija eNOS nije uticala na vazorelaksaciju HUA izazvanu karvakrolom, isključujući na taj način njenu uključenost u mehanizmu dejstva karvakrola.
5. Karvakrol inkubiran u medijumu, srpječava nastanak kontrakcije HUA pomoću $BaCl_2$ ili BAY K 8644, slično kao i NCP (pozitivna kontrola) ukazujući na blokadu L-tipa VGCC kao mehanizam njegovog vazodilatatornog dejstva.
6. Blokada TRPA1 kanala dovela je do smanjenja vazodilatacije HMA postignute karvakrolom, ukazujući na uključenost ovih kanala u vazorelaksantni mehanizam karvakrola.

Na osnovu prikazanih rezultata, korištenjem različitih *in silico* metoda, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Kreiran je pouzdan 3D-QSAR model za predikciju aktivnosti na TRPA1 kanalima ($R^2=0,83$ $Q^2=0,59$ $R^2_{pred}=0,84$).
2. Rezultati 3D-QSAR studije pokazali su da je najznačajnija varijabla sa pozitivnim uticajem (v450) koja opisuje udaljenost akceptora vodonične veze i sternog regiona (10,8 - 11,2 Å) identifikovana kod većine jedinjenja u trening setu koja imaju izraženu biološku aktivnost prema TRPA1. Varijable v51, v60 i v68 opisuju takođe pozitivan uticaj kada se dva donora

vodonične veze nađu na određenim rastojanjima (1,6 do 2 Å; 5,2 do 5,6 Å i 8,4 do 8,8 Å). Ove varijable pokazuju da fenolna funkcionalna grupa u meta položaju u odnosu na sterni region na benzenovom prstenu, kao i postojanje kateholne strukture dovode do povećanja biološke aktivnosti TRPA1 agonista.

3. Dizajnirano je 6 novih agonista TRPA1 kanala koji su imali bolju predviđenu aktivnost u odnosu na karvakrol.
4. Od 6 novodizajniranih jedinjenja, 4 su imala bolje predviđene ADMET karakteristike u odnosu na karvakrol, s tim da je jedinjenje D2 imalo najmanji rizik da ispolji loše ADMET osobine.
5. Sva novodizajnirana jedinjenja pokazala su veći afinitet za TRPA1 protein u studiji molekulskog dokinga, a jedinjenje D2 je imalo najnižu energiju vezivanja.
6. Rezultati dobijeni iz simulacije molekulske dinamike pokazali su zadovoljavajuću stabilnost kompleksa karvakrol–TRPA1 i D2–TRPA1.

Uzimajući u obzir sve prikazane rezultate u ovom istraživanju može se zaključiti da su L-tip VGCC i TRPA1 kanali uključeni u vazodilatatorni mehanizam dejstva karvakrola. *In silico* modifikacija strukture karvakrola dovela je do dizajna šest jedinjenja. Na osnovu predviđene aktivnosti, predviđenih ADMET osobina i predviđene interakcije sa samim TRPA1 proteinom, može se zaključiti da je jedinjenje D2 najbolji kandidat za sintezu i za dalja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.

8 LITERATURA

1. Fryar CD, Kit B, Carroll MD, Afful J. Hypertension prevalence, awareness, treatment, and control among adults age 18 and older: United States, August 2021–August 2023. NCHS Data Brief, no 511. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2024.
2. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet*. 2021;398(10304):957-980.
3. Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*. 2008;371(9623):1513-8.
4. Hariri L, Patel JB. Vasodilators. 2023 Aug 14. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–.
5. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010;376(9741):631-44.
6. Yankowitz J. Pharmacologic treatment of hypertensive disorders during pregnancy. *J Perinat Neonatal Nurs*. 2004;18(3):230–40.
7. Guasch-Ferré M, Willett WC. The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. *J Intern Med*. 2021;290(3):549-566.
8. Wang J, Feng B, Yang X, Liu W, Xiong X. Chinese herbal medicine for the treatment of prehypertension. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2013;2013:493521.
9. Insel PA. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors-evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med*. 1996 Feb 29;334(9):580-5.
10. Tesfamariam B, Weisbrod RM, Cohen RA. Cyclic GMP modulators on vascular adrenergic neurotransmission. *J Vasc Res*. 1992 Sep-Oct;29(5):396-404.
11. Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*. 2001 Jun;53(2):319-56. Erratum in: *Pharmacol Rev* 2001 Sep;53(3):451.

-
12. Ekblad E, Edvinsson L, Wahlestedt C, Uddman R, Håkanson R, Sundler F. Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers. *Regul Pept.* 1984 Apr;8(3):225-35.
 13. Navar LG. Physiology: hemodynamics, endothelial function, renin-angiotensin-aldosterone system, sympathetic nervous system. *J Am Soc Hypertens.* 2014 Jul;8(7):519-24.
 14. Sheng Y, Zhu L. The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2018 Mar 10;10(1):17-28.
 15. Dolejší E, Janoušková A, Jakubík J. Muscarinic Receptors in Cardioprotection and Vascular Tone Regulation. *Physiol Res.* 2024 Apr 18;73(Suppl 1):S389-S400.
 16. Spinarova L, Vitovec J. Neurohumoral changes in chronic heart failure. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2007 Dec;151(2):201-7.
 17. Lorigo M, Mariana M, Feiteiro J, Cairrao E. How is the human umbilical artery regulated? *J Obstet Gynaecol Res.* 2018;44(7):1193-1201.
 18. Lau KE, Lui F. Physiology, Prostaglandin I2. 2023 Aug 28. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan—. PMID: 32965944.
 19. Newby DE, Sciberras DG, Ferro CJ, Gertz BJ, Sommerville D, Majumdar A, et al. Substance P-induced vasodilatation is mediated by the neurokinin type 1 receptor but does not contribute to basal vascular tone in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1999 Sep;48(3):336-44.
 20. Sandilands EA, Crowe J, Cuthbert H, Jenkins PJ, Johnston NR, Eddleston M, et al. Histamine-induced vasodilatation in the human forearm vasculature. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Nov;76(5):699-707.
 21. Ancion A, Tridetti J, Nguyen Trung ML, Oury C, Lancellotti P. A Review of the Role of Bradykinin and Nitric Oxide in the Cardioprotective Action of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Focus on Perindopril. *Cardiol Ther.* 2019 Dec;8(2):179-191. doi: 10.1007/s40119-019-00150-w.
 22. Hagner S, Haberberger R, Kummer W, Springer J, Fischer A, Böhm S, et al. Immunohistochemical detection of calcitonin gene-related peptide receptor (CGRPR)-1 in the

endothelium of human coronary artery and bronchial blood vessels. *Neuropeptides*. 2001 Feb;35(1):58-64.

23. Brinks HL, Eckhart AD. Regulation of GPCR signaling in hypertension. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1802(12):1268-75.

24. Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, Sutherland C, Walsh MP. Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J*. 2005;389(Pt 3):763–74.

25. Byrne NG, Large WA. Membrane ionic mechanisms activated by noradrenaline in cells isolated from the rabbit portal vein. *J Physiol*. 1988;404:557-73.

26. Somlyo AP. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ Res*. 1985;57(4):497–507.

27. Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev*. 1979;59(3):606–718.

28. Eggermont JA, Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F, Casteels R. Ca²⁺-transport ATPases of vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1988;62(2):266–78.

29. Koch WJ, Ellinor PT, Schwartz A. cDNA cloning of a dihydropyridine-sensitive calcium channel from rat aorta. Evidence for the existence of alternatively spliced forms. *J Biol Chem*. 1990;265(29):17786–91.

30. Morel N, Buryi V, Feron O, Gomez JP, Christen MO, Godfraind T. The action of calcium channel blockers on recombinant L-type calcium channel α 1-subunits. *Br J Pharmacol*. 1998;125(5):1005–12.

31. Godfraind T, Salomone S, Dessy C, Verhelst B, Dion R, Schoevaerts JC. Selectivity scale of calcium antagonists in the human cardiovascular system based on in vitro studies. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20 Suppl 5:S34-41.

32. Godfraind T. Discovery and Development of Calcium Channel Blockers. *Front Pharmacol*. 2017;8:286.

-
33. Hill MA, Meininger GA. Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol.* 1994;267(3 Pt 2):H1085-1092.
 34. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol.* 2017;7(2):485–581.
 35. González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D et al. K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol.* 2012;2(3):2087-149.
 36. Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Sumino S, Kato A, Sugimoto T. Phasic contractions of canine and human coronary arteries induced by potassium channel blockers. *Jpn Heart J.* 1986;27(5):727–40.
 37. Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:385–99.
 38. Asano M, Masuzawa-Ito K, Matsuda T. Charybdotoxin-sensitive K⁺ channels regulate the myogenic tone in the resting state of arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1993;108(1):214–22.
 39. Jackson WF, Blair KL. Characterization and function of Ca(2⁺)-activated K⁺ channels in arteriolar muscle cells. *Am J Physiol.* 1998;274(1):H27-34.
 40. Ashcroft FM, Gribble FM. Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Neurosci.* 1998;21(7):288–94.
 41. Clapp LH, Davey R, Gurney AM. ATP-sensitive K⁺ channels mediate vasodilation produced by lemakalim in rabbit pulmonary artery. *Am J Physiol.* 1993;264(6 Pt 2):H1907-1915.
 42. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991;21(4):361–74.
 43. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10(1):4-18.
 44. da Silva GM, da Silva MC, Nascimento DVG, Lima Silva EM, Gouvêa FFF, de França Lopes LG, et al. Nitric Oxide as a Central Molecule in Hypertension: Focus on the Vasorelaxant Activity of New Nitric Oxide Donors. *Biology.* 2021;10(10):1041.

45. Böhme E, Grossmann G, Herz J, Mülsch A, Spies C, Schultz G. Regulation of cyclic GMP formation by soluble guanylate cyclase: stimulation by NO-containing compounds. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 1984;17:259–66.
46. Wood LM, Owen DA. A comparison of vasodilator activity of agents activating cyclic nucleotides with those inhibiting their metabolism in rabbit isolated ear artery. *Br J Pharmacol.* 1989;96(3):718-24.
47. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000;184(3):409–20.
48. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(6):387–96.
49. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 2003;112(6):819-29.
50. Earley S, Brayden JE. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev.* 2015;95(2):645–90.
51. Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pásztor ET, Erdei N, Czikora A, et al. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol.* 2008;73(5):1405–12.
52. Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2008;28(24):6231–8.
53. Ho WSV, Zheng X, Zhang DX. Role of endothelial TRPV4 channels in vascular actions of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol. *Br J Pharmacol.* 2015;172(22):5251–64.
54. Gonzales AL, Yang Y, Sullivan MN, Sanders L, Dabertrand F, Hill-Eubanks DC, et al. A PLC γ 1-dependent, force-sensitive signaling network in the myogenic constriction of cerebral arteries. *Sci Signal.* 2014;7(327):ra49. doi:

-
55. Johnson CD, Melanaphy D, Purse A, Stokesberry SA, Dickson P, Zholos AV. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(6):H1868-1877.
56. Kochukov MY, Balasubramanian A, Noel RC, Marrelli SP. Role of TRPC1 and TRPC3 channels in contraction and relaxation of mouse thoracic aorta. *J Vasc Res*. 2013;50(1):11–20.
57. Kwan HY, Shen B, Ma X, Kwok YC, Huang Y, Man YB, et al. TRPC1 associates with BK(Ca) channel to form a signal complex in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2009;104(5):670–8.
58. Peppiatt-Wildman CM, Albert AP, Saleh SN, Large WA. Endothelin-1 activates a Ca^{2+} -permeable cation channel with TRPC3 and TRPC7 properties in rabbit coronary artery myocytes. *J Physiol*. 2007;580(Pt.3):755-64.
59. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, et al. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J*. 2008;27(23):3092–103.
60. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch*. 2012;464(5):425–58.
61. Earley S. TRPA1 channels in the vasculature. *Br J Pharmacol*. 2012;167(1):13–22.
62. Gawalska A, Kołaczowski M, Bucki A. Structural Modeling of TRPA1 Ion Channel-Determination of the Binding Site for Antagonists. *Mol Basel Switz*. 2022;27(10):3077.
63. Liu C, Reese R, Vu S, Rougé L, Shields SD, Kakiuchi-Kiyota S, et al. A Non-covalent Ligand Reveals Biased Agonism of the TRPA1 Ion Channel. *Neuron*. 2021;109(2):273-284.e4.
64. Meents JE, Ciotu CI, Fischer MJM. TRPA1: a molecular view. *J Neurophysiol*. 2019;121(2):427–43.
65. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 2006;124(6):1269–82.

-
66. Lee LY, Hsu CC, Lin YJ, Lin RL, Khosravi M. Interaction between TRPA1 and TRPV1: Synergy on pulmonary sensory nerves. *Pulm Pharmacol Ther.* 2015;35:87–93.
67. Staruschenko A, Jeske NA, Akopian AN. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem.* 2010;285(20):15167–77.
68. Earley S, Gonzales AL, Crnich R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. *Circ Res.* 2009;104(8):987-94.
69. Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, et al. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2011;31(5):350–8.
70. Nassini R, Pedretti P, Moretto N, Fusi C, Carnini C, Facchinetti F, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLoS One.* 2012;7(8):e42454.
71. Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L, et al. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PloS One.* 2012;7(5):e38005.
72. Kaji I, Karaki S ichiro, Kuwahara A. Effects of luminal thymol on epithelial transport in human and rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(6):G1132-1143.
73. Kochukov MY, McNearney TA, Fu Y, Westlund KN. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(3):C424-432.
74. Andrei SR, Sinharoy P, Bratz IN, Damron DS. TRPA1 is functionally co-expressed with TRPV1 in cardiac muscle: Co-localization at z-discs, costameres and intercalated discs. *Channels (Austin).* 2016;10(5):395-409./
75. Qian X, Francis M, Solodushko V, Earley S, Taylor MS. Recruitment of dynamic endothelial Ca²⁺ signals by the TRPA1 channel activator AITC in rat cerebral arteries. *Microcirculation.* 2013;20(2):138-48.

-
76. Leffler A, Lattrell A, Kronewald S, Niedermirtl F, Nau C. Activation of TRPA1 by membrane permeable local anesthetics. *Mol Pain*. 2011;7:62.
77. Petitjean H, Héberlé E, Hilfiger L, Łapieś O, Rodrigue G, Charlet A. TRP channels and monoterpenes: Past and current leads on analgesic properties. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:945450.
78. Cordero-Morales JF, Gracheva EO, Julius D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(46):E1184-91.
79. Bessac BF, Jordt SE. Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiol Bethesda Md*. 2008;23:360–70.
80. Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, et al. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol CB*. 2005;15(10):929–34.
81. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 2004;41(6):849–57.
82. Chandrabalan A, McPhillie MJ, Morice AH, Boa AN, Sadofsky LR. N-Cinnamoylanthranilates as human TRPA1 modulators: Structure-activity relationships and channel binding sites. *Eur J Med Chem*. 2019;170:141–56.
83. Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JAJ, Damann N, et al. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1293–9.
84. Woll KA, Skinner KA, Gianti E, Bhanu NV, Garcia BA, Carnevale V, et al. Sites Contributing to TRPA1 Activation by the Anesthetic Propofol Identified by Photoaffinity Labeling. *Biophys J*. 2017;113(10):2168-2172.
85. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2008;28(10):2485–94.

-
86. Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci.* 2006;32(4):335–43.
87. Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2005;25(16):4052–61.
88. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13525-30.
89. McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, DiDomenico S, Kort ME, Kym PR. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Mol Pain.* 2010;6:14.
90. Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain.* 2007;3:40.
91. Chen J, Joshi SK, DiDomenico S, Perner RJ, Mikusa JP, Gauvin DM, et al. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain.* 2011;152(5):1165–72.
92. Zhao JF, Shyue SK, Kou YR, Lu TM, Lee TS. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Involved in Atherosclerosis and Macrophage-Foam Cell Formation. *Int J Biol Sci.* 2016;12(7):812-23.
93. Wang Z, Xu Y, Wang M, Ye J, Liu J, Jiang H, et al. TRPA1 inhibition ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *EBioMedicine.* 2018 Oct;36:54-62.
94. Wang Z, Ye D, Ye J, Wang M, Liu J, Jiang H, et al. The TRPA1 Channel in the Cardiovascular System: Promising Features and Challenges. *Front Pharmacol.* 2019;10:1253.
95. Lu Y, Piplani H, McAllister SL, Hurt CM, Gross ER. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Activation within the Cardiac Myocyte Limits Ischemia-reperfusion Injury in Rodents. *Anesthesiology.* 2016;125(6):1171–80.

-
96. Conklin DJ, Guo Y, Nystoriak MA, Jagatheesan G, Obal D, Kilfoil PJ, et al. TRPA1 channel contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;316(4):H889–99.
97. Subramanian U, Nagarajan D. All-Trans Retinoic Acid supplementation prevents cardiac fibrosis and cytokines induced by Methylglyoxal. *Glycoconj J*. 2017;34(2):255–65.
98. Oguri G, Nakajima T, Yamamoto Y, Takano N, Tanaka T, Kikuchi H, et al. Effects of methylglyoxal on human cardiac fibroblast: roles of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307(9):H1339–52.
99. Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(1):7–25.
100. Kurhanewicz N, McIntosh-Kastrinsky R, Tong H, Ledbetter A, Walsh L, Farraj A, et al. TRPA1 mediates changes in heart rate variability and cardiac mechanical function in mice exposed to acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;324:51–60.
101. Pozsgai G, Bodkin JV, Graepel R, Bevan S, Andersson DA, Brain SD. Evidence for the pathophysiological relevance of TRPA1 receptors in the cardiovascular system in vivo. *Cardiovasc Res*. 2010;87(4):760–8.
102. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(34):12248–52.
103. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985;313(5997):54–6.
104. Kunkler PE, Ballard CJ, Oxford GS, Hurley JH. TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *Pain*. 2011;152(1):38–44.
105. Yanaga A, Goto H, Nakagawa T, Hikiami H, Shibahara N, Shimada Y. Cinnamaldehyde induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated rat aorta. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(12):2415–8.

-
106. Bodkin JV, Thakore P, Aubdool AA, Liang L, Fernandes ES, Nandi M, et al. Investigating the potential role of TRPA1 in locomotion and cardiovascular control during hypertension. *Pharmacol Res Perspect*. 2014;2(4):e00052.
107. Rivera-Mancilla E, Al-Hassany L, Marynissen H, Bamps D, Garrelds IM, Cornette J, Danser AHJ, Villalón CM, de Hoon JN, MaassenVanDenBrink A. Functional Analysis of TRPA1, TRPM3, and TRPV1 Channels in Human Dermal Arteries and Their Role in Vascular Modulation. *Pharmaceuticals*. 2024; 17(2):156.
108. Sullivan MN, Gonzales AL, Pires PW, Bruhl A, Leo MD, Li W, et al. Localized TRPA1 channel Ca^{2+} signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. *Sci Signal*. 2015;8(358):ra2.
109. Navedo MF, Amberg GC, Votaw VS, Santana LF. Constitutively active L-type Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11112–7.
110. Gurkoff G, Shahlaie K, Lyeth B, Berman R. Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(7):788-812.
111. Pollesello P, Mebazaa A. ATP-dependent potassium channels as a key target for the treatment of myocardial and vascular dysfunction. *Curr Opin Crit Care*. 2004;10(6):436-41.
112. Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MDM, Lima FC, Lahlou S, Magalhães PJC, et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010;24(3):341–50.
113. de Alencar Silva A, de Moraes LP, de Sena Bastos CM, de Menezes Dantas D, Batista PR, Dias FJ, et al. Vasorelaxant effect of phenylpropanoids: Methyl eugenol and eugenol in human umbilical cord vein. *Biomed Pharmacother*. 2024;178:117227.
114. Pereira-de-Moraes L, Alencar Silva A, Sena Bastos CM, Dias FJ, Menezes Dantas D, Araújo MC, da Silva RER, Ferreira-da-Silva FW, Barbosa R, Leal-Cardoso JH. Citral relaxes umbilical vessels of normotensive and preeclamptic parturients. *Placenta*. 2024;152:65-71.
115. Evaristo Rodrigues da Silva R, de Alencar Silva A, Pereira-de-Moraes L, de Sousa Almeida N, Iriti M, Kerntopf MR, et al. Relaxant Effect of Monoterpene (-)-Carveol on Isolated Human Umbilical Cord Arteries and the Involvement of Ion Channels. *Molecules*. 2020;25(11):2681.

-
116. Bouyahya A, Chamkhi I, Benali T, Guaouguaou FE, Balahbib A, El Omari N, et al. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. *J Ethnopharmacol.* 2021;265:113318. doi: 10.1016/j.jep.2020.113318.
117. Sarer E, Scheffer JJ, Baerheim Svendsen A. Monoterpenes in the essential oil of *Origanum majorana*. *Planta Med.* 1982;46(4):236-9.
118. De Vincenzi M, Stamatii A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia.* 2004;75(7–8):801–4.
119. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Del Mar Contreras M, et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res PTR.* 2018;32(9):1675–87.
120. Imran M, Aslam M, Alsagaby SA, Saeed F, Ahmad I, Afzaal M, et al. Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Sci Nutr.* 2022;10(11):3544–61.
121. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001;91(3):453-62.
122. Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou-Litina D, Skaltsa H. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* 2006;72(14):1330–4.
123. Hotta M, Nakata R, Katsukawa M, Hori K, Takahashi S, Inoue H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *J Lipid Res.* 2010;51(1):132–9.
124. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2011;30(1):41–50.
125. Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula dhas K, Kamaraj S, et al. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem.* 2012;360(1–2):51–60.

-
126. Trailović SM, Marjanović DS, Nedeljković Trailović J, Robertson AP, Martin RJ. Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitol Res.* 2015;114(8):3059–68.
127. Aydin Y, Kutlay O, Ari S, Duman S, Uzuner K, Aydin S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Med.* 2007;73(13):1365–71.
128. Gonçalves TAF, Lima VS, de Almeida AJPO, de Arruda AV, Veras ACMF, Lima TT, et al. Carvacrol Improves Vascular Function in Hypertensive Animals by Modulating Endothelial Progenitor Cells. *Nutrients.* 2023;15(13):3032.
129. Dias CJ, Costa HA, Alves Dias-Filho CA, Ferreira AC, Rodrigues B, Irigoyen MC, et al. Carvacrol reduces blood pressure, arterial responsiveness and increases expression of MAS receptors in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2022;917:174717.
130. Testai L, Chericoni S, Martelli A, Flamini G, Breschi MC, Calderone V. Voltage-operated potassium (Kv) channels contribute to endothelium-dependent vasorelaxation of carvacrol on rat aorta. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(9):1177-83.
131. Đukanović Đ, Bojić MG, Marinković S, Trailović S, Stojiljković MP, Škrbić R. Vasorelaxant effect of monoterpene carvacrol on isolated human umbilical artery. *Can J Physiol Pharmacol.* 2022;100(8):755–62.
132. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci.* 2006;9(5):628-35.
133. Murphy TV, Kanagarajah A, Toemoe S, Bertrand PP, Grayson TH, Britton FC, et al. TRPV3 expression and vasodilator function in isolated uterine radial arteries from non-pregnant and pregnant rats. *Vascul Pharmacol.* 2016;83:66–77.
134. Leelananda SP, Lindert S. Computational methods in drug discovery. *Beilstein J Org Chem.* 2016;12:2694–718.
135. Gagić Ž. In silico metode u otkriću novih molekula kao potencijalnih lijekova. Prvo izdanje. Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci. 2022.

-
136. Hung CL, Chen CC. Computational approaches for drug discovery. *Drug Dev Res.* 2014;75(6):412-8.
137. Hospital A, Goni JR, Orozco M, Gelpi JL. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Adv Appl Bioinform Chem.* 2015;8:37-47.
138. Villoutreix BO, Eudes R, Miteva MA. Structure-based virtual ligand screening: recent success stories. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2009;12(10):1000-16..
139. Loving K, Alberts I, Sherman W. Computational approaches for fragment-based and de novo design. *Curr Top Med Chem.* 2010;10(1):14-32.
140. Guner O. History and evolution of the pharmacophore concept in computer-aided drug design. *Current topics in medicinal chemistry.* 2002;2(12):1321-32.
141. Hamza A, Wei NN, Zhan CG. Ligand-based virtual screening approach using a new scoring function. *J Chem Inf Model.* 2012;52(4):963-74.
142. Winkler DA. The role of quantitative structure--activity relationships (QSAR) in biomolecular discovery. *Brief Bioinform.* 2002;3(1):73--86.
143. Verma J, Khedkar VM, Coutinho EC. 3D-QSAR in drug design--a review. *Curr Top Med Chem.* 2010;10(1):95--115.
144. Roy K, Kar S, Das R.N. Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment. Academic Press, 2015, pp. 53.
145. Eriksson L, Jaworska J, Worth AP, Cronin MT, McDowell RM, Gramatica P. Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. *Environ Health Perspect.* 2003;111(10):1361-75.
146. Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;22(5):717--27.
147. Pratim Roy P, Paul S, Mitra I, Roy K. On two novel parameters for validation of predictive QSAR models. *Mol Basel Switz.* 2009;14(5):1660--701.

-
148. Veerasamy R, Rajak H, Jain A, Sivadasan S, Christopher PV, Agrawal R. Validation of QSAR Models - Strategies and Importance. *Int J Drug Des Discov*. 2011;2:511–9.
149. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4331.
150. Arnittali M, Rissanou AN, Harmandaris V. Structure of biomolecules through molecular dynamics simulations. *Procedia Comput. Sci*. 2019, 156, 69–78.
151. Đukanović Đ, Suručić R, Bojić MG, Trailović SM, Škrbić R, Gajić Ž. Design of Novel TRPA1 Agonists Based on Structure of Natural Vasodilator Carvacrol-In Vitro and In Silico Studies. *Pharmaceutics*. 2024;16(7):951.
152. Ballard P, Brassil P, Bui KH, Dolgos H, Petersson C, Tunek A, et al. The right compound in the right assay at the right time: an integrated discovery DMPK strategy. *Drug Metab Rev*. 2012;44(3):224–52.
153. Wang Y, Xing J, Xu Y, Zhou N, Peng J, Xiong Z, et al. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Q Rev Biophys*. 2015;48(4):488–515.
154. Đukanović Đ, Gajić M, Škrbić R. Time-dependent and force-dependent vasoreactivity of isolated human umbilical arteries. *Scr Med* 2020;51(3):134-40.
155. Quan A, Leung SWS, Lao TT, Man RYK. 5-hydroxytryptamine and thromboxane A2 as physiologic mediators of human umbilical artery closure. *J Soc Gynecol Investig*. 2003;10(8):490–5.
156. Boersma JJ, Janzen KM, Oliveira L, Crankshaw DJ. Characterization of excitatory prostanoid receptors in the human umbilical artery in vitro. *Br J Pharmacol*. 1999;128(7):1505-12.
157. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J Comput Chem*. 1989;10(2):221–64.
158. Santos CB, Lobato C, Braga F, Morais S, Santos C, Fernandes C, et al. Application of Hartree-Fock Method for Modeling of Bioactive Molecules Using SAR and QSPR. *Comput Mol Biosci*. 2014;4:1–24.

-
159. Netzeva TI, Worth A, Aldenberg T, Benigni R, Cronin MT, Gramatica P, et al. Current status of methods for defining the applicability domain of (quantitative) structure-activity relationships. The report and recommendations of ECVAM Workshop 52. *Altern Lab Anim.* 2005;33(2):155-73.
160. Gramatica P. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR & Combinatorial Science.* 2007;26(5):694-701.
161. Roy K, Kar S, Ambure P. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 2015;145:22-9.
162. Estañ L, Abad A, Morales-Olivas FJ, Serra-Serra V. Isolated human chorionic vascular reactivity: technical considerations for fresh preparations. *Gen Pharmacol.* 1998;30(1):89-93.
163. Hussain A, Bennett RT, Chaudhry MA, Qadri SS, Cowen M, Morice AH, et al. Characterization of optimal resting tension in human pulmonary arteries. *World J Cardiol.* 2016;8(9):553-558.
164. Abad A, Estañ L, Morales-Olivas FJ, Serra V. Reactivity of isolated human chorionic vessels: analysis of some influencing variables. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003c;81(12):1147-51.
165. Bertrand C, Duperron L, St-Louis J. Umbilical and placental vessels: modifications of their mechanical properties in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168(5):1537-46.
166. Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Unal M, Polat G, Kayhan Z, Oğuş E. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life Sci.* 2003 Feb 7;72(12):1321-9.
167. Dayioglu E, Buharalioglu CK, Saracoglu F, Akar F. The effects of bumetanide on human umbilical artery contractions. *Reprod Sci.* 2007;14(3):246-52.
168. Altura BM, Malaviya D, Reich CF, Orkin LR. Effects of vasoactive agents on isolated human umbilical arteries and veins. *Am J Physiol.* 1972;222(2):345-55.
169. Monuszko E, Halevy S, Freese K, Liu-Barnett M, Altura B. Vasoactive actions of local anaesthetics on human isolated umbilical veins and arteries. *Br J Pharmacol.* 1989;97(2):319-28.

-
170. Templeton AG, McGrath JC, Whittle MJ. The role of endogenous thromboxane in contractions to U46619, oxygen, 5-HT and 5-CT in the human isolated umbilical artery. *Br J Pharmacol.* 1991;103(1):1079-84.
171. Kleszczewski T, Buzun L, Lisowska A, Modzelewska B. Potassium induced contraction of the internal thoracic artery in vitro is time related: the potential consequences in the analysis of the mechanism of the spasm after coronary artery bypass grafting and in the analysis of the results of in vitro studies. *Heart Vessels.* 2016;31(4):616–21.
172. Wright G. Use-dependent decline in rat aorta sensitivity to contraction by potassium. *Can J Physiol Pharmacol.* 1991;69(7):921–8.
173. Jones JB, Rowsell A. Fetal 5-hydroxytryptamine levels in late pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1973;80(8):687–9.
174. Bertrand C, St-Louis J. Reactivities to serotonin and histamine in umbilical and placental vessels during the third trimester after normotensive pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(3 Pt 1):650-9.
175. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ. Melatonin suppresses homocysteine enhancement of serotonin-induced vasoconstriction in the human umbilical artery. *J Pineal Res.* 2001;31(3):242-7.
176. Lorente I, Ocete MA, Zarzuelo A, Cabo MM, Jimenez J. Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *J Nat Prod.* 1989;52(2):267-72.
177. White RP. Comparison of vasorelaxants in human basilar arteries and umbilical arteries. *Eur J Pharmacol.* 1988;155(1–2):109–15.
178. Lovren F, Li XF, Lytton J, Triggle C. Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. *Br J Pharmacol.* 1999;127(5):1247-55.
179. Gupta S, Hanff LM, Visser W, Steegers EAP, Saxena PR, Vulto AG, et al. Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens.* 2006;24(7):1345–53.

180. Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann Endocrinol*. 2021;82(3–4):193–7.
181. Lorigo M, Oliveira N, Cairrao E. Clinical Importance of the Human Umbilical Artery Potassium Channels. *Cells*. 2020;9(9):1956.
182. Sadanaga T, Ohya Y, Ohtsubo T, Goto K, Fujii K, Abe I. Decreased 4-aminopyridine sensitive K⁺ currents in endothelial cells from hypertensive rats. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens*. 2002;25(4):589–96.
183. Gollasch M, Nelson MT. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in arterial smooth muscle cells. *Kidney Blood Press Res*. 1997;20(6):355–71.
184. Dantas BPV, Alves QL, de Assis KS, Ribeiro TP, de Almeida MM, de Vasconcelos AP, et al. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascul Pharmacol*. 2015;67–69:48–58.
185. Pereira SL, Marques AM, Sudo RT, Kaplan MA, Zapata-Sudo G. Vasodilator activity of the essential oil from aerial parts of *Pectis brevipedunculata* and its main constituent citral in rat aorta. *Molecules*. 2013;18(3):3072–85.
186. Pereira-Gonçalves Á, Ferreira-da-Silva FW, de Holanda-Angelin-Alves CM, Cardoso-Teixeira AC, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH. 1,8-Cineole blocks voltage-gated L-type calcium channels in tracheal smooth muscle. *Pflugers Arch*. 2018;470(12):1803–13.
187. Marom M, Hagalili Y, Sebag A, Tzvier L, Atlas D. Conformational changes induced in voltage-gated calcium channel Cav1.2 by BayK 8644 or FPL64176 modify the kinetics of secretion independently of Ca²⁺ influx. *J Biol Chem*. 2010;285(10):6996–7005.
188. Cardoso-Teixeira AC, Ferreira-da-Silva FW, Peixoto-Neves D, Oliveira-Abreu K, Pereira-Gonçalves Á, Coelho-de-Souza AN, et al. Hydroxyl Group and Vasorelaxant Effects of Perillyl Alcohol, Carveol, Limonene on Aorta Smooth Muscle of Rats. *Mol Basel Switz*. 2018;23(6):1430.
189. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(5):1788–92.

-
190. Craighead DH, McCartney NB, Tumlinson JH, Alexander LM. Mechanisms and time course of menthol-induced cutaneous vasodilation. *Microvasc Res.* 2017;110:43–7.
191. Jin L, Jagatheesan G, Guo L, Nystoriak M, Malovichko M, Lorkiewicz P, et al. Formaldehyde Induces Mesenteric Artery Relaxation via a Sensitive Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRPA1) and Endothelium-Dependent Mechanism: Potential Role in Postprandial Hyperemia. *Front Physiol.* 2019;10:277.
192. Sun C, Zhang L, Zhang M, Wang J, Rong S, Lu W, et al. Zinc pyrithione induces endothelium-dependent hyperpolarization-mediated mesenteric vasorelaxation in healthy and colitic mice. *Biochem Pharmacol.* 2023;217:115828.
193. Jin L, Lorkiewicz P, Xie Z, Bhatnagar A, Srivastava S, Conklin DJ. Acrolein but not its metabolite, 3-Hydroxypropylmercapturic acid (3HPMA), activates vascular transient receptor potential Ankyrin-1 (TRPA1): Physiological to toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;426:115647.
194. Aubdool AA, Kodji X, Abdul-Kader N, Heads R, Fernandes ES, Bevan S, et al. TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilatation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. *Br J Pharmacol.* 2016;173(15):2419–33.
195. Bamps D, Blockeel AJ, Dreesen E, Marynissen H, Laenen J, Van Hecken A, et al. TRPA1 Antagonist LY3526318 Inhibits the Cinnamaldehyde-Evoked Dermal Blood Flow Increase: Translational Proof of Pharmacology. *Clin Pharmacol Ther.* 2023;114(5):1093-1103.
196. Mihai DP, Nitulescu GM, Ion GND, Ciotu CI, Chirita C, Negres S. Computational Drug Repurposing Algorithm Targeting TRPA1 Calcium Channel as a Potential Therapeutic Solution for Multiple Sclerosis. *Pharmaceutics.* 2019;11(9):446.
197. Prampolini G, Campetella M, Ferretti A. Solvent effects on catechol's binding affinity: investigating the role of the intra-molecular hydrogen bond through a multi-level computational approach. *Phys Chem Chem Phys.* 2023;25(3):2523-2536.
198. Callear SK, Johnston A, McLain SE, Imberti S. Conformation and interactions of dopamine hydrochloride in solution. *J Chem Phys.* 2015;142(1):014502.

-
199. Niu C, Sun X, Hu F, Tang X, Wang K. Molecular determinants for the chemical activation of the warmth-sensitive TRPV3 channel by the natural monoterpene carvacrol. *J Biol Chem.* 2022;298(3):101706.
200. Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature.* 2015;525(7570):552.
201. Sadakiyo M, Yamada T, Kitagawa H. Hydroxyl group recognition by hydrogen-bonding donor and acceptor sites embedded in a layered metal-organic framework. *J Am Chem Soc.* 2011;133(29):11050-3.
202. Mukaiyama M, Usui T, Nagumo Y. Non-electrophilic TRPA1 agonists, menthol, carvacrol and clotrimazole, open epithelial tight junctions via TRPA1 activation. *J Biochem (Tokyo).* 2020;168(4):407–15.

LISTA SKRAĆENICA

<i>Skraćenica</i>	<i>Engleski</i>	<i>Srpski</i>
$\bar{r}_m^2$	Average r_m^2	srednji r_m^2
4-AP	4 – Aminopyridine	4 – aminopiridin
4-ONE	4-Oxo-2-Nonetal	4-okso-2-nonenal
5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamine)	serotonin
AC	Adenylate cyclase	adenil ciklaza
ADMET	Absorption Distribution Metabolism Excretion Toxicity	apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost
Ala	Alanine	alanin
ANN	Artificial Neural Network	vještačke neuronske mreže
BaCl ₂	Barium Chloride	barijum hlorid
BK _{Ca}	Big K _{Ca}	K _{Ca} velike provodljivosti
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	ciklični adenzin monofosfat
cGMP	Cyclic Guanosine Monophosphate	ciklični guanozin monofosfat
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide	peptid sličan kalcitoninu
CLACC	Consistently Large Auto and Cross Correlation	dosljedno velika unakrsna i autovalidacija
COMT	Catechol-O-Methyltransferase	katehol O-metiltransferaza
DAG	Diacylglycerol	diacilglicerol
eNOS	Endothelial Nitrogen Monoxide Synthase	endotelna NO sintetaza
ER	Endoplasmic reticulum	endoplazmatični retikulum
FFD	Fractional Factorial Design	frakcioni faktorski dizajn
GC	Guanylate Cyclase	guanozil ciklaza
GLB	Glibenclamide	glibenklamid
Gln	Glutamine	glutamin
GPCR	G Protein-Coupled Receptor	receptor vezan sa G proteinom
GRIND	Grid – Independent Descriptors	mreža – nezavisnih deskriptora

H ₂ O ₂	Hydrogen Peroxide	hidrogen peroksid
HMA	Human Mesenteric Artery	humane mezenterične arterije
HUA	Human Umbilical Artery	humane umbilikalne arterije
IK _{Ca}	Intermediate K _{Ca}	K _{Ca} srednje provodljivosti
Ile	Isoleucine	izoleucin
IP ₃	Inositol 1,4,5-Trisphosphate	inozitol 1,4,5-trifosfat
IPP	Isopentenyl Pyrophosphate	izopentenil pirofosfat
K _{ATP}	ATP-sensitive Potassium Channels	ATP – zavisni kalijumski kanali
K _{Ca}	Calcium-Activated Potassium Channels	kalcijum zavisni kalijumski kanali
KCl	Potassium Chloride	kalijum hlorid
K _v	Voltage Gated Potassium Channel	voltažno zavisni kalijumski kanali
Leu	Leucine	leucin
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin Methylester	N-nitro-L-arginin metilestar
LOO	Leave One Out	izostavi jednog
LV	Latent Variable	latentna varijabla
MLR	Multiple Linear Regression	multipla linearna regresija
NCP	Nicardipine	nikardipin
NO	Nitrogen Monoxide	azot-monoksid
OTC	Over The Counter	bezreceptni lijekovi
PDB	Protein Data Bank	proteinska banka podataka
Phe	Phenylalanine	fenilalanin
PKA	Protein Kinase A	protein kinaza A
PKC	Protein Kinase C	protein kinaza C
PKG	Protein Kinase G	protein kinaza G
PLC	Phospholipase C	fosfolipaza C
PLS	Partial Least Squares Regression	metoda parcijalnih najmanjih kvadrata
PRESS	Predicted Residual Sum of Squares	rezidualne sume kvadrata
Q ²	Cross-Validated Coefficient of Determination	validacioni regresioni faktor

QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship	kvantitativni odnos strukture i aktivnosti
r_m^2	Reverse r_m^2	povratni r_m^2
R^2	Coefficient of Determination	koeficijent determinacije
r_m^2	Metrics Parameters	metrički parametri
R_{pred}^2	Predictive Correlation Coefficient	prediktivni koeficijent korelacije
RMSD	Root Mean Square Deviation	srednji kvadrat devijacije
RMSE	Root-Mean-Square Error	greška predviđanja modela
SEM	Standard Error of Mean	standardna greška srednje vrednosti
Ser	Serine	serin
SK _{Ca}	Small K _{Ca}	K _{Ca} male provodljivosti
TEA	Tetraethylammonium	tetraetilamonijum
TRP Channels	Transient Receptor Potential Channels	tranzicijski receptorski potencijalni kanali
TRPA	TRP ankyrin	TRP ankirin
TRPC	TRP canonical	TRP kanonikal
TRPM	TRP melanostatin	TRP melanostatin
TRPML	TRP mucolipin	TRP mukolipin
TRPP	TRP polycystin	TRP policistin
TRPV	TRP vanilloid	TRP vaniloid
two-way ANOVA	Two-Way Analysis of Variance	dvosmjerna analiza varijacije
Tyr	Tyrosine	tirozin
VGCC	Voltage Gated Calcium Channels	voltažno zavisni kalcijumski kanali
Δr_m^2	Delta r_m^2	delta r_m^2

BIOGRAFIJA

Dorđe Đukanović rođen je 06.10.1995. godine u Banjoj Luci. Osnovnu školu „Sveti Sava” Banja Luka završio je kao nosilac Vukove diplome, a zatim je odličnim uspjehom završio i Medicinsku školu u Banjoj Luci. Studijski program farmacija na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Banjoj Luci upisao je 2014. godine, a diplomirao je u junu 2019. godine sa prosječnom ocjenom 9,64, stekavši zvanje master farmacije. Za izuzetan uspjeh tokom dodiplomskih studija nagrađen je kao najbolji student generacije Medicinskog fakulteta zlatnom značkom „Nikola Tesla” od strane Univerziteta u Banjoj Luci i „Velikom zlatnom značkom” od strane Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Obavio je pripravnički staž u trajanju od 12 mjeseci, a zatim položio stručni ispit i ispit za licencu za samostalan rad magistra farmacije. Od maja 2020. godine zaposlen je u Centru za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, a zatim je u julu 2022. godine izabran u zvanje asistenta na Katedri za farmaceutsku hemiju.

Studijski program III ciklusa akademskih studija, smjer Biomedicinske nauke na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci upisao je školske 2020/2021. godine i tokom studija imao prosjek ocjena 9,82.

Autor je i koautor velikog broja naučnih radova objavljenih u međunarodnim i domaćim časopisima i aktivni je učesnik međunarodnih i domaćih naučnih i stručnih skupova. Učestvovao je u sprovođenju više međunarodnih i nacionalnih projekata.

Član je Farmaceutске komore u kojoj je član i Komisije za stručno usavršavanje i izdavačku djelatnost kao i glavni urednik stručnog magazina „FARMAS”.

Pored stručnog angažmana, aktivan je sportski radnik i član Bokserskog saveza Republike Srpske u kojem je koordinator za promociju boksa.

Oženjen je.

Изјава 1

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем
да је докторска дисертација

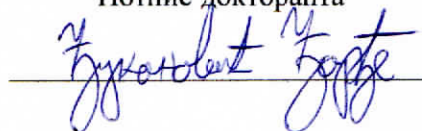
Наслов рада „Значај TRPA1 канала као циљног мјеста вазодилататорног дејства карвакрола и примјена in silico метода у дизајну нових молекула са вазодилататорним дејством”

Наслов рада на енглеском језику „The role of TRPA1 channels as a target site for the vasodilatory effect of carvacrol and the application of in silico methods in designing novel molecules with vasodilatory effects”

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

У Бањој Луци, дана 20.11.2024. године

Потпис докторанта



Изјава 2

Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом „Значај TRPA1 канала као циљног мјеста вазодилататорниг дејства карвакрола и примјена in silico метода у дизајну нових молекула са вазодилататорним дејством”

која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

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

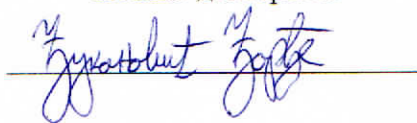
Моју докторску дисертацију похрањену у дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

- ☐ Ауторство
- ☐ Ауторство – некомерцијално
- ☐ Ауторство – некомерцијално – без прераде
- ☒ Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима
- ☐ Ауторство – без прераде
- ☐ Ауторство – дијелити под истим условима

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

У Бањој Луци, дана 20.11.2024. године

Потпис докторанта



Изјава 3

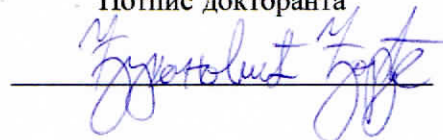
Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора	Ђорђе Ђукановић
Наслов рада	„Значај TRPA1 канала као циљног мјеста вазодилаторних дејства карвакрола и примјена <i>in silico</i> метода у дизајну нових молекула са вазодилаторним дејством”
Ментор	проф. др Жарко Гагић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, дана 20.11.2024. године

Потпис докторанта



ADDENDUM



Time-Dependent and Force-Dependent Vasoreactivity of Isolated Human Umbilical Arteries

Đorđe Đukanović,¹ Milica Gajić,¹ Ranko Škrbić¹

Abstract

Background/Aim: There have been different experimental conditions for *in vitro* studies on human umbilical arteries (HUA) in tissue bath system. This diversity was mainly reflected in variables such as stretching tension, incubation period and initial constriction challenging with potassium (KCl). The aim of the study was to establish optimal experimental conditions which will provide better responsiveness of HUA preparations, as well as to examine the impact of 24 h cold storage on viability and responsiveness of HUA to KCl and serotonin.

Methods: The KCl-induced constrictions at different stretching tensions (0.5 g, 1.0 g, 2.0 g, 4.0 g), incubation times (30 min, 60 min, 120 min), and after multiple initial constriction challenging were compared. Dose response curves for serotonin were obtained under different conditions (1.0 g and 60 min vs. 2.0 g and 120 min). The influence of 24 h cold storage on KCl- and serotonin- induced vasoconstriction of HUA preparations was examined as well.

Results: The strongest constrictions induced by serotonin or KCl were obtained when preparations were adjusted at 2.0 g and incubated for 120 min. The KCl-induced constrictions observed after 120 min were statistically higher ($p < 0.05$) when preparations were challenged three times (30 min, 60 min, 120 min), compared to those challenged only once. The preparations that were stored at 4 °C for 24 h showed significantly stronger serotonin-induced constrictions ($p < 0.01$). The cold storage had no influence on KCl-induced constriction.

Conclusion: For performing *in vitro* studies on HUA preparations in tissue bath, we propose stretching tension of 2.0 g, incubation period of 120 min and multiple initial constriction challenging with KCl as optimal experimental condition. We also showed that HUA preparations retained functional viability even after 24 h of cold storage.

Key words: Human umbilical artery; Stretching tension; Incubation time; Constriction; Serotonin.

(1) Centre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, the Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.

Correspondence:

ĐORĐE ĐUKANOVIĆ

E: djordje.djukanovic@med.unibl.org

ARTICLE INFO

Received: 25 August 2020

Accepted: 11 September 2020

Introduction

In addition to numerous animal models of pregnancy and sporadic human clinical trials, studies on isolated umbilical blood vessels have a special place in research related to pregnancy complications. The *in vitro* studies on umbilical arteries and veins allow direct assessment of vascular

reactivity of utero-placental and foeto-placental circulation.¹ However, studies on animal blood vessel preparations cannot completely replace human preparations and their pathophysiological models.² Therefore, human umbilical blood vessels are of particular importance, since they

can provide the closest possible image of the *in vivo* system. The importance of the HUA has long been recognised, and its use in research dates back to the 1950s.³ Umbilical cord is one of the few human tissues that is widely available and provides a high yield of HUA preparations.

Majority of the research studies on HUA are focused on elucidating the vascular dysfunction that occurs in preeclampsia, which is associated with an increase in utero-placental vascular resistance.⁴ It is well known that HUA are not innervated blood vessels,⁵ and that their vasoactivity is regulated exclusively by autacoids from blood circulation, such as serotonin, histamine, bradykinin, angiotensin, oxytocin, as well as by different eicosanoids.⁶ Due to the described specificity of umbilical circulation, it is assumed that these vasoactive agents may play an important role in the pathogenesis of preeclampsia.

Since it was found that mechanical properties and reactivity of umbilical blood vessels are changed in preeclampsia,^{6, 7} it is important to establish optimal experimental conditions for physiological models that will allow for the interpretation of these changes. The length and stretch of HUA preparations, the duration of incubation time, the composition of the solution to maintain the viability of the preparations and the initial constriction challenging procedures are some of the key determinants in defining the conditions that must be achieved before performing experiments in the tissue bath system. The majority of authors apply the same conditions regarding the form and length of the HUA preparation (rings, 3-4 cm long), aeration of the HUA preparation (mixture of 95 % O₂ and 5 % CO₂) and composition of the nutrient solution (Krebs-Ringer bicarbonate solution),^{6, 8-10} whereas the differences are reflected mainly in passive tension, incubation period and initial constriction challenging. Given the existence of great diversity in the application of physical properties for testing HUA vasoactivity, it is of particular importance to establish an optimisation of the tissue bath methodology that will allow better responsiveness of HUA preparations.

The aim of the study was to analyse the effects of different physical variables such as stretching tension, incubation time, initial constriction challenging and cold storage period to determine the optimal conditions for measuring the vasoactivity of isolated HUA.

Methods

Ethical principles

The present study was conducted with the approval of the Ethics Committee for Research on Humans and Biological Materials, at the Faculty of Medicine, University of Banja Luka, the Republic of Srpska, Bosnia & Herzegovina (B&H).

Tissue preparation

Umbilical cords were obtained from healthy pregnant women after full-term vaginal delivery or Caesarean section at the Clinics for Gynaecology and Obstetrics, University Clinical Centre of the Republic of Srpska (Banja Luka, B&H). After delivery, the segments of umbilical cords (5-10 cm in length) were immediately placed into the modified Krebs-Ringer bicarbonate solution and transported on the ice to the Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Centre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka. For this purpose, the modified Krebs-Ringer solution with less calcium ions than standard solution (CaCl₂ 0.16 mmol/L) was used.

The umbilical artery was cleaned of Wharton jell and the connective tissue was carefully removed. The cleaning was performed in Petri dishes filled with modified Krebs-Ringer solution on the flat ice pack. The preparation was cut into rings of 3-4 mm in length and each ring was suspended between two stainless steel wires in a jacketed tissue bath containing 20 mL Krebs-Ringer bicarbonate solution (37 °C, pH 7.4), aerated with a mixture of 95 % O₂ and 5 % CO₂.

One of the wire hooks was attached to a transducer (CH1-SN: IT) connected to the amplifier (SN:BS 007) with recording system (Fast Acquisition, Elunit Group, Serbia) that recorded changes in isometric tension, using an e-Lab software. The second wire hook was attached to a displacement unit allowing fine adjustments of passive tension (g). During equilibration time, the organ bath solution was changed every 10 minutes and tension was adjusted when necessary.

Experimental protocols

Resting tension and incubation time

In order to evaluate the optimal resting tension and incubation period for HUA preparations, the different stretching conditions and incubation times were performed to obtain maximal con-

striction induced by potassium chloride (KCl). At the beginning of experiment the rings were equilibrated unstretched in organ bath at 37°C for 30 minutes. After that, the preparations were divided in four groups and each preparation was stretched to a different resting tension: 0.5 g, 1.0 g, 2.0 g and 4.0 g. When rings reached the determined tension, KCl (40 mM) was applied in precisely defined time points: 30 min, 60 min and 120 min. Between each KCl addition, rings were washed for several times and then adjusted to a determined resting tension.

KCl-induced constriction challenge

The intention was to assess the influence of the repeated initial constriction with KCl when preparations were set on optimal resting tension of 2.0 g. After 30 min of incubation time, the preparations were stretched to a passive force of 2.0 g. One group of preparations were allowed to equilibrate for 120 min and then were exposed to KCl initial challenge (40 mM), while on the other group of preparations three initial KCl challenges (40 mM) were performed, at 30 min, 60 min and 120 min, as previously described.

Serotonin dose-response curve

The aim of this protocol was to compare the dose-response curves for serotonin in HUA preparations under different passive tension and incubation time variables. When the first incubation period of 30 min ended, the preparations were stretched and equilibrated at different conditions. One group of preparations was stretched at 1.0 g and incubated for 60 min, while the other group was stretched at 2.0 g and incubated for 120 min. All preparations were exposed to KCl (40 mM) in order to obtain a reference constriction (100 %). After several wash-out periods, when preparations achieved the stable resting tension, a cumulative concentration-response curve for serotonin (10^{-8} – 3×10^{-5} M) was obtained. At the end of each experiment, the viability of preparation was tested by challenging it with KCl-induced constriction.

Cold storage

Within this protocol the intention was to examine the effect of cold storage on HUA vasoreactivity. Optimal conditions (incubation period of 2 h and passive tension of 2.0 g) established in previous protocols were applied at HUA preparations after 24 h of cold storage at 4 °C. At the beginning of experiment, KCl-induced constrictions (40 mM)

were established and after several washing-out periods, when basal line was stable, a cumulative concentration response curves for serotonin (10^{-8} – 3×10^{-5} M) were obtained.

Drugs and solutions

A Krebs-Ringer bicarbonate solution of the following composition was used (mmol/L): NaCl 118.3, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, and glucose 5.6. All stock solutions and serial dilutions were made in distilled water and were prepared shortly before the start of each of the experiments. Serotonin was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and potassium chloride (KCl) was obtained from Lach: Ner (Zagreb, Croatia).

Statistical analysis

Results were presented as mean $\pm$ standard error (mean $\pm$ SEM) for number of preparations studied. Figures and statistical analysis were performed using SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc.). Two-way ANOVA with repeated measures was used to compare concentration-response curves for serotonin. Statistical significance between two groups was determined by Student's t-test and the p values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

Resting tension and incubation time

Preparations of HUA showed different responses to KCl at various stretching tensions and incubation periods. Preparations that were stretched at 0.5 g and incubated for 30 min did not show any response to KCl, while other preparations that were stretched at tensions of 1.0, 2.0, 4.0 g showed very weak constrictions. By prolonging the incubation time to 60 or 120 min, all preparations showed stronger constrictions than those obtained at 30 min. When preparations were stretched at tension of 2.0 and 4.0 g the constrictions were stronger than those stretched at 0.5 g, but the significance was confirmed only for 2.0 g. Further prolongation of incubation time to 120 min resulted in significant increase in constrictions for preparations stretched at tension of 2.0 and 4.0 g. However, additional increase in stretching tension of 4.0 g was not followed by stronger constriction response, as it would be expected (Figure 1).

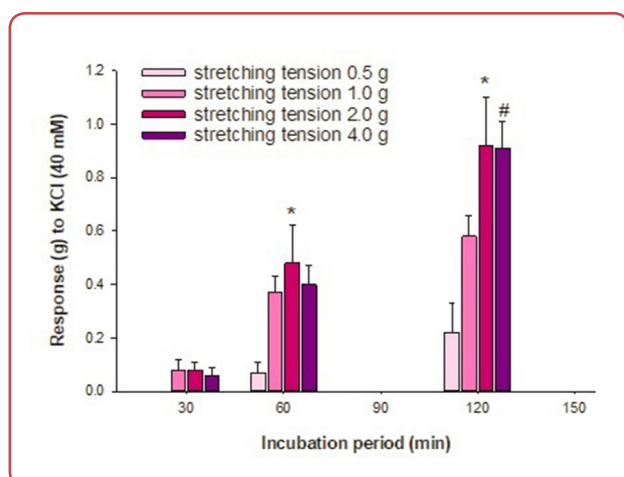


Figure 1: Comparison of KCl-induced constrictions, at a different stretching tensions and incubation periods, in human umbilical arteries *in vitro*. Preparations were adjusted at: 0.5 g ($n = 6$), 1.0 g ($n = 8$), 2.0 g ($n = 10$) or 4.0 g ($n = 6$) and each group was incubated for 30 min, 60 min and 120 min. Results (mean $\pm$ SEM) are expressed in grams of KCl-induced constriction.

* $p < 0.05$; # $p < 0.05$ (2.0 g vs. 0.5 g; 4.0 g vs. 0.5 g, respectively).

Potassium-induced constriction challenge

KCl-induced vasoconstriction (40 mM) was significantly stronger in HUA preparations that were exposed to three initial challenges (separate, non-cumulative additions of KCl at 30 min, 60 min and 120 min), compared to the preparations that were exposed to only one initial challenge (at 120 min) (Figure 2).

Serotonin dose-response curve

Concentration-response curve for serotonin, with the stretching tension of 2.0 g and incubation pe-

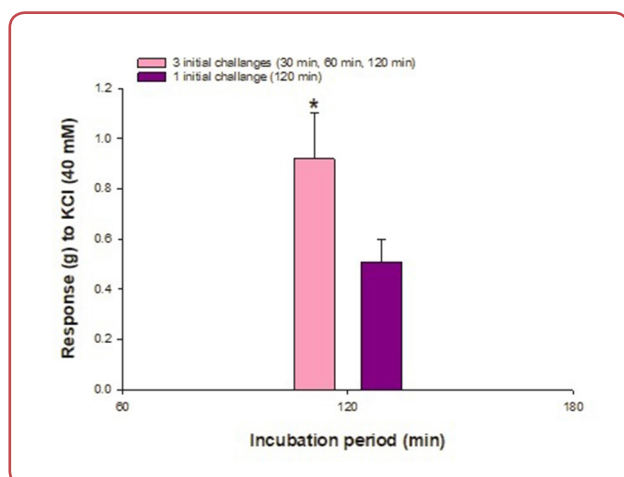


Figure 2: Comparison of KCl-induced constrictions of human umbilical arteries *in vitro*, in the absence or presence of first two initial challenges with KCl, at the optimal resting tension of 2 g. One group of preparations ($n = 10$) was exposed to three initial challenges: 30 min, 60 min and 120 min (pink bar), while the other group of preparations ($n = 6$) was exposed to one initial challenge: 120 min (purple bar). Results (mean $\pm$ SEM) are expressed in grams of KCl-induced constriction.

* $p < 0.05$ (significantly different from the respective control).

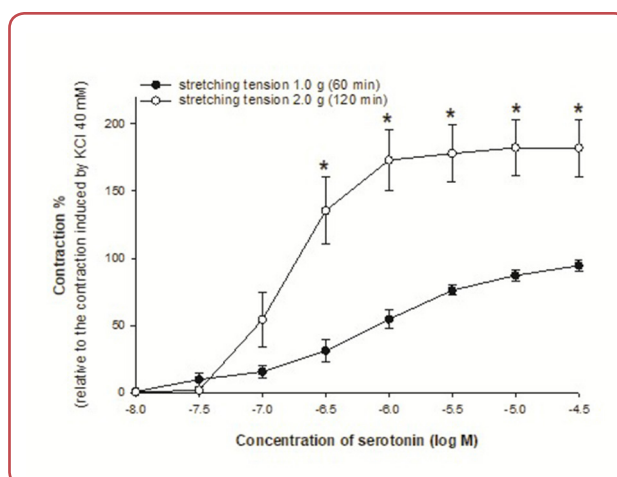


Figure 3: Comparison of concentration-response curves for serotonin, at different stretching tension and incubation time of human umbilical arteries preparations *in vitro*. Results (mean $\pm$ SEM) are expressed in percentage of reference KCl-induced constriction.

* $p < 0.001$ (significantly different from the respective control).

riod of 120 min, showed a significantly stronger ($p < 0.001$) constrictions compared to the concentration-response curve at stretching tension of 1.0 g and incubation period of 60 min (Figure 3).

Cold storage

Preparations that were stored at the temperature of 4 °C for 24 h did not show any significant difference in the magnitude of the KCl-induced constriction compared to the preparations of HUA that were used as fresh preparations, without cold storage (Figure 4).

Serotonin-induced constrictions were significantly stronger ($p < 0.01$) in cold-stored HUA preparations. Concentration-response curves for serotonin indicated higher efficacy of serotonin

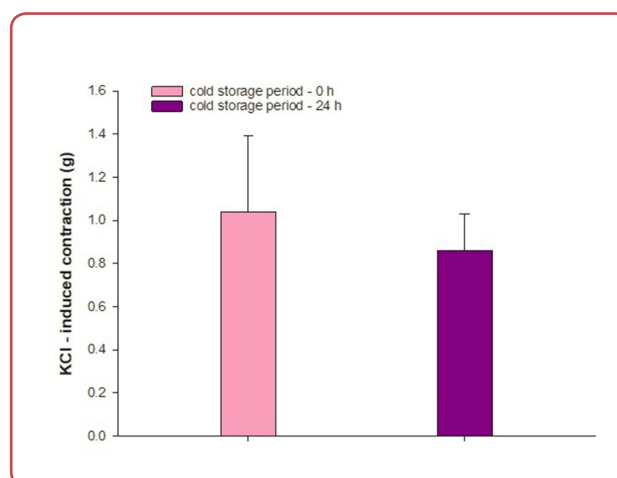


Figure 4: Comparison of KCl-induced constrictions of human umbilical arteries *in vitro*, at different cold storage times of human umbilical arteries preparations. Results (mean $\pm$ SEM) are expressed in grams of KCl-induced constriction

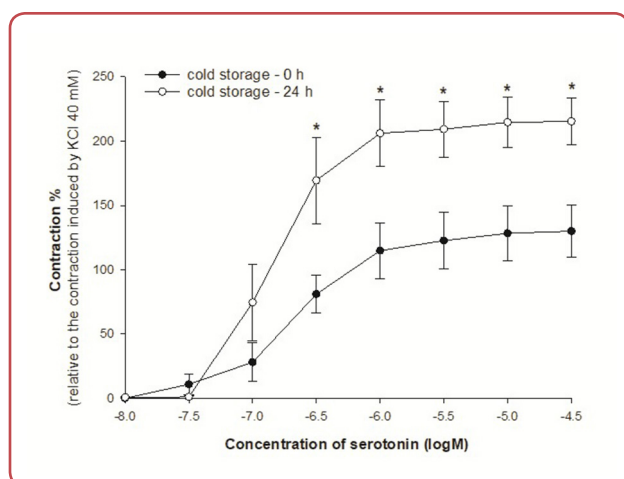


Figure 5: Comparison of concentration-response curves for serotonin, at different cold storage times of human umbilical arteries preparations *in vitro*. Results (mean $\pm$ SEM) are expressed in percentage of reference KCl-induced constriction.

* $p < 0.01$ (significantly different from the respective control).

in cold-stored preparations, since significantly higher magnitude of responses were found at higher concentrations of serotonin (3×10^{-7} - 10^{-5} M). However, at lower concentrations (10^{-8} - 10^{-7} M) there were no significance in the magnitude of the response, indicating that cold storage of the HUA preparation did not affect serotonin sensitivity (Figure 5).

Discussion

The main purpose of this study was to determine the optimal stretching tension and incubation period for researches that use HUA in tissue bath, as well as to examine the effect of multiple initial challenging and cold storage on HUA vasoactivity.

Bertrand et al reported that for reliable measurement of pharmacological properties it is necessary to stretch the HUA preparations to 5.0 or 6.0 g,⁷ while other investigators in previous studies established the resting tension of 2.0 g as an optimal tension for HUA preparations.^{8,9} In addition, there are reports that applied a stretching tension of 4.0 g is optimal during 4 h of incubation,^{10,11} although in most studies the incubation time was 2 h.^{8,9,12}

Results of these experiments have shown that the response of HUA to KCl was stronger after increasing stretching tension and incubating period. The maximal response was obtained when preparations were stretched at 2.0 g and incu-

bated for 120 min. Despite the fact that after 120 min there was no significant difference between responses of arteries stretched at 2.0 g and 4.0 g, the stretching tension of 4.0 g was harder to achieve, thus, 2.0 g and 120 min are suggested as optimal experimental conditions. The sensitivity of HUA to KCl was not affected by stretching tension since no significant difference in responses was found between the HUA preparations stretched at 1.0, 2.0 or 4.0 g, although the differences in constrictions were significant when the mentioned tensions were compared with the lowest one applied, 0.5 g. This is in accordance with the intact sensitivity of chorionic vessels to KCl.¹ However, in HUA preparations stretched at minimal passive tension (0.5 g), the incubation time might have an effect on the sensitivity to KCl, since constrictions were absent after 30 min of incubation, while prolongation of incubation time enhanced responsiveness.

In order to assess the functional integrity of HUA preparations, most authors use KCl as a reference contraction activator, applying different protocols to achieve initial challenge. The concentration of KCl that caused the maximal constriction for HUA preparations was found to be 80 mM, while the submaximal concentrations ranged from 20 mM to 60 mM.⁹ However, Bertrand et al applied initial challenge with 100 mM of KCl, usually with repetitions of 3 to 4 times,⁶ while Tufan et al used 40 mM KCl for contractile response and repeated it twice, the second constriction of which was taken as a reference one.¹⁰ Estañ et al asserted that 40 mM KCl was the optimal concentration that would reach the submaximal constriction in foeto-placental blood vessels.¹ Considering the all above mentioned findings, it was decided to use KCl as a reference contractile agent at a concentration of 40 mM. Our results have shown that greater constrictions were obtained after multiple challenging with 40 mM KCl. The assumption for presence of greater constrictions and thereby increase of intracellular calcium ions (Ca^{2+}) could be that repeated KCl-induced membrane depolarisation lead to prolonged activation of Ca^{2+} voltage channels and release from intracellular depots.¹³ It is also possible that during multiple challenging a higher amount of Ca^{2+} remains in the cell which is caused by inappropriate Ca^{2+} displacement after every wash-out period.¹⁴

It has long been known that serotonin is one of the most potent vasoconstrictors of HUA.⁸ Finding that concentration of serotonin in umbilical

vessels at birth was 10^{-7} M¹⁵ determined the range of serotonin concentrations most commonly used for *in vitro* studies.^{6, 11, 16} In the present study the dose-response curves for serotonin (10^{-8} - 3×10^{-5} M), obtained after different stretching tensions and incubation periods, showed force- and time-dependent constrictions. It was found that the efficacy of serotonin was significantly higher under the optimal experimental conditions established in this study (2.0 g and 120 min). However, sensitivity to serotonin was not affected when preparations were stretched either at 1.0 g for 60 min or at 2.0 g for 120 min. It has been previously reported by Tufan et al that maximal serotonin constriction for HUA, expressed as percentage of KCl-induced constriction, was approximately 130 %.¹⁰ Dayigolu et al applied the same experimental conditions (4.0 g and 4 h) and achieved a maximal constriction of approximately 145 %.¹¹ In the present experiment, higher maximal constriction for serotonin (approximately 180 %) were reached, using lower stretching tension (2.0 g) and shorter incubation time (120 min). Therefore, the advantages of this approach are reflected on savings of time and efforts in settings of HUA preparations for experiments.

In HUA preparations that were exposed to 24 h cold storage at 4 °C, the KCl produced qualitatively less constrictions compared to those in non-cold storage HUA preparations, but this difference was not statistically significant. Nevertheless, Sinanović and Chiba reported that KCl-induced constrictions were significantly decreased in dog and monkey skeletal muscle arteries after 3-5 days storage at 4 °C.^{17, 18} They suggested that hypothermic conditions might have led to the change in sensitivity of Ca²⁺ voltage channels and thus Ca²⁺ influx. Moreover, it has been shown that cold storage (24-72 h at 4 °C) of rat thoracic aorta also diminished KCl-induced constrictions and that reactive oxygen species may be responsible for storage-induced changes in vascular reactivity.¹⁹

On the other hand, serotonin showed significantly higher efficacy, but not sensitivity in HUA preparations that were exposed to 24 h cold storage, compared to the control HUA preparations. Although the percentage of achieved serotonin constriction was almost twice as high in the preparations exposed to cooling, it still does not represent a realistic image of the increase in serotonin efficacy, taking into account that the refer-

ence KCl constrictions were lower in these preparations. The effects of cold storage on serotonin vasoactivity have been investigated in various blood vessel preparations, but the results were not consistent. There are reports that show that cold storage did not modify vascular response of serotonin on dog and monkey muscle arteries,^{17, 18} whereas other reported that serotonin-induced constriction of rat aorta was almost completely diminished after 72 h of cooling at 4 °C.¹⁹ Interestingly, Kevelaitis et al. found that endothelial dysfunction during cold preservation enhanced the sensitivity of serotonin on rat coronary arteries.²⁰ Since the results of the present experiments showed that cold storage increased serotonin constrictions, further studies are needed in order to examine the role of endothelial dysfunction on this phenomenon.

Like in the optimisations already performed for isolated human pulmonary arteries,² as well as for isolated human chorionic arteries,^{1, 21} the results presented here represent an optimisation of the methodology for isolated HUA.

Conclusion

Results from the present study indicate that both KCl- and serotonin-induced constrictions were higher when HUA preparations were adjusted at 2.0 g stretching force and 120 min incubation period and that multiple initial challenging enhance vascular response to KCl. It was also shown that HUA preparations preserved functional sensitivity during 24 h cold storage for both KCl- and serotonin-induced constrictions. Considering all the above, mentioned experimental conditions are proposed as optimal to preform studies on HUA in isolated tissue bath, even 24 h after sampling.

Acknowledgements

None.

Conflict of interest

None.

References

1. Estañ L, Abad A, Morales-Olivas FJ, Serra-Serra V. Isolated human chorionic vascular reactivity: technical considerations for fresh preparations. *Gen Pharmacol* 1998;30(1):89-93.
2. Hussain A, Bennett RT, Chaudhry MA, Qadri SS, Cowen M, Morice AH, et al. Characterization of optimal resting tension in human pulmonary arteries. *World J Cardiol* 2016;8(9):553-8.
3. Rodegra H, Roder G, Schmermund HJ, Soering K. Wirkung von 5-Hydroxytryptamin auf die isolierte Nabelschnurarterie [Effect of 5-hydroxytryptamine on the isolated umbilical cord artery]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol* 1957;232(1):285-6. German.
4. Tong W, Giussani DA. Preeclampsia link to gestational hypoxia. *J Dev Orig Health Dis* 2019;10(3):322-33.
5. Reilly FD, Russell PT. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *Anat Rec* 1977;188(3):277-86.
6. Bertrand C, St-Louis J. Reactivities to serotonin and histamine in umbilical and placental vessels during the third trimester after normotensive pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(3 Pt 1):650-9.
7. Bertrand C, Duperron L, St-Louis J. Umbilical and placental vessels: modifications of their mechanical properties in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168(5):1537-46.
8. Altura BM, Malaviya D, Reich CF, Orkin LR. Effects of vasoactive agents on isolated human umbilical arteries and veins. *Am J Physiol* 1972;222(2):345-55.
9. Monuszko E, Halevy S, Freese K, Liu-Barnett M, Altura B. Vasoactive actions of local anaesthetics on human isolated umbilical veins and arteries. *Br J Pharmacol* 1989;97(2):319-28.
10. Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Unal M, Polat G, Kayhan Z, Oğuş E. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life Sci* 2003;72(12):1321-9.
11. Dayioglu E, Buharalioglu CK, Saracoglu F, Akar F. The effects of bumetanide on human umbilical artery contractions. *Reprod Sci* 2007;14(3):246-52.
12. Templeton AG, McGrath JC, Whittle MJ. The role of endogenous thromboxane in contractions to U46619, oxygen, 5-HT and 5-CT in the human isolated umbilical artery. *Br J Pharmacol* 1991;103(1):1079-84.
13. Kleszczewski T, Buzun L, Lisowska A, Modzelewska B. Potassium induced contraction of the internal thoracic artery *in vitro* is time related: the potential consequences in the analysis of the mechanism of the spasm after coronary artery bypass grafting and in the analysis of the results of *in vitro* studies. *Heart Vessels* 2016;31(4):616-21.
14. Wright G. Use-dependent decline in rat aorta sensitivity to contraction by potassium. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69(7):921-8.
15. Jones JB, Rowsell A. Fetal 5-hydroxytryptamine levels in late pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1973;80(8):687-9.
16. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ. Melatonin suppresses homocysteine enhancement of serotonin-induced vasoconstriction in the human umbilical artery. *J Pineal Res* 2001;31(3):242-7.
17. Sinanović O, Chiba S. Responsiveness of skeletal muscle branches of the dog femoral artery to alpha-adrenoceptor agonists before and after cold storage. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1987;287(1):146-57.
18. (Sinanović O, Chiba S. Responsiveness of monkey skeletal muscle arteries to vasoconstrictor substances before and after cold storage. *Jpn J Pharmacol* 1988;46(3):237-46.
19. Güney HZ, Ercan ZS. Prolonged cold storage diminishes the 5-hydroxytryptamine- and potassium chloride-mediated contractions of rat thoracic aorta. *Tohoku J Exp Med* 2009;217(2):155-61.
20. Kevelaitis E, Nyborg NC, Menasché P. Coronary endothelial dysfunction of isolated hearts subjected to prolonged cold storage: patterns and contributing factors. *J Heart Lung Transplant* 1999;18(3):239-47.
21. Abad A, Estañ L, Morales-Olivas FJ, Serra V. Reactivity of isolated human chorionic vessels: analysis of some influencing variables. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81(12):1147-51.

Vasorelaxant effect of monoterpene carvacrol on isolated human umbilical artery

Đorđe Đukanović^a, Milica Gajić Bojić^a, Sonja Marinković^a, Saša Trailović^b, Miloš P. Stojiljković^{a,c}, and Ranko Škrbić^{a,c}

^aCentre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, The Republic of Srpska 78000, Bosnia and Herzegovina; ^bDepartment of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Belgrade 11 000, Serbia; ^cDepartment of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, The Republic of Srpska, 78000, Bosnia and Herzegovina

Corresponding author: Đorđe Đukanović. (email: djordje.djukanovic@med.unibl.org)

Abstract

Carvacrol (CRV) is the main compound of essential oils extracted primarily from *Thymus* and *Origanum* species. Its various biological activities were confirmed: antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, anti-tumour, antinematodal, and vasorelaxant action. Although vasodilation mediated by CRV was previously described, the exact mechanism of its action has not yet been established. Hence, the aim of this study was to investigate CRV vasoactivity on human umbilical arteries (HUA) and the different pathways involved in its mechanism of action using the tissue bath methodology. CRV caused a significant decrease in vascular tension of 5-HT-pre-contracted umbilical arteries, with EC₅₀ of 442.13 ± 33.8 µmol/L (mean ± standard error of the mean—SEM). At 300 µmol/L, CRV shifted downward the 5-HT concentration–response curve with a statistical significance of $p < 0.001$ obtained for the four highest concentrations. At a concentration of 1 mmol/L, CRV completely abolished BaCl₂-induced contraction in Ca²⁺-free Krebs–Ringer bicarbonate solution and the BAY K 8644-induced contraction in Krebs–Ringer bicarbonate solution ($p < 0.001$). Isopentenyl pyrophosphate, the antagonist of TRPV₃ channel, was able to decrease the efficacy of CRV ($p < 0.001$). The blocking of L-type Ca²⁺ channels on smooth muscle cells is the most probable mechanism of CRV-induced vasorelaxation. However, the role of TRPV₃ channels in CRV-induced vasodilation of HUA cannot be excluded either.

Key words: carvacrol, human umbilical artery, vasodilation, Ca²⁺ channels, TRP channels

Résumé

Le carvacrol constitue le composé principal des huiles essentielles extraites principalement des espèces *Thymus* et *Origanum*. Ses diverses activités biologiques ont été confirmées : actions antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, antitumorales, antinématodales et vasorelaxantes. La vasodilatation médiée par le carvacrol a été décrite précédemment, mais les modes d'action exacts ne sont pas encore établis. Par conséquent, cette étude portait sur la vasoactivité du carvacrol dans les artères ombilicales humaines et les différentes voies de signalisation jouant un rôle dans ses modes d'action en bain de tissu. Le carvacrol a entraîné une augmentation marquée de la tension vasculaire dans des artères ombilicales précontractées à l'aide de 5-HT, avec une CE₅₀ de 442,13 ± 33,8 µM (moyenne ± erreur type – SEM). À 300 µM, le carvacrol a entraîné un décalage de la courbe concentration-réaction vers le bas avec une signification sur le plan statistique à $p < 0,001$ obtenue avec les quatre concentrations les plus élevées. À la concentration de 1 mM, le carvacrol permettait d'abolir la contraction engendrée par le BaCl₂ dans une solution de Krebs-Ringer – bicarbonate sans ions Ca²⁺, de même que par le BAY K 8644 dans une solution de Krebs-Ringer – bicarbonate ($p < 0,001$). L'isopentényl pyrophosphate, antagoniste des canaux TRPV₃, entraînait une diminution de l'efficacité du carvacrol ($p < 0,001$). L'inhibition des canaux Ca²⁺ de type L dans les cellules musculaires lisses constitue le mode d'action le plus probable de la vasorelaxation qu'engendre le carvacrol. Cependant, on ne peut pas exclure non plus un rôle éventuel des canaux TRPV₃ dans la vasodilatation engendrée par le carvacrol dans les cellules ombilicales humaines. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : carvacrol, artère ombilicale humaine, vasodilatation, canaux Ca²⁺, canaux TRP

Introduction

Carvacrol (2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol) is a liquid monoterpene and a major compound of essential oils extracted from various aromatic plants. It can be found in very

high amounts, up to 65% of mass in essential oils of the *Labiatae* family, especially *Thymus*, *Satureja*, *Thymbra*, and *Origanum* species (Sarer et al. 1982; De Vincenzi et al. 2004; Sharifi-Rad et al. 2018). With its oregano-like odour, carvacrol (CRV)

is widely used in the food industry as a preservative. The Food and Drug Administration has approved its use in food manufacturing and The Council of Europe included it in the flavourings that can be found in beverages (De Vincenzi et al. 2004).

Various biological activities of CRV, such as anti-inflammatory, antioxidant, anti-tumour, antibacterial, antifungal, and antinematodal effects, were previously described (Lambert et al. 2001; Karioti et al. 2006; Hotta et al. 2010; Ahmad et al. 2011; Jayakumar et al. 2012; Trailović et al. 2015). Moreover, CRV was found to have a strong vasorelaxant effect, which may implicate its potential use as an antihypertensive drug (Peixoto-Neves et al. 2010). There are different findings when it comes to mechanisms of CRV's vasorelaxant activity. Early studies found that changes in Ca^{2+} influx were the base of CRV vasodilation, after which the focus was shifted to transient receptor potential (TRP) channels (Peixoto-Neves et al. 2010). Xu et al. (2006) showed that TRP vanilloid (TRPV) channels in the skin are activated by CRV. Early et al. (2010) and Murphy et al. (2016) tested CRV's vasodilatory effect on rat cerebral and uterine arteries, respectively, and confirmed its activity via TRPV channels. On the other hand, Testai et al. (2016), in their experiments, linked CRV's ability to depress contractions in rat aorta with activation of voltage-dependent K^+ channels.

There is no clear explanation of CRV's mechanism of action and to the best of our knowledge, there are no prior studies with CRV performed on human blood vessels. The umbilical cord with its blood vessels is a widely available human tissue, often classified as biomedical waste, which provides a great opportunity for studying the vasoactive molecules (Đukanović et al. 2020). Hypertensive disorders, along with pre-eclampsia and eclampsia, are the leading causes of maternal morbidity and mortality (Khan et al. 2006; Duley et al. 2009). The avoidance and management of gestational hypertension in women admitted with severe pre-eclampsia are an important part of its treatment (Steevers et al. 2010). Despite the hypotensive drugs available for this condition, there is still a huge need for developing a novel therapy (Yankowitz 2004). Therefore, the aim of this study was to investigate the CRV's vasorelaxant action on human umbilical arteries (HUA) to reveal its definitive mechanism of action.

Materials and methods

Drugs and solutions

Potassium chloride (KCl), sodium chloride (NaCl), magnesium sulphate (MgSO_4), calcium chloride (CaCl_2), glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), potassium phosphate (KH_2PO_4), sodium carbonate (NaHCO_3), barium chloride (BaCl_2), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were obtained from Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Czech Republic) and used to prepare Krebs–Ringer bicarbonate solution and Ca^{2+} -free Krebs–Ringer bicarbonate solution.

Other substances: serotonin (5-HT; purity $\geq 98\%$), nicardipine (NCP; purity $\geq 98\%$), CRV (purity $\geq 98\%$), N (gamma)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; purity $\geq 98\%$), tetraethylammonium (TEA; purity $\geq 99.5\%$), 4-aminopyridine (4-AP; pu-

rity $\geq 99\%$), glibenclamide (GLB; purity $\geq 99\%$), and isopen-tenyl pyrophosphate (IPP; purity $\geq 95\%$) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), while ($\pm$) BAY K 8644 (purity $\geq 97.5\%$) was purchased from Cayman Chemical Company. Their stock solutions were prepared either in distilled water or in 99.9% ethanol, according to their solubility, and the subsequent dilutions were carried out in distilled water. All solutions were kept at 0–4 °C when not used in experiments.

Tissue preparation

After delivery at the Clinics for Gynaecology and Obstetrics, University Clinical Centre of the Republic of Srpska, Banja Luka, the segments of umbilical cords (length 5–10 cm) were immediately placed into the cooled modified Krebs–Ringer bicarbonate solution and transported by cold chain to the Laboratory for Pharmacology and Toxicology, Centre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka. The segments were stored at 0–4 °C and used within 48 h after collection.

The HUAs were cleaned of Warthon's jelly and connective tissue in Petri dishes on ice and cut into rings (length 3–4 mm). Two stainless wire hooks were inserted into lumen of HUA rings, which were thereafter suspended in a glass chamber filled with 25 mL of Krebs–Ringer bicarbonate solution (37 °C; pH 7.4), aerated with a mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 . One of the hooks was attached to the transducer (CH1-SN: IT) connected to the amplifier (SN: BS 007) with a recording system (Fast Acquisition, Elunit Group, Belgrade, Serbia), which recorded changes in isometric tension using E-Lab 2.01 (Elunit Group, Belgrade, Serbia) software. Another wire hook was attached to the displacement unit allowing gentle adjustment of passive tension.

Experimental protocols

Prior to the start of the experimental protocols, each HUA ring was prepared according to experimental conditions previously defined in our laboratory (Đukanović et al. 2020). Preparations were allowed to adapt for 30 min, after which they were gradually stretched to the passive tension of 2 g and incubated for 120 min in total. During the incubation period, 40 mmol/L KCl was added at three time points (30, 90, and 120 min). Between each KCl addition, medium was renewed (every 10 min) and preparations were adjusted once again to 2 g of passive tension.

The concentration–response curve was obtained to determine the vasorelaxant effect of CRV in isolated HUA. Preparations were pre-contracted with 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT and once the plateau was reached, increasing concentrations of CRV (1–3000 $\mu\text{mol/L}$) were administered. The control curve in this set of experiments was obtained from rings treated with dissolvent only.

To examine the relationship between endothelium as well as potassium channels and CRV-induced vasodilation, HUA rings were incubated with 0.1 mmol/L L-NAME (inhibitor of endothelial nitric oxide synthase—eNOS), 1 $\mu\text{mol/L}$ GLB (K_{ATP} channels antagonist), 1 mmol/L 4-AP (antagonist of voltage-gated potassium channels— K_v) or 1 mmol/L TEA

(Ca²⁺-activated potassium channels antagonist) for 30 min, and then pre-contracted with 1 µmol/L 5-HT. Concentration–response curves were obtained by adding cumulative concentrations of CRV (1–3000 µmol/L). The vasorelaxant mechanism of CRV vasoactivity was estimated by comparing responses in the presence or absence of different antagonists.

To observe how CRV affects the concentration–response of 5-HT, two different concentrations (0.3 mmol/L and 1 mmol/L) were present in the medium 30 min before 5-HT was added cumulatively (0.001–30 µmol/L). Responses were then compared with the control 5-HT concentration–response curve.

To investigate the role of L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in CRV-based vasodilatation, experiments were performed in Ca²⁺-free Krebs–Ringer bicarbonate solution (pH = 7.4). In the absence of Ca²⁺ ions, barium permeates calcium channels better. HUA rings were incubated with CRV (0.3 mmol/L or 1 mmol/L) for 30 min before the addition of BaCl₂ (0.01–30 mmol/L). The same experiment, only exchanging CRV with 10 µmol/L NCP, served as a positive control, and all responses were compared with the control BaCl₂ concentration–response curve.

In another set of experiments considering the potential L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels blockage induced by CRV, HUA rings were incubated with 0.3 mmol/L CRV or 10 µmol/L NCP (positive control) for 30 min before the administration of selective activator of these channels, BAY K 8644 (0.1–30 µmol/L). Curves obtained in the presence of both antagonists were compared with the control BAY K 8644 concentration–response curve.

The potential role of TRPV₃ channels in CRV-induced vasorelaxation of HUA was investigated. Therefore, artery rings were incubated in Krebs–Ringer bicarbonate solution with 3 µmol/L IPP (TRPV₃ and TRPA₁ antagonist) for 30 min, and then the CRV concentration–response curves on 5-HT pre-contracted preparations were obtained (Bang et al. 2011). The CRV concentration–response curve obtained in a medium without the addition of IPP was used as a control curve.

In this protocol, vasorelaxant responses were reported as a percentage of decrease in relative vascular tonus caused by the addition of 1 µmol/L 5-HT. On the other hand, contractile responses were expressed as a percentage of referent contractions reached with 40 mmol/L KCl.

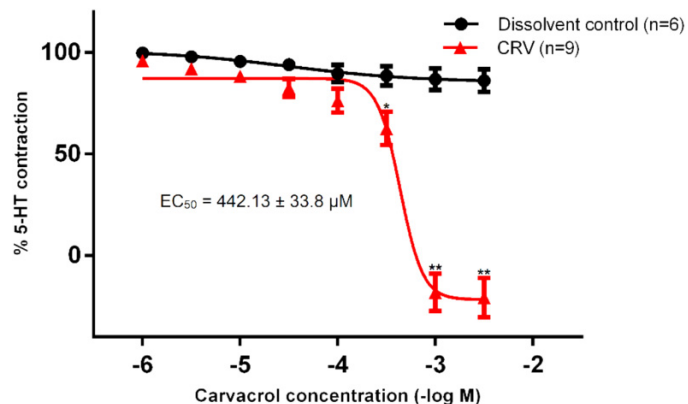
Ethical approval

Sample collection and processing were approved by the Ethics Committee of University Clinical Centre of the Republic of Srpska, Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina (No. 01-19-515-2/20).

Statistical analysis

The SigmaPlot version 14.0 software was used for statistical analysis, while GraphPad Prism 6.0 software was used for graphical representation. Two-way ANOVA, followed by Bonferroni test, was performed. The results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) and were considered statistically significant if they had a null hypothesis probability of less than 5% ($p < 0.05$).

Fig. 1. Carvacrol (CRV)-induced vasodilation on the pre-contracted human umbilical arteries (HUA)—the control curve. The graph shows relaxant effect of CRV (1–3000 µM) on the HUA pre-contracted with 1 µmol/L 5-HT. Values are expressed as percentage of primary 5-HT contraction (mean ± SEM); (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; two-way ANOVA, followed by Bonferroni test).



Results

In the first set of experiments, after vasoconstriction induced with 1 µmol/L serotonin (5-HT), CRV was added in cumulative concentrations ranging from 1 to 3000 µmol/L. CRV caused a sustained decrease in vascular tone, up to the 1 mmol/L concentration, which produced a significant steep drop in the concentration–response curve (Fig. 1). The determined EC₅₀ was 442.13 ± 33.8 µmol/L (mean ± SEM). Therefore, CRV concentrations of 300 µmol/L and 1 mmol/L were chosen as representative points for further experiments.

Pre-incubation with 100 µmol/L N (gamma)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) did not show a significant change in the CRV concentration–response curve (Fig. 2). Similarly, different potassium channel blockers—tetraethylammonium (TEA), glibenclamide (GLB), and 4-aminopyridine (4-AP)—showed no significant alteration of this monoterpene vascular effect (Fig. 3). No statistical significance was found, neither when comparing values of EC₅₀ nor when comparing the values of maximal dilatation.

The 5-HT concentration–response curve, obtained by adding cumulative concentrations of 5-HT (0.001–30 µmol/L), showed a significant downward shift when the HUA rings were pre-incubated with CRV (300 µmol/L or 1 mmol/L). In the presence of 300 µmol/L CRV, a statistically significant shift was observed at last six 5-HT concentration points. On the other hand, presence of 1 mmol/L CRV completely abolished the 5-HT-induced vasoconstriction; the high statistical significance was seen at concentrations from 0.1 to 30 µmol/L. Last three concentration points showed a significant difference between the effects of the two CRV concentrations (Fig. 4).

The incubation of HUA in Ca²⁺-free medium with added 300 µmol/L CRV showed no significant change in BaCl₂ concentration–dependent curve when compared to control (Fig. 5). Using NCP (10 µmol/L) as a positive control, a significant decline of BaCl₂ contraction was obtained at the high-

Fig. 2. CRV-induced vasodilation on pre-contracted HUA and evaluation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) involvement. The graph shows relaxant effect of CRV (1–3000 $\mu\text{mol/L}$) on the HUA pre-incubated with N (gamma)-nitro-L-arginine methyl ester—L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min and pre-contracted with 1 $\mu\text{mol/L}$ serotonin (5-HT). Values are expressed as percentage of primary 5-HT contraction (mean $\pm$ SEM).

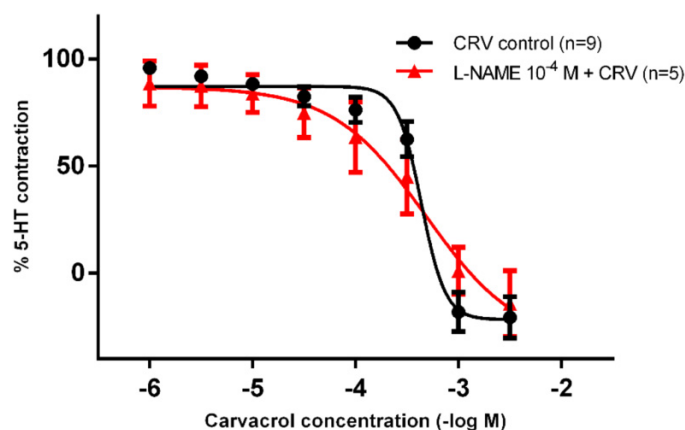
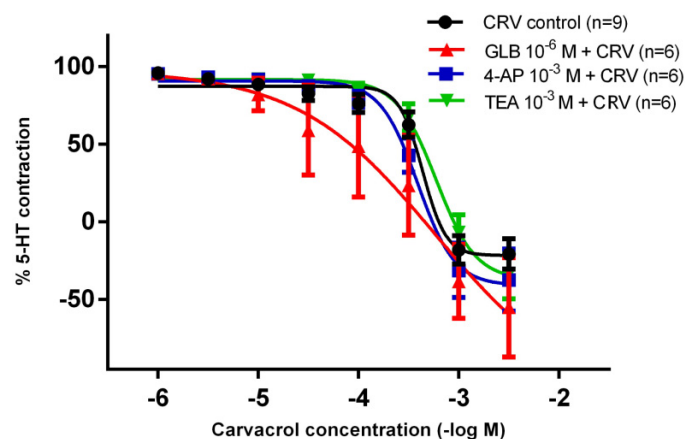


Fig. 3. CRV-induced vasodilation on pre-contracted HUA and evaluation of different K^+ channels involvement. The graph shows relaxant effect of CRV (1–3000 $\mu\text{mol/L}$) on the HUA pre-incubated with glibenclamide—GLB (1 $\mu\text{mol/L}$), 4-aminopyridine—4-AP (1 mmol/L) or tetraethylammonium—TEA (1 mmol/L) for 30 min and pre-contracted with 1 $\mu\text{mol/L}$ serotonin (5-HT). Values are expressed as percentage of primary 5-HT contraction (mean $\pm$ SEM).



est barium concentration used (30 mmol/L). Correspondingly, the presence of 1 mmol/L CRV depleted BaCl_2 contraction, even causing a drop of vascular tonus below the starting value. There was no significant difference between the effect of NCP and 1 mmol/L CRV.

The presence of 0.3 mmol/L CRV in the medium completely abolished BAY K 8644 contraction, similar to the effects caused by 10 $\mu\text{mol/L}$ NCP. Comparing the concentration–response curves obtained in the presence of CRV or NCP with

Fig. 4. Cumulative serotonin (5-HT) contraction of HUA in the presence of carvacrol (CRV). The graph shows cumulative 5-HT (0.001–30 $\mu\text{mol/L}$) contraction of HUA pre-incubated for 30 min in Krebs–Ringer bicarbonate solution (pH = 7.4): (a) without additional substances—control, (b) with CRV (1 mmol/L)—CRV 10^{-3} M + 5-HT, or (c) with CRV (300 $\mu\text{mol/L}$)—CRV 3×10^{-4} M + 5-HT. Values are expressed as percentage in relation to referent 40 mmol/L KCl-induced contraction (mean $\pm$ SEM); (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; two-way ANOVA, followed by Bonferroni test).

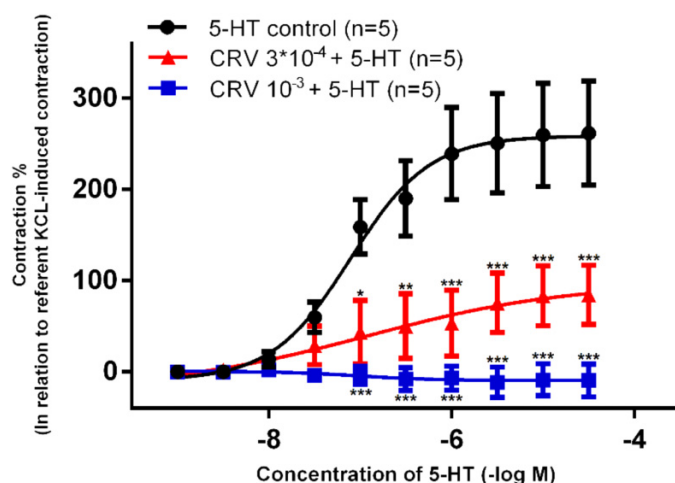


Fig. 5. Cumulative BaCl_2 contraction of HUA in Ca^{2+} -free solution in the presence of CRV. The graph shows cumulative BaCl_2 (10–30 000 $\mu\text{mol/L}$) contraction of HUA pre-incubated in Ca^{2+} -free solution (pH = 7.4): (a) without additional substances— BaCl_2 control, (b) with CRV (300 $\mu\text{mol/L}$)—CRV 3×10^{-4} M, (c) with nifedipine—NCP (10 $\mu\text{mol/L}$)—NCP 10^{-5} M, or (d) with CRV (1 mmol/L)—CRV 10^{-3} M. Values are expressed as percentage in relation to referent 40 mmol/L KCl-induced contraction (mean $\pm$ SEM); (* p < 0.001 control; two-way ANOVA, followed by Bonferroni test).

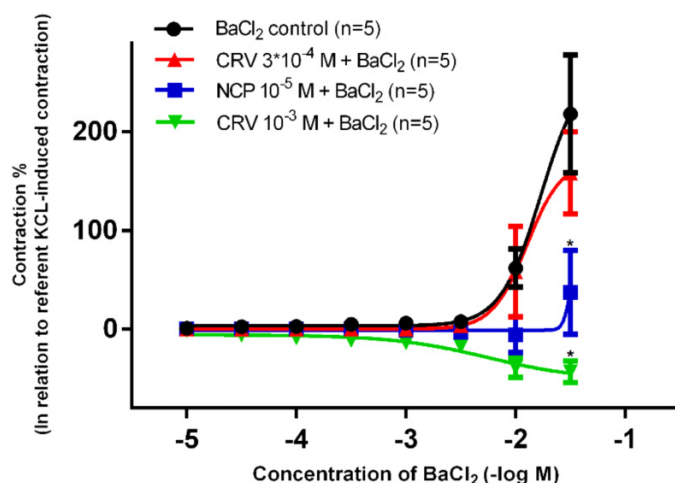


Fig. 6. Cumulative BAY K 8644 contraction of HUA in presence of CRV. The graph shows cumulative BAY K 8644 (0.1–30 $\mu\text{mol/L}$) contraction of HUA pre-incubated for 30 min in Krebs–Ringer bicarbonate solution (pH = 7.4): (a) without additional substances—BAY K 8644 control, (b) with CRV (1 mmol/L)—CRV 10^{-3} M, and (c) with NCP (10 $\mu\text{mol/L}$)—NCP 10^{-5} M. Values are expressed as percentage in relation to referent 40 mmol/L KCl-induced contraction (mean $\pm$ SEM); (* p < 0.001 control; two-way ANOVA, followed by Bonferroni test).

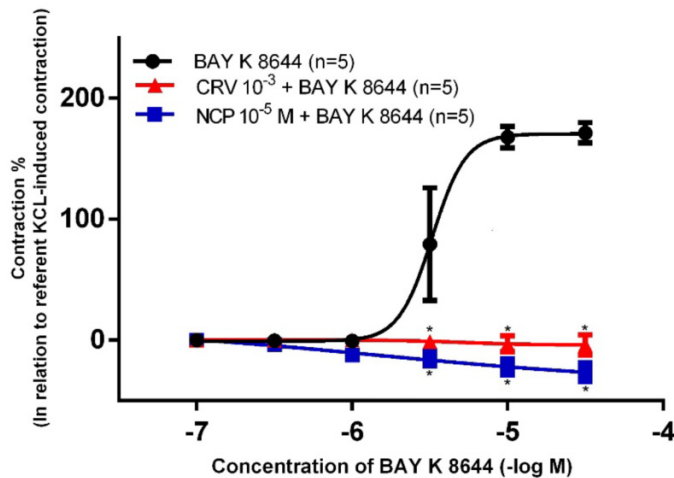
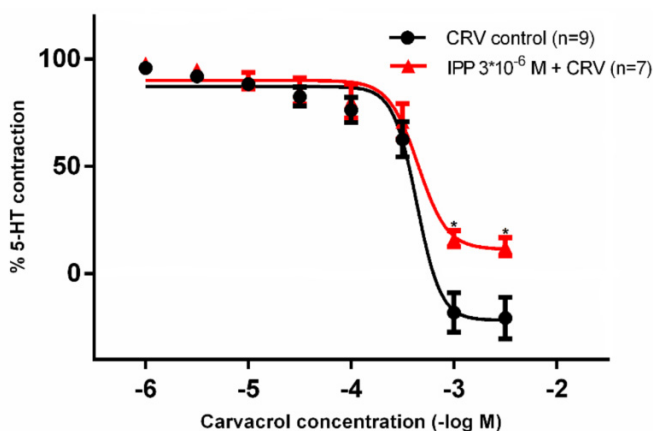


Fig. 7. CRV-induced vasodilation on pre-contracted HUA and evaluation of TRP calcium channels involvement. The graph shows relaxant effect of CRV (1–3000 $\mu\text{mol/L}$) on HUA pre-incubated with isopentenyl pyrophosphate (IPP; 3 $\mu\text{mol/L}$) and pre-contracted with 1 $\mu\text{mol/L}$ serotonin (5-HT). Values are expressed as percentage of primary 5-HT contraction (mean $\pm$ SEM); (* p < 0.001; two-way ANOVA, followed by Bonferroni test).



the BAY K 8644 control curve, statistical significance was found at the three highest concentration points (Fig. 6).

In preparations incubated with 3 $\mu\text{mol/L}$ IPP, the efficacy of CRV on 5-HT pre-contracted HUA was significantly diminished when the two highest concentrations of CRV were administered (Fig. 7). However, no significant difference was

found between values of EC_{50} , which indicates that the potency of CRV remained unchanged.

Discussion

The results from this study have shown that monoterpene of natural origin CRV induced vasodilation of pre-contracted HUA. Although several studies already described the vasorelaxant effect of CRV, as far as we are informed, CRV's vasoactivity has not yet been tested in isolated HUA. Administration of CRV in cumulative concentrations (1–3000 $\mu\text{mol/L}$) caused a complete decrease of vascular tonus in the preparations pre-contracted with 5-HT. The estimated value of EC_{50} for CRV in our study (442.13 ± 33.8 $\mu\text{mol/L}$; mean $\pm$ SEM) was higher compared with values reported on rat aorta and rat uterine radial arteries (78.80 ± 11.91 $\mu\text{mol/L}$ and 93 ± 7 $\mu\text{mol/L}$, respectively) (Peixoto-Neves et al. 2010; Murphy et al. 2016). The difference in response between blood vessels from experimental animals and humans could be due to the diversity in terms of physiology, as well as in the involvement of different pathways responsible for their vasoactivity. Therewith, it is reported that HUA were more resistant to vasorelaxants in comparison with human basilar arteries (White et al. 1988).

Since the lack of innervation in the umbilical cord, the blood flow in HUA is strictly regulated by autacoids from blood circulation, such as serotonin, histamine, bradykinin, angiotensin, and oxytocin (Bertrand and St-Louis 1999). These molecules, along with external substances, cause changes in the vascular tonus by regulating the activity of receptors or ion channels. Studying mechanisms involved in their vasoactivity is of great value, considering the importance of foeto-placental circulation. It is widely known that serotonin is the strongest constrictor of HUA and its reported cord concentration was 0.1 $\mu\text{mol/L}$ at birth, which is in a range of reactivity of umbilical vessels to this amine (Altura et al. 1972; Jones and Rowsell 1973). 5-HT₂ A and 5-HT_{1B/D} receptors are responsible for 5-HT-vasoconstriction in HUA (Lovren et al. 1999). During the third trimester in normal pregnancies, the sensitivity of 5-HT_{1B/D} receptors is increasing, and this progress was even accelerated in pre-eclamptic women, while the activity of 5-HT₂ A receptors remains unaffected (Gupta et al. 2006).

Considering the importance of 5-HT in the regulation of vascular tone in HUA and its involvement in the pathogenesis of pre-eclampsia, the role of CRV on its vasoactivity was investigated in this study. In addition to the vasorelaxant effect on 5-HT pre-contraction, when CRV was incubated in the medium, it succeeded to prevent 5-HT-mediated constriction. While at 300 $\mu\text{mol/L}$, CRV caused a downward shift in the 5-HT concentration–response curve, at 1 mmol/L concentration it was absolutely abolished. These results have shown that CRV interferes with pharmacomechanical coupling, blocking the influx of calcium caused by the agonist action on the receptor. The 5-HT₂ A receptor is coupled with G_g protein, increasing IP₃, while 5-HT_{1B/D} receptors are coupled with $G_{i/o}$ protein, inhibiting adenylyl cyclase, and both lead to the release of Ca^{2+} from the intracellular storage (Lorigo et al. 2018). Tension development promoted by 5-HT is dependent on these mechanisms, which seem to be inhibited by high concentrations of CRV. In support of this conclusion, it

was found that the same concentration of CRV fully inhibits phenylephrine (agonist of α_1 -adrenergic receptors coupled with G_g protein) induced contraction in rat aorta (Peixoto-Neves et al. 2010), (Motiejunaite et al. 2021).

Potassium channels have an important role in the regulation of vascular tone of HUAs (Lorigo et al. 2020). The functional presence of K_v and BK_{Ca} , as well as their involvement in HUA vasoactivity, is well described, while on the other hand, there is not enough information to clearly confirm the existence of K_{ATP} channels in HUA (Sadanaga et al. 2002). The present study showed that neither GLB (K_{ATP} channels antagonist) nor 4-AP (antagonist of voltage-gated potassium channels— K_v) nor TEA (BK_{Ca} , SK_{Ca} , and IK_{Ca} blocker) can antagonise CRV's action. Similar to our study, TEA and GBL had no effect on CRV-mediated vasodilatation; however, 4-AP and quinine (non-selective K_v antagonist) have managed to reduce the potency of CRV (Testai et al. 2016). This difference was probably due to species and sample diversity. Testai et al. (2016) assumed that the engagement of K_v channels is related to CRV's endothelium-dependent mechanism of action. Indeed, K_v channels are confirmed on rat aorta endothelial cells, yet within the limits of our knowledge, there has been no paper that described the presence of K_v channels on human umbilical artery endothelial cells (Gollasch and Nelson 1997).

Amongst others, L-type of voltage-gated calcium channels (VGCC) often characterised as dihydropyridine-sensitive calcium channels are highly involved in the regulation of vascular tone (Belfort et al. 1995). Dihydropyridines, including NCP, decrease Ca^{2+} influx by blocking the L-type VGCC, which has led to vasodilatation of HUA (Dantas et al. 2015). The involvement of L-type calcium channels in vasorelaxation of HUA caused by CRV was investigated in this study. A strong inhibitory effect on L-type VGCC was found when 1000 $\mu\text{mol/L}$ CRV was incubated in Ca^{2+} -free Krebs–Ringer bicarbonate medium. Compared with control, it was observed that this inhibitory effect is similar to that of NCP, and, moreover, CRV even totally blocked the contraction provoked by $BaCl_2$. Dantas et al. (2015) confirmed the CRV activity on L-type VGCC using whole-cell patch-clamp experiments in rat mesenteric myocytes. In accordance with the present study, the inhibitory effect of several other monoterpenes on L-type VGCC in smooth muscle cells has also been proposed, including citral in rat aorta, 1,8-cineole in rat trachea and most similar to our finding (-) carveol in HUA (Pereira et al. 2013; Pereira-Gonçalves et al. 2018; Evaristo Rodrigues da Silva et al. 2020). The BAY K 8644 is widely utilised for studying the L-type VGCC as a specific activator of these channels (Marom et al. 2010). The antagonistic effect of other monoterpenoids such as carveol and perillyl alcohol on BAY K 8644-induced pre-contraction was reported on isolated rat aorta (Cardoso-Teixeira et al. 2018). Similar to those findings, in the present study, CRV managed to prevent the contraction caused by BAY K 8644. Summarised, it can be said that monoterpene action on smooth muscle is at least partly realised by the inhibition of L-type Ca^{2+} currents.

It is also reported that CRV is amongst the strongest agonists of $TRPV_3$ receptors described so far (Vogt-Eisele et al. 2007). Activation of $TRPV_3$ caused by CRV increased intercellular Ca^{2+} of cerebral artery endothelial cells, whereas single

$TRPV_3$ allowed- 300 times more Ca^{2+} to enter the cell compared to L-type Ca^{2+} channel (Pires et al. 2015). Calcium entry could lead to regulation of both cytosolic and particular NO synthetases in endothelial cells, which results in vasodilation (Förstermann et al. 1991). It was found that menthol, another monoterpene, induces NO-dependent vasodilatation by promoting Ca^{2+} -influx through $TRPM_8$ channels. This vasodilatation was attenuated in presence of L-NAME (Craighead et al. 2017). However, our study did not show any alteration of CRV-mediated vasorelaxation, when L-NAME was utilised. These results are in agreement with earlier reports on rat aorta (Peixoto-Neves et al. 2010; Testai et al. 2016).

Earley et al. (2010) showed that CRV vasodilation was not altered in presence of HC-030031, a specific $TRPA_1$ antagonist. Along with other authors, they reported that CRV's action was mediated by $TRPV_3$ and its Ca current, which further activates small conductance calcium-activated potassium channels (SK_{Ca}) and intermediate conductance calcium-activated potassium channels (IK_{Ca}) in cerebral arteries (Early et al. 2010; Pires et al. 2015). Indeed, in the present study IPP (selective $TRPA_1$ and $TRPV_3$ antagonist) significantly decreased vasodilation at a high concentration of CRV, indicating the presence and involvement of $TRPV_3$ channels. Nonetheless, as mentioned above, none of the potassium channels antagonist used showed any change in HUA response to CRV in our investigation. However, further studies are needed to clarify the role of $TRPV_3$ in regulation of vascular tone in HUA.

In conclusion, the present study shows that CRV causes strong vasodilation of 5-HT pre-contracted HUA. This vasorelaxant effect occurs in a concentration-dependent manner. Our data demonstrate that blocking of L-type VGCC by CRV takes a leading role in its mechanism of action. Besides, activation of $TRPV_3$ channels is also involved in CRV vasodilation, showing the potential importance of these channels in the regulation of blood flow in the umbilical cord. This research provides the results, which suggest that CRV could be a promising compound in the treatment of gestational hypertensive diseases, such as pre-eclampsia.

Article information

History dates

Received: 24 November 2021

Accepted: 21 February 2022

Accepted manuscript online: 4 May 2022

Version of record online: 26 July 2022

Copyright

© 2022 The Author(s). Permission for reuse (free in most cases) can be obtained from [copyright.com](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Author information

Competing interests

The authors declare there are no competing interests.

Funding information

The authors declare no specific funding for this work.

References

- Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A., and Manzoor, N. 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**(1): 41–50. doi:10.1007/s10096-010-1050-8. PMID: 20835742
- Altura, B.M., Malaviya, D., Reich, C.F., and Orkin, L.R. 1972. Effects of vasoactive agents on isolated human umbilical arteries and veins. *Am J Physiol.* **222**(2): 345–355. doi:10.1152/ajplegacy.1972.222.2.345. PMID: 4400488.
- Bang, S., Yoo, S., Yang, T.J., Cho, H., and Hwang, S.W. 2011. Isopentenyl pyrophosphate is a novel antinociceptive substance that inhibits TRPV3 and TRPA1 ion channels. *Pain*, **152**(5): 1156–1164. doi:10.1016/j.pain.2011.01.044. PMID: 21353389.
- Belfort, M.A., Saade, G.R., Suresh, M., Johnson, D., and Vedernikov, Y.P. 1995. Human umbilical vessels: responses to agents frequently used in obstetric patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **172**(5): 1395–1403. doi:10.1016/0002-9378(95)90468-9. PMID: 7755044.
- Bertrand, C., and St-Louis, J. 1999. Reactivities to serotonin and histamine in umbilical and placental vessels during the third trimester after normotensive pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**(3 Pt 1): 650–659. doi:10.1016/S0002-9378(99)70268-1. PMID: 10076143.
- Cardoso-Teixeira, A.C., Ferreira-da-Silva, F.W., Peixoto-Neves, D., Oliveira-Abreu, K., Pereira-Gonçalves, Á., Coelho-de-Souza, A.N., and Leal-Cardoso, J.H. 2018. Hydroxyl group and vasorelaxant effects of perillyl alcohol, carveol, limonene on aorta smooth muscle of rats. *Molecules*, **23**(6): 1430. doi:10.3390/molecules23061430.
- Craighead, D.H., McCartney, N.B., Tumlinson, J.H., and Alexander, L.M. 2017. Mechanisms and time course of menthol-induced cutaneous vasodilation. *Microvasc. Res.* **110**: 43–47. doi:10.1016/j.mvr.2016.11.008. PMID: 27899298.
- Dantas, B.P., Alves, Q.L., de Assis, K.S., Ribeiro, T.P., de Almeida, M.M. de Vasconcelos, A.P., et al. 2015. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascul Pharmacol.* **67–69**: 48–58. doi:10.1016/j.vph.2015.02.016. PMID: 25869504.
- De Vincenzi, M., Stammati, A., De Vincenzi, A., and Silano, M. 2004. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, **75**(7–8): 801–804. doi:10.1016/j.fitote.2004.05.002. PMID: 15567271.
- Đukanović, Đ., Gajić, M., and Škrbić, R. 2020. Time-dependent and force-dependent vasoreactivity of isolated human umbilical arteries. *Scr. Med.* **51**(3): 134–140.
- Duley, L. 2009. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin. Perinatol.* **33**(3): 130–137. doi:10.1053/j.semperi.2009.02.010. PMID: 19464502.
- Earley, S., Gonzales, A.L., and Garcia, ZI. 2010. A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. *Mol. Pharmacol.* **77**(4): 612–620. doi:10.1124/mol.109.060715. PMID: 20086034.
- Evaristo Rodrigues da Silva, R., de Alencar Silva, A., Pereira-de-Morais, L., de Sousa Almeida, N., Iriti, M. Kerntopf, M.R., et al. 2020. Relaxant effect of monoterpene (-)-Carveol on isolated human umbilical cord arteries and the involvement of ion channels. *Molecules*, **25**(11): 2681. doi:10.3390/molecules25112681.
- Förstermann, U., Pollock, J.S., Schmidt, H.H., Heller, M., and Murad, F. 1991. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**(5): 1788–1792. doi:10.1073/pnas.88.5.1788. PMID: 1705708.
- Gollasch, M., and Nelson, M.T. 1997. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in arterial smooth muscle cells. *Kidney Blood Press Res.* **20**(6): 355–371. doi:10.1159/000174250. PMID: 9453447.
- Gupta, S., Hanff, L.M., Visser, W., Steegers, E.A., Saxena, P.R., Vulto, A.G., and MaassenVanDenBrink, A. 2006. Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *J. Hypertens.* **24**(7): 1345–1353. doi:10.1097/01.hjh.0000234115.40648.88. PMID: 16794484
- Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S., and Inoue, H. 2010. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *J. Lipid Res.* **51**(1): 132–139. doi:10.1194/jlr.M900255-JLR200. PMID: 19578162.
- Jayakumar, S., Madankumar, A., Asokkumar, S., Raghunandhakumar, S., Gokula dhas, K. Kamaraj, S., et al. 2012. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **360**(1–2): 51–60. doi:10.1007/s11010-011-1043-7. PMID: 21879312.
- Jones, J.B., and Rowsell, A. 1973. Fetal 5-hydroxytryptamine levels in late pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* **80**(8): 687–689. doi:10.1111/j.1471-0528.1973.tb16050.x. PMID: 4725944.
- Karioti, A., Vrahimi-Hadjilouca, T., Droushiotis, D., Rancic, A., Hadjipavlou-Litina, D., and Skaltsa, H. 2006. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* **72**(14): 1330–1334. doi:10.1055/s-2006-947255. PMID: 17022006.
- Khan, K.S., Wojdyla, D., Say, L., Gülmezoglu, A.M., and Van Look, P.F. 2006. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*, **367**(9516): 1066–1074. doi:10.1016/S0140-6736(06)68397-9. PMID: 16581405.
- Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J., and Nychas, GJ. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **91**(3): 453–462. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x. PMID: 11556910.
- Lorigo, M., Mariana, M., Feiteiro, J., and Cairrao, E. 2018. How is the human umbilical artery regulated? *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **44**(7): 1193–1201. doi:10.1111/jog.13667. PMID: 29727040.
- Lorigo, M., Oliveira, N., and Cairrao, E. 2020. Clinical importance of the human umbilical artery potassium channels. *Cells*, **9**(9): 1956. doi:10.3390/cells9091956.
- Lovren, F., Li, X.F., Lytton, J., and Triggle, C. 1999. Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. *Br. J. Pharmacol.* **127**(5): 1247–1255. doi:10.1038/sj.bjp.0702647. PMID: 10455272.
- Marom, M., Hagalili, Y., Sebag, A., Tzvier, L., and Atlas, D. 2010. Conformational changes induced in voltage-gated calcium channel *cav1.2* by BayK 8644 or FPL64176 modify the kinetics of secretion independently of Ca²⁺ influx. *J. Biol. Chem.* **285**(10): 6996–7005. doi:10.1074/jbc.M109.059865. PMID: 20054004.
- Motiejunaite, J., Amar, L., and Vidal-Petiot, E. 2021. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, **82**(3–4): 193–197. doi:10.1016/j.ando.2020.03.012. PMID: 32473788.
- Murphy, T.V., Kanagarajah, A., Toemoe, S., Bertrand, P.P., Grayson, T.H. Britton, F.C., et al. 2016. TRPV3 expression and vasodilator function in isolated uterine radial arteries from non-pregnant and pregnant rats. *Vascul. Pharmacol.* **83**: 66–77. doi:10.1016/j.vph.2016.04.004. PMID: 27073026.
- Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K.S., Gomes, M.D., Lima, F.C., Lahlou, S. Magalhães, P.J., et al. 2010. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **24**(3): 341–350. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00768.x. PMID: 19682086.
- Pereira, S.L., Marques, A.M., Sudo, R.T., Kaplan, M.A., and Zapata-Sudo, G. 2013. Vasodilator activity of the essential oil from aerial parts of *Pectis brevipedunculata* and its main constituent citral in rat aorta. *Molecules*, **18**(3): 3072–3085. doi:10.3390/molecules18033072. PMID: 23470336.
- Pereira-Gonçalves, Á., Ferreira-da-Silva, F.W., de Holanda-Angelin-Alves, C.M., Cardoso-Teixeira, A.C., Coelho-de-Souza, A.N., and Leal-Cardoso, J.H. 2018. 1,8-Cineole blocks voltage-gated L-type calcium channels in tracheal smooth muscle. *Pflügers Arch.* **470**(12): 1803–1813. doi:10.1007/s00424-018-2201-5. PMID: 30206706.
- Pires, P.W., Sullivan, M.N., Pritchard, H.A., Robinson, J.J., and Earley, S. 2015. Unitary TRPV3 channel Ca²⁺ influx events elicit endothelium-dependent dilation of cerebral parenchymal arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**(12): H2031–H2041. doi:10.1152/ajpheart.00140.2015. PMID: 26453324.
- Sadanaga, T., Ohya, Y., Ohtsubo, T., Goto, K., Fujii, K., and Abe, I. 2002. Decreased 4-aminopyridine sensitive K⁺ currents in endothelial cells from hypertensive rats. *Hypertens Res.* **25**(4): 589–596. doi:10.1291/hyres.25.589. PMID: 12358146.

- Sarer, E., Scheffer, J.J., and Baerheim Svendsen, A. 1982. Monoterpenes in the essential oil of *Origanum majorana*. *Planta Med.* **46**(4): 236–239. doi:[10.1055/s-2007-971222](https://doi.org/10.1055/s-2007-971222). PMID: [17396981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17396981/).
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E.M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W.N. Del Mar Contreras, M., et al. 2018. Carvacrol and human health: a comprehensive review. *Phytother. Res.* **32**(9): 1675–1687. doi:[10.1002/ptr.6103](https://doi.org/10.1002/ptr.6103). PMID: [29744941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29744941/).
- Steegers, E.A., von Dadelszen, P., Duvekot, J.J., and Pijnenborg, R. 2010. Pre-eclampsia. *Lancet*, **376**(9741): 631–644. doi:[10.1016/S0140-6736\(10\)60279-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60279-6). PMID: [20598363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20598363/).
- Testai, L., Chericoni, S., Martelli, A., Flamini, G., Breschi, M.C., and Calderone, V. 2016. Voltage-operated potassium (K_v) channels contribute to endothelium-dependent vasorelaxation of carvacrol on rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* **68**(9): 1177–1183. doi:[10.1111/jphp.12585](https://doi.org/10.1111/jphp.12585). PMID: [27334686](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27334686/).
- Trailović, S.M., Marjanović, D.S., Nedeljković Trailović, J., Robertson, A.P., and Martin, R.J. 2015. Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitol. Res.* **114**(8): 3059–3068. doi:[10.1007/s00436-015-4508-x](https://doi.org/10.1007/s00436-015-4508-x). PMID: [25944741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25944741/).
- Vogt-Eisele, A.K., Weber, K., Sherkheli, M.A., Vielhaber, G., Panten, J., Gisselmann, G., and Hatt, H. 2007. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br. J. Pharmacol.* **151**(4): 530–540. doi:[10.1038/sj.bjp.0707245](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707245). PMID: [17420775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17420775/).
- White, R.P. 1988. Comparison of vasorelaxants in human basilar arteries and umbilical arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **155**(1-2): 109–115. doi:[10.1016/0014-2999\(88\)90408-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90408-6). PMID: [3243328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3243328/).
- Xu, H., Delling, M., Jun, J.C., and Clapham, D.E. 2006. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat. Neurosci.* **9**(5): 628–635. doi:[10.1038/nn1692](https://doi.org/10.1038/nn1692). PMID: [16617338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16617338/).
- Yankowitz, J. 2004. Pharmacologic treatment of hypertensive disorders during pregnancy. *J. Perinat. Neonatal. Nurs.* **18**(3): 230–240. doi:[10.1097/00005237-200407000-00006](https://doi.org/10.1097/00005237-200407000-00006). PMID: [15478474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15478474/).

Article

Design of Novel TRPA1 Agonists Based on Structure of Natural Vasodilator Carvacrol—In Vitro and In Silico Studies

Đorđe Đukanović ^{1,2,*}, Relja Suručić ², Milica Gajić Bojić ^{1,3} , Saša M. Trailović ⁴ , Ranko Škrbić ^{1,3}  and Žarko Gagić ² 

¹ Centre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina; milica.gajic@med.unibl.org (M.G.B.); ranko.skrbic@med.unibl.org (R.Š.)

² Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina; relja.surucic@med.unibl.org (R.S.); zarko.gagic@med.unibl.org (Ž.G.)

³ Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

⁴ Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; sasa@vet.bg.ac.rs

* Correspondence: djordje.djukanovic@med.unibl.org

Abstract: Considering the escalating global prevalence and the huge therapeutic demand for the treatment of hypertension, there is a persistent need to identify novel target sites for vasodilator action. This study aimed to investigate the role of TRPA1 channels in carvacrol-induced vasodilation and to design novel compounds based on carvacrol structure with improved activities. In an isolated tissue bath experiment, it was shown that 1 μ M of the selective TRPA1 antagonist A967079 significantly ($p < 0.001$) reduced vasodilation induced by 3 mM of carvacrol. A reliable 3D-QSAR model with good statistical parameters was created ($R^2 = 0.83$; $Q^2 = 0.59$ and $R^2_{pred} = 0.84$) using 29 TRPA1 agonists. Obtained results from this model were used for the design of novel TRPA1 activators, and to predict their activity against TRPA1. Predicted pEC₅₀ activities of these molecules range between 4.996 to 5.235 compared to experimental pEC₅₀ of 4.77 for carvacrol. Molecular docking studies showed that designed molecules interact with similar amino acid residues of the TRPA1 channel as carvacrol, with eight compounds showing lower binding energies. In conclusion, carvacrol-induced vasodilation is partly mediated by the activation of TRPA1 channels. Combining different in silico approaches pointed out that the molecule D27 (2-[2-(hydroxymethyl)-4-methylphenyl]acetamide) is the best candidate for further synthesis and experimental evaluation in in vitro conditions.

Keywords: 3D-QSAR; molecular docking; TRPA1; carvacrol; hypertension



Citation: Đukanović, Đ.; Suručić, R.; Bojić, M.G.; Trailović, S.M.; Škrbić, R.; Gagić, Ž. Design of Novel TRPA1 Agonists Based on Structure of Natural Vasodilator Carvacrol—In Vitro and In Silico Studies. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 951. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070951>

Academic Editor: Vivek Gupta

Received: 23 May 2024

Revised: 23 June 2024

Accepted: 29 June 2024

Published: 18 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The prevalence of hypertension in adults has increased worldwide in the last three decades, especially among the population of low- and middle-income countries. Affecting approximately 1.3 billion people in the world, hypertension still remains undiagnosed in nearly 50% of adults who suffer from this condition [1]. Hypertension can also evoke other health complications such as stroke, heart attack, and kidney dysfunction [2]. Another challenging condition is prehypertension. Although prehypertension does not demand conventional therapy, most patients do not comply with the hygienic–dietary recommendations, which finally results in the development of hypertension [3]. In addition, control of gestational hypertension was also proved to be crucial in pregnant women admitted with preeclampsia [4]. Commonly, the onset of these conditions is associated with the changes in regulation of vascular tone and vasodilators are widely used drugs in the treatment of elevated blood pressure. Considering previously described health issues there is an ongoing necessity to identify a new target site for vasodilator action as well as to discover novel molecules with the vasorelaxant effect.

Members of *Lamiaceae* family, which include plants such as oregano, are traditionally used in the treatment of hypertension [5]. Extracts from the oregano plant showed a vasorelaxant effect in vitro [6]. The main compound in these extracts responsible for their biological effects is the monoterpene carvacrol, which is abundantly found in essential oils extracted from plants belonging to the *Lamiaceae* family [7,8]. Essential oils rich in monoterpenes have been reported to have vasorelaxant properties, potentially explaining their traditional use in treating hypertension [9]. With its anti-inflammatory, antioxidant, and vasorelaxant effects, carvacrol shows significant potential to be used in the treatment of cardiovascular diseases such as hypertension. Carvacrol decreased the values of blood pressure in anesthetized normotensive rats when administered intraperitoneally [10]. Indeed, oral treatment with carvacrol also showed a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats, simultaneously causing a reduction in peripheral vascular resistance [11,12]. Although the exact mechanism of carvacrol-induced vasodilation has not been clarified, it is reported that its action involves activation and/or blockade of several ion channels including transient receptor potential (TRP) channels [13].

TRP channels enable the transport of cations through the cell membrane, thus regulating different physiological processes [14]. Among six TRP subfamilies, TRP ankyrin (TRPA) channels represent the smallest subfamily consisting of only one member [15]. TRPA1 channels were first found in sensory neurons where they take part as important ion channels in pathophysiological processes such as pain, itch, and inflammation [16]. In the following years, it was revealed that TRPA1 channels are significantly involved in both physiological and pathophysiological processes in cardiovascular regulation. Recent reports showed that TRPA1 channels are also present in cardiomyocytes and endothelial cells of blood vessels [17,18]. Considering their presence and involvement in cardiovascular functions, TRPA1 channels could be considered a promising target for the development of treatments for several cardiovascular diseases with a focus on heart failure, atherosclerosis, myocardial fibrosis, myocardial ischemia-reperfusion injury, and hypertension [19–21]. Among numerous compounds that can activate these channels, natural molecules such as carvacrol, thymol, cinnamaldehyde, and similar stand out as very potent TRPA1 agonists [22,23].

Therefore, one of the aims of this study was to investigate the role of TRPA1 channels in carvacrol-induced vasodilation. Additionally, the direction of this research is intended to describe interactions between carvacrol and the target site of TRPA1 channels and to use those data to design new molecules with greater activity on these channels.

2. Materials and Methods

2.1. In Vitro Experiments

2.1.1. Drugs and Solutions

Potassium chloride (KCl), sodium chloride (NaCl), magnesium sulfate (MgSO_4), calcium chloride (CaCl_2), glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), potassium phosphate (KH_2PO_4), sodium carbonate (NaHCO_3), barium chloride (BaCl_2), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were obtained from Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Czech Republic) and used to prepare Krebs–Ringer bicarbonate solution and Ca^{2+} —free Krebs–Ringer bicarbonate solution. Other substances included phenylephrine (PE; purity $\geq 98\%$), carvacrol (purity $\geq 98\%$), isopentenyl pyrophosphate (IPP; purity $\geq 95\%$), and A967079 were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Stock solutions were prepared either in distilled water or in 99.9% ethanol, according to the solubility of substances. Consecutive dilutions were carried out in distilled water and stored at 0–4 °C.

2.1.2. Tissue Preparation

After surgical procedures at the Clinics for Abdominal Surgery, University Clinical Centre of the Republic of Srpska, Banja Luka the samples of the subsegment branch of the superior human mesenteric artery (HMA) were placed into the container filled with cooled modified Krebs–Ringer bicarbonate solution and transported by cold chain to the Centre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka. Samples were used for

experiments immediately after they were received in the laboratory. The mesenteric arteries were isolated and cleaned from surrounding connective tissue, after which they were cut into rings 3–4 mm in length. These procedures were performed in Petri dishes placed on flat ice packs. HMA rings, after two stainless steel hooks were pulled through their lumen, were suspended in a glass chamber filled with 10 mL of Krebs-Ringer bicarbonate solution (37 °C; pH 7.4), aerated with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. One hook was fastened to the transducer (MDE Research, Budapest, Hungary) that is connected to the amplifier, allowing the recording of changes in isometric tension using isoSys SOFT-02 software. Simultaneously, another hook was attached to the displacement unit, which allowed fine adjustment of resting tension.

2.1.3. Experimental Protocols

In order to obtain optimal results, each HMA ring was exposed to experimental conditions formerly defined in our laboratory [24,25]. After a 30 min adaptation period, preparations were gently adjusted to the passive tension of 2 g and incubated for 120 min. During this time, 40 mmol/L KCl was administered three times (30, 90, and 120 min). Between each administration medium was changed (every 10 min) and passive tension was set again at 2 g. Firstly, the vasorelaxant effect of carvacrol in isolated HMA was obtained by creating a concentration–response curve. Rings were pre-contracted with 1 µmol/L PE and when contraction reached a stable plateau, increasing concentrations of carvacrol (1–3000 µmol/L) were added. To investigate the role of TRPA1 channels in vasodilation of HMA, the rings were incubated with 10 µmol/L IPP (non-selective TRPA1 antagonist) or 1 µmol/L A967079 (selective TRPA1 antagonist) for 30 min and then carvacrol concentration–response curves were obtained (Figure S1) [26,27]. Vasorelaxant responses were presented as a percentage of decline in PE-induced pre-contraction and concentration–response curves were compared with representative control curves.

2.1.4. Ethical Approval

Sample collection and experiments were approved by the Ethics Committee of the University Clinical Centre of the Republic of Srpska, Banja Luka, the Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina (No. 01-19-491-2/23).

2.1.5. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed in SigMPlot version 14.0 software, while graphical representation was created in GraphPad Prism 6.0 software. Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni test, was performed. The results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) and were considered statistically significant if they had a null hypothesis probability of less than 5% ($p < 0.05$).

2.2. *In Silico* Experiments

2.2.1. 3D-QSAR

The dataset was created by obtaining small molecules that activate TRPA1 channels from the ChEMBL database. Negative logarithm values (pEC₅₀) for EC₅₀ activities that were previously converted to molar concentration were calculated. Activities of all compounds were measured under the same experimental condition. The dataset was divided into two groups, one with 20 compounds representing the training set used for partial least square (PLS) analysis and another with 9 compounds representing the test set used for external validation (Table S1). The determination of pKa values and the selection of dominant molecular forms at pH 7.4 were conducted using MarvinSketch 5.5.1.0 software [28]. Dominant structures were then optimized with the Hartree–Fock method using the Gaussian software included in the Chem3D Ultra 7.0 program [29].

The 3D quantitative structure–activity relationship (3D-QSAR) of TRPA1 agonists was investigated with Pentacle 1.07 software [30], which uses GRIND (GRid INdependent Descriptors) obtained from molecular interaction fields [31]. For the calculation of molecular

interaction fields, 4 different probes were used: DRY (represents hydrophobic interactions), O (sp² carbonyl oxygen, representing H-bond acceptor groups), N1 (amide nitrogen, representing H-bond donor groups), and the TIP probe (representing steric hot spots). The ALMOND algorithm was employed to identify and select 100 regions (nodes) with the most favorable interactions for each probe. Nodes were transformed to GRIND using the consistently large auto and cross-correlation (CLACC) algorithm and the values were presented in the form of a correlogram where each peak represents one variable. Selection of the most useful variables was done using fractional factorial design (FFD). The partial least squares (PLS) regression method was used to analyze the relationship between obtained variables and activities. In order to determine the statistical quality of created 3D-QSAR (TRPA1) models, their internal and external validation parameters were calculated. Internal validation represents the calculations performed only on molecules from the training set and includes the following parameters: squared correlation coefficient or coefficient of determination (R^2), cross-validated coefficient of determination (Q^2), and Root Mean Square Error of Estimation (RMSEE). The Q^2 was calculated using the leave one out (LOO-) approach, where a new model is formed by eliminating each compound from the training set once, after which this model is used to predict the Y-value of the removed compound. The difference in observed and predicted activity ($e_{(i)}$) was calculated for each compound and used to determine PRESS (Predicted Sum of Squares), RMSEE, and Q^2 .

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2$$

$$\text{RMSEE} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}}$$

$$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\sum (Y_{\text{obs}(\text{training})} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}$$

The PLS model can be considered as reliable if: $R^2 > 0.6$; $Q^2 > 0.5$ and $\text{RMSEE} < 0.5$ [32,33]. As a parameter of external validation, the predictive correlation coefficient (R_{pred}^2) was calculated using molecules from the test set:

$$R_{\text{pred}}^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{\text{obs}(\text{test})} - \bar{Y}_{\text{pred}(\text{test})})^2}{\sum (Y_{\text{obs}(\text{test})} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}$$

Additionally, r_m^2 metrics parameters (r_m^2 , $r_m'^2$, $\bar{r}_m^2$, Δr_m^2), that represents the strictest criterion of external validation were also calculated. For the predictive QSAR model, the values of these parameters should be $R_{\text{pred}}^2 > 0.5$; r_m^2 , $r_m'^2$ and their mean $\bar{r}_m^2 > 0.5$; while their difference $\Delta r_m^2 < 0.2$ [33,34].

Finally, the applicability domain, which defines the response and chemical structure space in which the QSAR model makes predictions with a given reliability, was determined [35].

2.2.2. ADMET Prediction

One of the aims of drug discovery is to identify the drug candidates possessing favorable ADMET properties, thus minimizing the risk of obtaining inadequate compounds during the early stages of drug development. In this study, the ADMET Predictor (TM) version 11.0, 64-bit edition (accessed by cloud) was used to predict various ADMET parameters related to carvacrol and designed compounds [36].

2.2.3. Molecular Docking

The cryo-EM structure of TRPA1 (PDB: 6X2J) in complex with ligand was obtained from Protein Data Bank (PDB) and used for AutoDock Vina docking protocol [37,38]. Prior to the beginning of the docking protocol, both ligand and receptor needed to be prepared using AutoDockTools 1.5.6 [39]. Polar hydrogens and charges were added to the ligand as well as to the receptor, and then water molecules were removed from the receptor and torsions were added to the ligand. The co-crystallized ligand located at the center of the grid box was used to create the docking grid with a grid point spaced at 1 Å. The acquired coordinates were saved in the configuring file and used in the docking process of tested molecules. The validation parameter for molecular docking is root mean square deviation (RMSD) and it was calculated by comparing the docked with the co-crystallized pose of the ligand using Discovery Studio Visualizer v4.1 [40]. The value of this parameter should be as near as possible to 0, while the model is considered reliable if $\text{RMSD} < 2$ [41].

2.2.4. Molecular Dynamic Simulation

The molecular dynamic (MD) simulation was performed for the two most stable complexes: 6X2J-carvacrol and 6X2J-most promising designed TRPA1 agonist, using YASARA Structure v.20.12.24.2.64 software. The experimental setup included hydrogen-bond optimization and pKa prediction for the selected pH value (7.4) [42]. The simulation was run for 50 ns with the AMBER 14 force field, while the setup conditions for temperature and pressure were 298 K and one atmosphere, respectively. Three validation parameters were analyzed: total potential energy of the simulated systems, radius of gyration (Rg), and RMSD of ligand conformation changes during the simulation.

3. Results and Discussion

3.1. Organ Bath

Organ bath methodology was used to evaluate the role of TRPA1 channels in carvacrol-induced vasodilation. After pre-incubation of HMA rings with non-selective TRPA1 antagonist (10 μM IPP), the maximum vasorelaxant effect caused by 3 mM of carvacrol was decreased from 107.6% to 83.7% (Figure 1a). Similar results were observed when the preparations were incubated with TRPA1 selective blocker A967079 (Figure 1b). The efficacy of carvacrol was significantly reduced in the presence of A967079 or IPP, whereas its potency showed little to no change, as indicated by minimal changes in the EC_{50} values. Control vehicle curves are not shown in the graph, but they were stable over time.

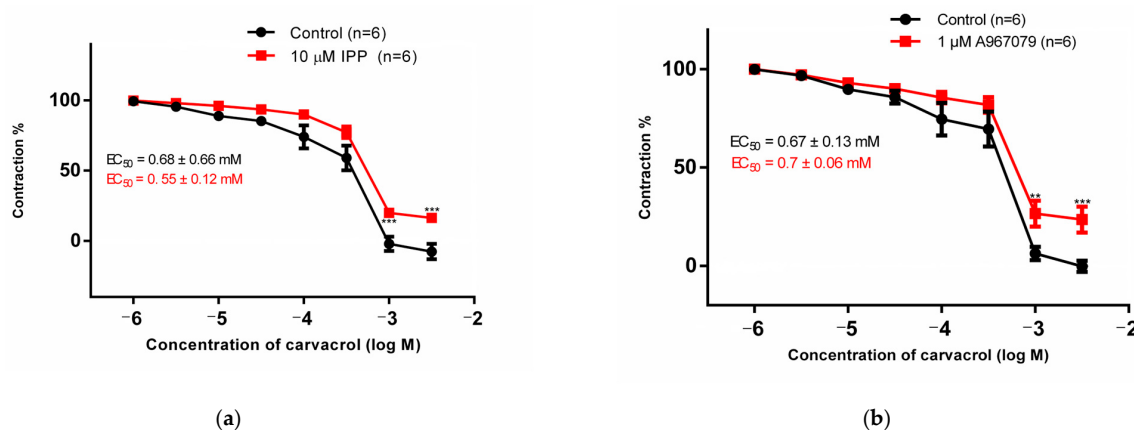


Figure 1. The graph shows the relaxant effect of carvacrol (CRV; 1–3000 μM) on HMA pre-incubated with (a) IPP (10 μM) or (b) A967079 (1 μM) and then pre-contracted with 1 μM PE. Values are expressed as percentage of primary PE contraction, which is referred to as 100% (mean $\pm$ SEM); (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; two-way ANOVA, followed by Bonferroni test). The EC_{50} of the vasorelaxant effect of carvacrol was calculated for each curve, both in the presence and absence of TRPA1 antagonists.

Although the maximal effect of carvacrol-induced vasodilation was reduced in presence of the either IPP or A967079, carvacrol still caused vasorelaxation of pre-contracted HMA at high concentrations. This indicates the possible involvement of other mechanisms besides the activation of TRPA1 channels in carvacrol-induced vasodilation.

As a constituent of essential oil, the ability of carvacrol to dilate smooth muscles was first described on isolated rat uteri [43]. Several studies confirmed the vasorelaxant effect of carvacrol even in human blood vessels [13]. Although carvacrol can cause hypotensive effects by inducing vasodilation, the exact mechanism of its action is still not completely explained. The blocking of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels was most often proposed as a leading mechanism of the vasorelaxant effect caused by monoterpenoid compounds [13,44,45]. Both carvacrol in the concentration of 3 mM and similar monoterpene carveol in the concentration of 5 mM managed to relax pre-contracted isolated human umbilical arteries regarding the above-mentioned mechanism [13,45]. Testai et al. reported that 3 mM of 4 aminopyridine and 200 μM of quinine (blockers of voltage-gated potassium channels; K_v) reduced the vasodilation caused by lower concentrations of carvacrol (0.1 to 50 μM) in rat aorta, indicating the involvement of K_v channels in the mechanism of its action [46]. Carvacrol is also a well-known agonist of TRPA1, channels whose activation can engage further mechanisms, resulting in the relaxation of blood vessels. In recent years, there have been numerous studies investigating the role of TRP channels in the regulation of vascular tone, with emphasis on the TRPA1 channel. Bautista et al. reported that activation of the TRPA1 channel on perivascular nerve endings can cause vasodilation of isolated rat mesenteric arteries [47]. Several articles showed that formaldehyde, zinc pyrithione, and α -pinene also caused vasorelaxation of the murine mesenteric artery including TRPA1 activation as a leading mechanism [48–51]. Activation of TRPA1 channels caused either neurogenic vasodilation or endothelial-dependent vasodilation of isolated animal arteries [52,53]. The increase in dermal blood flow evoked by topically applied cinnamaldehyde (TRPA1 agonist) on the human forearm was diminished by TRPA1 antagonist LY3526318 [53]. An intravenously injected lower dose of cinnamaldehyde caused a significant hypotensive effect in wild-type mice compared to TRPA1 knockout mice [54]. In light of the aforementioned studies and our results, it is evident that these channels are integral to the processes that regulate vascular tone.

3.2. 3D-QSAR

In silico methods were applied in order to design novel molecules based on carvacrol structure with better activity on TRPA1 channels which could result in possibly better vasorelaxant effect. Alongside other in silico models, a credible QSAR model was developed to identify and predict the inhibitory effects on TRPA1 channels among known approved substances [55]. As far as we know, no QSAR model has been developed to predict agonistic activity on TRPA1 channels.

A reliable 3D-QSAR model for the prediction of TRPA1 agonist activities was created using molecules from the training set. Initially, the entire set of GRIND variables was used to build the PLS model in order to select a significant pharmacophore. To obtain a non-over-fitted model, the number of variables was reduced using the FFD selection algorithm. As can be seen from Table 1, values of both internal validation ($R^2 = 0.83$ and $Q^2 = 0.59$) and external validation parameters ($R^2_{\text{pred}} = 0.84216$; $r_m^2 = 0.75732$; $\bar{r}_m^2 = 0.61483$; $r_m'^2 = 0.68608$; $\Delta r_m^2 = 0.14249$) indicate the good predictive ability of the 3D-QSAR model. Additionally, the determined applicability domain found no outliers in the dataset.

The model's good predictive power could be also observed in the plot of experimental versus predicted values, where the even distribution of pEC_{50} values around the regression line indicates slight deviations between experimental and predicted activities for all compounds in the dataset (Figure 2). It is important to note that the range of experimental pEC_{50} values observed for the L compound is narrow. However, this range of pEC_{50} values is typical among small molecules known to activate TRPA1, such as carvacrol.

Table 1. Experimental and predicted activities of the compounds in the dataset with calculated validation parameters.

Training Set					
Compounds	Experimental pEC50	Predicted pEC50	Compounds	Experimental pEC50	Predicted pEC50
L1	4.77	4.26	L12	4.52	4.59
L2	5.05	4.87	L13	4.07	4.01
L3	5.00	5.30	L14	3.30	3.61
L4	4.02	4.01	L15	4.71	4.69
L5	3.77	3.99	L16	3.83	3.91
L6	4.22	4.10	L17	4.52	4.56
L7	4.93	4.86	L18	4.78	4.95
L8	4.00	3.90	L19	5.00	4.82
L9	5.06	5.08	L20	4.12	4.36
L10	4.92	4.60	R ² = 0.83		
L11	4.52	4.67	Q ² = 0.59		
Test Set					
Compounds	Experimental pEC50	PredictedpEC50	Compounds	Experimental pEC50	Predicted pEC50
L21	5.01	4.90	L27	4.72	4.87
L22	4.70	4.55	L28	4.08	4.00
L23	4.08	4.24	L29	4.52	4.59
L24	3.83	4.09	R ² _{pred} = 0.84226 RMSEP = 0.16145		
L25	4.77	4.56	r ² _m = 0.75732 r ² _m ' = 0.61483		
L26	5.00	4.82	r ² _m = 0.68608 Δr ² _m = 0.14249		

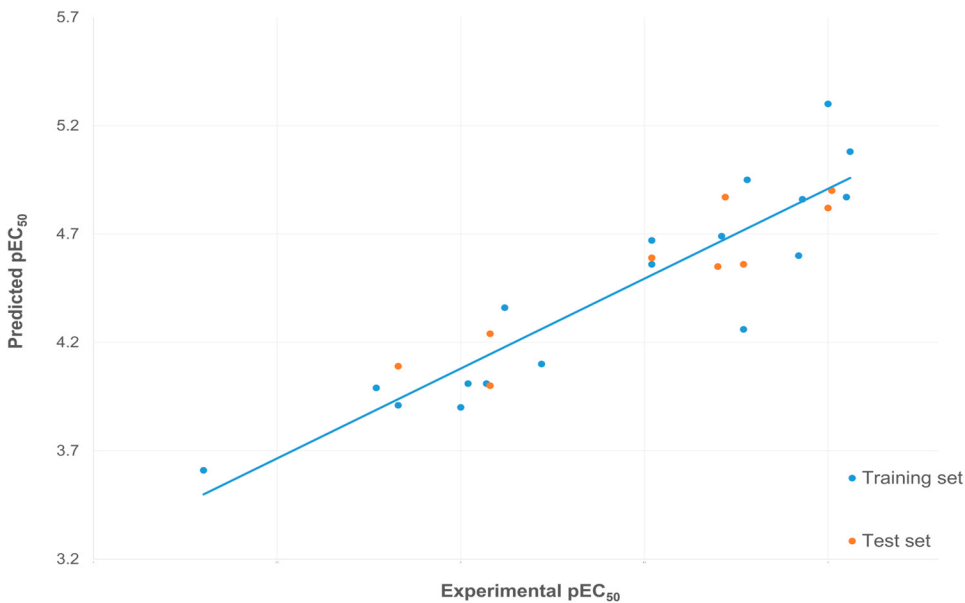


Figure 2. The plot of experimental and predicted TRPA1 activators activities expressed as pEC₅₀.
The most important variables in the created PLS model were selected to explain the impact of present structural characteristics on TRPV1 activity (Table 2).

Table 2. List of most important GRIND variables.

Variable	Node Pair	Distance [Å]	Impact	Description
450	N1-TIP	10.8–11.2	+	Distance between HBA and steric region on the benzene ring
397	O-TIP	8.4–8.8	–	Distance between HBD and steric region on the benzene ring
350	O-N1	8.4–8.8	+	Distance between HBD and HBA on the benzene ring
106	N1-N1	4.8–5.2	+	Distance between two HBAs on the benzene ring
115	N1-N1	8.4–8.8	+	Distance between two HBAs on the benzene ring
51	O-O	1.6–2.0	+	Distance between two HBDs on the benzene ring
60	O-O	5.2–5.6	+	Distance between two HBDs on the benzene ring
68	O-O	8.4–8.8	+	Distance between two HBDs on the benzene ring
388	O-TIP	4.8–5.2	–	Distance between HBD and the steric region on the benzene ring
406	O-TIP	12.0–12.4	–	Distance between HBD and the steric region on the benzene ring

Positive and negative influences of pharmacophoric features present in selected compounds on TRPA1 activity are illustrated in Figure 3. The phenyl group created a favorable interaction with the steric region when they were in a meta position on the benzene ring (v450; N1-TIP). However, this same region of the molecule could also result in the most influential negative interaction, when it is presented to a hydrogen bond acceptor (v388; O-TIP). Additionally, when two phenyl groups were placed close one to another on a benzene ring, they formed positive interactions (v106 and v115; N1-N1).

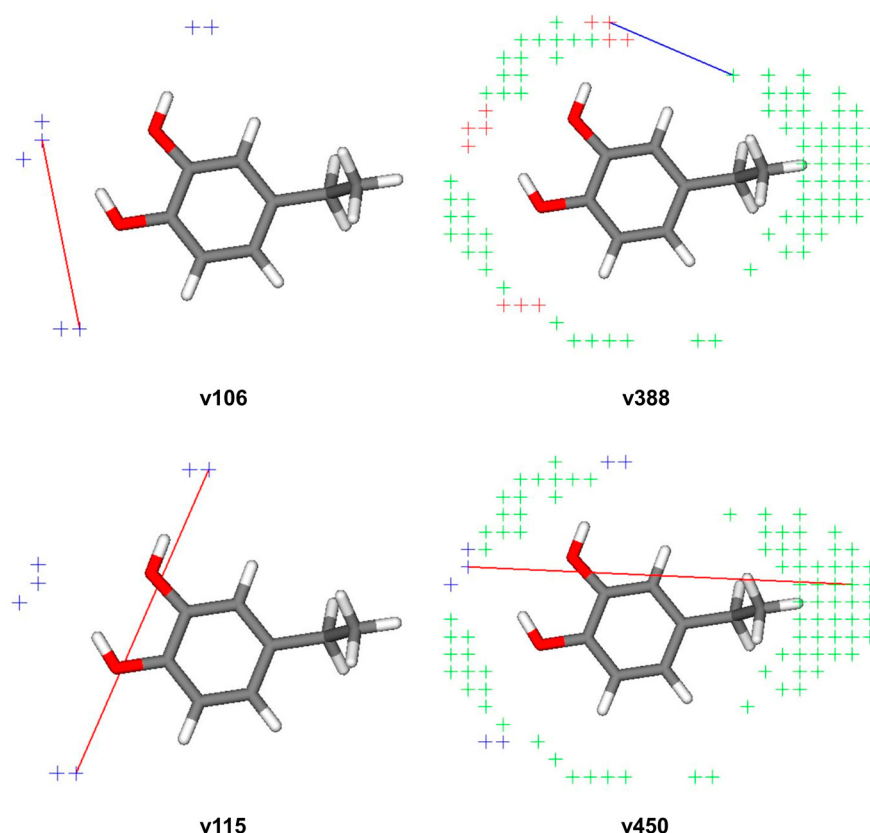


Figure 3. Illustration of the most important variables and their positive and negative influences on the activity of compound L17 against TRPA1. TIP probes are presented in green, O probes in red, and N1 probes in blue. Favorable interactions are depicted with red lines, while unfavorable interactions are presented with blue lines.

Carvacrol was a chosen compound, which underwent a modification process in order to create novel molecules with an intensified ability to activate TRPA1 channels (Table S2). Described interactions were used as guidelines to modify the structure of carvacrol, which resulted in the design of 10 compounds with enhanced pEC₅₀ values (Figure 4). After designing the structures, we searched the ChEMBL database and found that molecules D9, D82, D83, and D84 were already documented. Despite being known, their activity on TRPA1 channels had not been investigated previously.

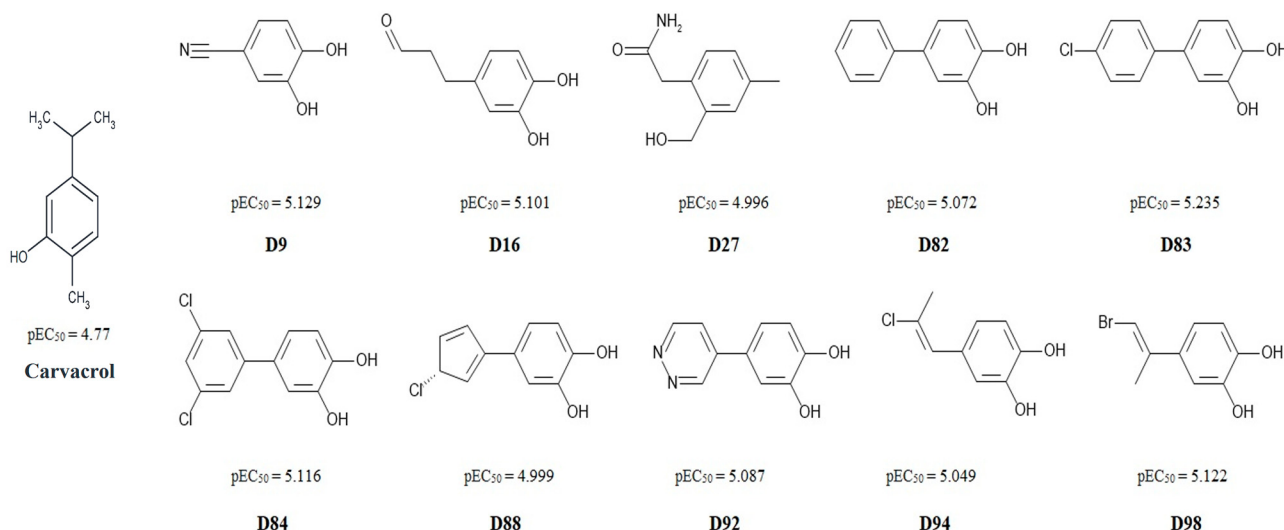


Figure 4. Selection of designed compounds with the highest 3D-QSAR predicted pEC₅₀ values, along with carvacrol and its experimental pEC₅₀ value.

Considering that the chemical structure of carvacrol is quite simple, minor changes could create new compounds with significantly altered activities on TRPA1 channels. The replacement of the methyl group in the carvacrol structure with the hydroxyl group proved to be an important adaptation in almost all compounds with enhanced activity. In position 4C on the benzene ring, different structural features showed contribution to the activity such as benzene; 1,3-dichlorobenzene; chlorobenzene; 1-chlorocyclopentane-2,4-dien; pyridazine; propanal; 1-bromoprop-1-en-2-yl; 1-chloroprop-1-en-1-yl. These groups represent steric regions at an optimum distance that is necessary to achieve interactions.

The predicted pEC₅₀ values for D compounds were higher compared to the experimental pEC₅₀ value for carvacrol (4.77) and slightly higher than the pEC₅₀ values of some other compounds used to create the model. Although the validation of the model was successful, providing a reliable tool for predicting TRPA1 pEC₅₀ values, further studies are necessary to determine the EC₅₀ of this compound under experimental in vitro conditions. Compound D27 also showed improved activity although its structure is slightly different from other designed molecules. With the exception of D27, all other D compounds are catechols. The presence of two hydroxyl groups could result in the formation of intramolecular hydrogen bonds. However, strong hydrogen bond interactions between hydroxyl groups in catechols are maintained in weakly interacting solvents, while in strongly interacting solvents such as water, internal hydrogen bonds are lost [56]. As experimentally confirmed by Callear et al., the hydrogens on the hydroxyl groups in dopamine are rather oriented to allow intermolecular hydrogen bonding instead of forming intramolecular hydrogen bonds in catechols [57]. Compound D16 contains an aldehyde group, while compounds D94 and D98 feature alkenes. Both functional groups are highly reactive and could potentially bind covalently to the amino acid residues of TRPA1, particularly cysteine, making them less favorable candidates for synthesis. This risk should be taken into account and evaluated in further in vitro studies.

Considering that all D compounds are small molecules, they may exhibit promiscuity and interact with other receptors. Additionally, TRP channels share structural similarities

that could facilitate such interactions. Carvacrol itself, besides activating TRPA1, can also activate TRPV3 channels [58]. Therefore, it could be interesting to evaluate the activity of these compounds on other TRP channels in future studies.

3.3. ADMET Properties

The physicochemical and biological properties of selected designed compounds were further estimated in order to eliminate molecules with potentially inadequate ADMET characteristics in the early stages of drug development. Although all compounds showed optimal ADMET properties, only six molecules had improved ADMET scores compared to carvacrol (Table 3). Among those molecules, compound D27 stands out with the lowest ADMET risk, equal to 0. Here, it is also necessary to mention that this model is limited to predicting only CYP metabolism. Considering that almost all D compounds are catechols, these compounds can be substrates for COMT and have shorter durations of action. Compound D27, which showed the most promising predicted ADMET properties, is not catechol and thus cannot be a candidate for COMT metabolism. However, further in vitro and in vivo studies are necessary to precisely evaluate the complete ADMET characteristics of these compounds.

Table 3. Calculated ADMET properties of carvacrol and selected designed compounds using ADMET Predictor (TM) version 11.0, 64-bit edition (accessed by cloud).

Compound	LogBBB	S+PrUnbnd	S+Pgp	RuleOf5	CYP_Risk	CYP_Code	TOX_MUT_Risk	TOX_MUT_Code	TOX_Risk	TOX_Code	ADMET_Risk	ADMET_Code	SynthDiff
Carvacrol	0.26	18.3	No	0	2.7	1A2; 2C9; CL	0	/	0	/	2.7	1A2; 2C9; CL	1.49
D9	−0.45	32.2	Yes	0	0	/	0.6	m_97	1	HEPX	1	HEPX	1.86
D16	−0.22	50.0	Yes	0	1	CL	0.6	S_97	1	HEPX	2	HEPX; CL	2.09
D27	−0.66	70.4	Yes	0	0	/	0	/	0	/	0	/	1.82
D82	0.16	7.9	No	0	1	CL	0.6	m_97	0	/	1	CL	1.39
D83	0.37	4.4	No	0	1	CL	0.6	m_97	0	/	2.8	Kow; fu; CL	1.52
D84	0.52	3.5	No	0	1	CL	0.6	m_97	0	/	4	Kow; Sw; fu; CL	1.97
D88	0.14	8.9	Yes	0	1	CL	0.6	NIHS	1	HEPX	2	HEPX; CL	3.92
D92	−0.26	25.9	No	0	0.3	CL	1.2	m_97; NIHS	3	Xm; HEPX; MUT	3.3	Xm; HEPX; MUT; CL	2.41
D94	0.22	13.7	No	0	1	CL	0.6	m_97	1	HEPX	2	HEPX; CL	2.46
D98	0.22	15.9	Yes	0	1.7	2C19; CL	0.6	m_97	1	HEPX	2.7	HEPX; 2C19; CL	2.60

LogBBB (logarithm of the Brain/Blood partition coefficient), S+PrUnbnd (percent UNBOUND to blood plasma proteins), S+Pgp (P-glycoprotein substrate), RuleOf5 (Lipinski's Rule of 5), CYP_Risk (risk connected with P450 oxidation: a score in the 0–6 range), CL (high microsomal clearance), 1A2 (high 1A2 clearance), 2C19 (high 2C19 clearance), 2C9 (high 2C9 clearance), TOX_MUT_Risk (risk of mutagenicity: a score in the 0–5.4 range), m_97 and S_97 (risk of positive Ames test results with (m*) or without (S*) microsomal activation for Salmonella typhimurium strains TA97), NIHS (panel predictions are not split out with respect to S9 activation or lack thereof), TOX_Risk (risk connected with predicted toxicity: a score in the 0–6 range, Xm (carcinogenicity in mice), HEPX (hepatotoxicity), MUT (Ames positive), ADMET_Risk (Full ADMET Risk: a score in the 0–22 range) fu (fraction unbound), Kow (lipophilicity), SynthDiff (score in the 0–10 range).

Accurate estimation of synthetic difficulty, whether conducted conceptually or through in silico methods, is essential for prioritizing molecules for synthesis and testing during the early stages of drug discovery. Utilizing an in silico model for this purpose significantly increases the number of synthesis candidates that can be considered. The predicted SynthDiff score for all compounds is low, indicating synthetic accessibility. Alongside carvacrol, compounds D27 and D83 have the lowest scores of 1.52 and 1.82, respectively. In comparison with ADMET Predictor examples benzene (SynthDiff = 0) and riboflavin (SynthDiff = 4), it can be said that the routes to synthesize these molecules should be quite simple. Factors such as a chemist's creativity, expertise in synthetic chemistry, access

to starting materials, and the laboratory equipment at their disposal can all significantly influence the synthesis procedure.

3.4. Molecular Docking

While the purpose of creating a 3D-QSAR model was to predict the activities of designed compounds, the molecular docking study allowed us to gain deeper knowledge about binding affinity and interactions between molecules and active sites on the TRPA1 channel. The TRPA1 channel consists of four identical subunits arranged in a tetramer, where each subunit encloses six transmembrane helices [59]. A binding pocket is formed between the first four transmembrane helices (S1–S4) of one subunit and two transmembrane helices (S5–S6) of the neighboring subunit [60]. Considering that carvacrol is a non-covalent activator of TRPA1 channels, a 3D-TRPA1 structure with a co-crystal non-covalent binding ligand (PDB code: 6X2J) was used to create the docking model [60]. The structure of TRPA1 and its cocrystallized ligand were prepared prior to the calculation of the grid box based on the position of the ligand. Docking of selected designed molecules was performed using obtained coordinates from the grid box. The reliability of the docking study was confirmed by calculating root mean square deviation (RMSD). To calculate RMSD, the docked ligand pose should match the determined electron microscopy ligand pose, and the RMSD value has to be lower than 2 Å [41]. In our study, the RMSD value was 0.4179 Å, indicating that the created docking model was reliable. The calculated binding energies of docked designed compounds are lower compared to the binding energy of carvacrol (Table 4).

Table 4. Virtual docking and QSAR activity results of carvacrol and selected designed TRPA1 agonists.
* In the interacting residue column, residues engaged in hydrogen bonding are denoted in bold.
§ Carvacrol's EC₅₀ value is experimental.

Compound	Predicted dpEC ₅₀	Bind Energy [kcal/mol]	Interacting Residue *
Carvacrol	4.770 §	−5.2	Ala (B:939); Leu (B:936); Leu (B:891); Ala (A:836); Ile (A:837)
D9	5.129	−5.0	Leu (B:936); Ile (A:837)
D16	5.101	−5.4	Ser (B:943) ; Ala (B:939); Phe (A:841); Gln (B:940)
D27	4.996	−6.0	Ala (A:836); Leu (B:891); Ile (A:837); Leu (B:936); Phe (A:841); Gln (B:940)
D82	5.072	−6.3	Ser (B:943); Ile (A:837); Leu (B:936); Tyr (A:840); Phe (A:841)
D83	5.235	−6.0	Ser (B:943) ; Phe (A:841); Gln (B:940) ; Phe (B:947); Met (A:844); Leu (A:807); Ile (A:803); Ala (B:939)
D84	5.116	−5.9	Phe (A:841)
D88	4.999	−5.7	Phe (A:841); Ile (A:837); Leu (B:936) ; Ala (A:836) ; Tyr (A:840); Ala (B:939)
D92	5.087	−5.8	Ala (B:939) ; Leu (B:936); Ile (A:837); Ser (B:887)
D94	5.049	−5.4	Ile (A:837); Leu (B:936) ; Phe (A:841); Tyr (A:840)
D98	5.122	−5.2	Ile (A:837); Leu (B:936)

Results showed that 8 out of 10 designed molecules with better-predicted activities also have lower binding energies compared to carvacrol indicating their ability to form a more stable complex with the receptor. By observing carvacrol interactions with TRPA1, it can be seen that residues Ala (A:836), Leu (B:891), and Leu (B:936) create alkyl interaction with methyl group, while Leu (B:936) in addition to this alkyl interaction and Ala (B:939) create Pi-alkyl interaction with the benzene ring. Apart from these interactions, Ile (A:837) creates an important hydrogen bond with the phenyl group of carvacrol (Figure 5). The presence of hydroxyl groups, which frequently act as hydrogen bond donors or acceptors, allows designed molecules to interact with residues in the binding pocket of the receptor via

hydrogen bonds. Although molecules D82 and D84 had lower binding energies compared with carvacrol, they did not form any hydrogen bonds, which is necessary to ensure better ligand–receptor complex stability. Residues that interact with compound D27 correspond to the residues that interact with carvacrol (Ala (A:836), Leu (B891), Leu (B:936), and Ile (A:837)).

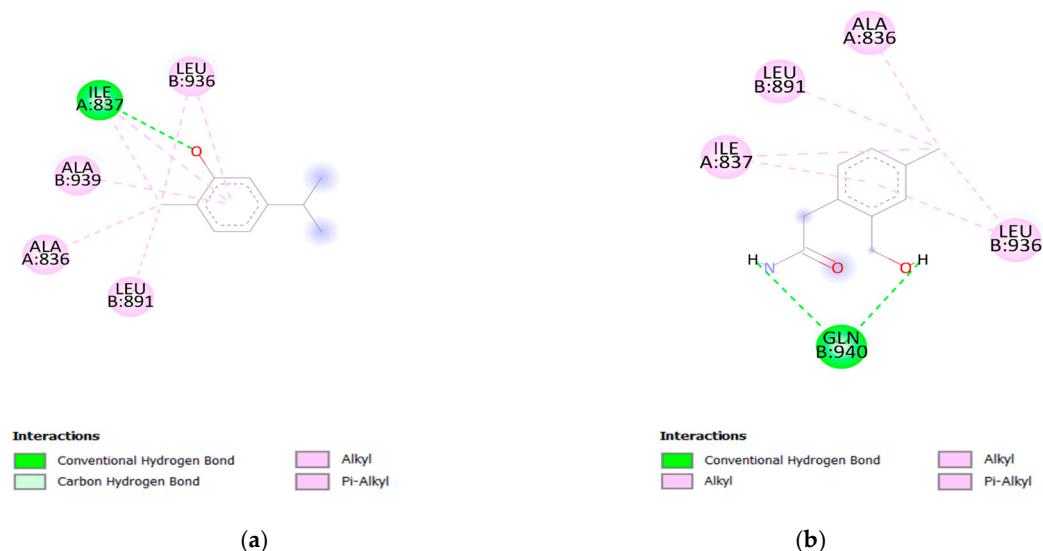


Figure 5. (a) Carvacrol and (b) Compound D27 docked into TRPA1.

3.5. Molecular Dynamic Simulation

In order to further evaluate the stability of carvacrol–TRPA1 and D27–TRPA1 complexes, MD simulation was performed. Evaluating total potential energy, radius of gyration, and RMSD during MD simulations is crucial for understanding the stability and behavior of molecular systems [61]. Each of these parameters offers unique insights into the dynamics and potential effectiveness of molecules, particularly in drug development and biochemical research.

Total potential energy is a fundamental measure in MD simulations that reflects the sum of all interatomic forces, including bonds, angles, dihedrals, and non-bonded interactions within a system. A stable MD simulation typically shows the potential energy reaching a plateau or exhibiting minimal fluctuations around a baseline value. This suggests that the molecular system has reached equilibrium, an essential state for accurate biophysical analyses. Changes in the potential energy when comparing derivatives or interactions with different ligands can indicate how modifications affect the stability and reactivity of a molecule. Both carvacrol and D27 appear to reach a stable state relatively quickly as evident from the flattening of the total potential energy curves (Figure 6a).

Carvacrol starts and remains at a lower total potential energy (around -5.15×10^9 kJ/mol) throughout the simulation. This indicates that carvacrol is in a more stable configuration compared to D27 which fluctuates around -5.05×10^9 kJ/mol. Although these fluctuations are minor, they are more pronounced than in carvacrol, which suggests slightly less stability or more dynamic structural adjustments during the simulation. Since carvacrol is a known agonist of the human TRPA1 receptor, the lower and more stable energy profile suggests that its interaction with the receptor might be energetically more favorable [62]. D27, despite being derivative, shows higher energy values, which could imply less favorable interactions or a different mechanism of action, though it still maintains substantial stability. Since D27 is a structural modification of carvacrol aimed at enhancing certain properties (such as solubility, receptor affinity, or specificity), its higher energy state might be a trade-off for other beneficial properties. These energy profiles could guide further modifications to optimize D27's interaction with TRPA1 or other targets.

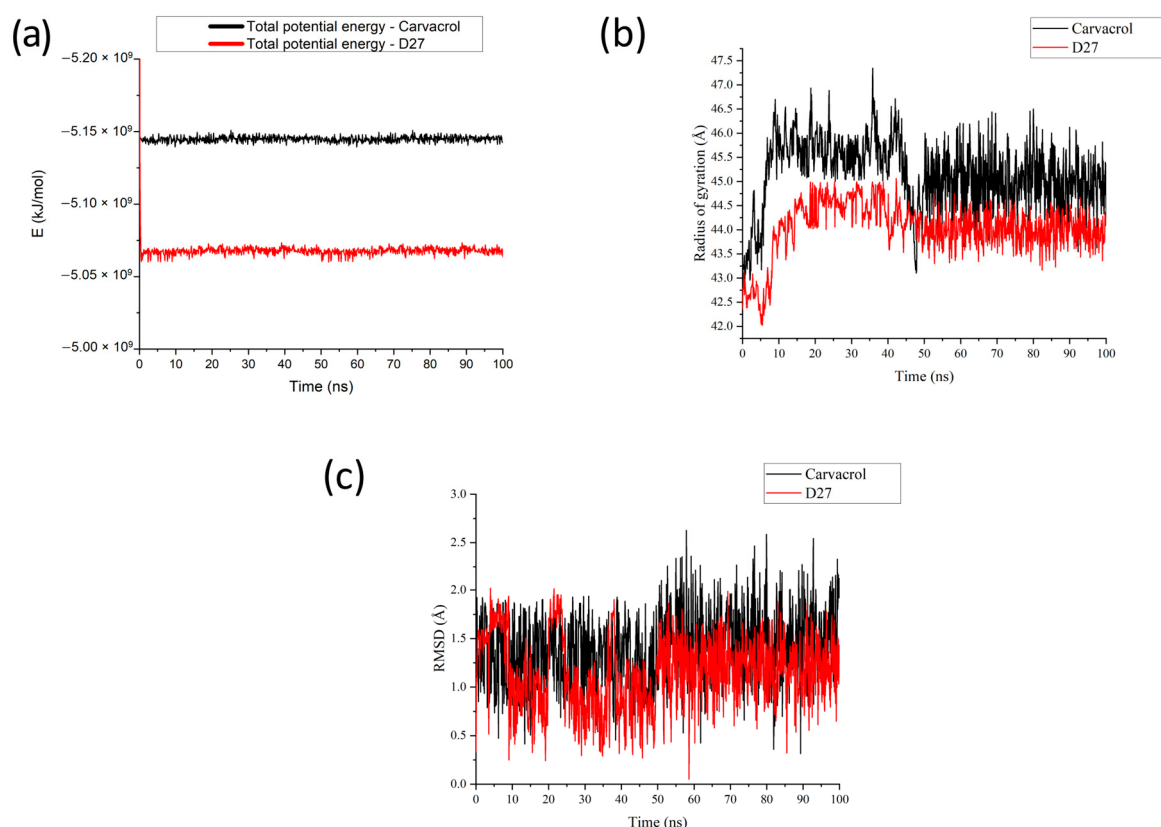


Figure 6. (a) Total potential energy (b) the radius of the gyration and (c) RMSD trajectories of TRPA1 in complexes with carvacrol and compound D27.

The carvacrol–TRPA1 complex shows a higher radius of gyration overall, indicating that it is less compact compared to the D27–TRPA1 complex (Figure 6b). At first, it fluctuated between approximately 43.5 Å to 47.5 Å, additionally stabilizing in the range between 44.5 Å to 44.6 Å in the period from 50 ns to 100 ns of the simulation. The larger fluctuations might suggest that carvacrol in complex undergoes more conformational changes during this period of the simulation. However, D27 maintains a consistently lower radius of gyration, first ranging around 42.5 Å to 45 Å, and then from 50 ns to 100 ns ranging between 43.5 Å to 44.5 Å, suggesting a more stable conformation compared to carvacrol. The greater range and higher value of the radius of gyration might indicate that carvacrol can conform differently in response to environmental changes, potentially allowing for various interactions with the TRPA1 receptor.

Figure 6c shows the RMSD of carvacrol and its derivative D27 over a 100 ns molecular dynamics simulation. RMSD is a common measure used to assess the conformational stability of a molecule relative to a reference structure across the simulation time. Carvacrol shows RMSD values fluctuating broadly between approximately 0.5 Å and 2.25 Å, similar to those observed for D27, indicating structural stability of the analyzed complexes during the MD simulation. These curves suggest that both ligands, once they adopt a conformation compatible with their target, can maintain this interaction with greater consistency.

Previous docking simulation studies have proposed an optimal conformation for interaction with the receptor. We compared this conformation to the one with minimum energy observed during the simulation, as illustrated in Figure 7. The calculated RMSD between these conformations is 0.3096 Å, confirming the conformational stability of D27 throughout the simulation, which closely mimics physiological conditions

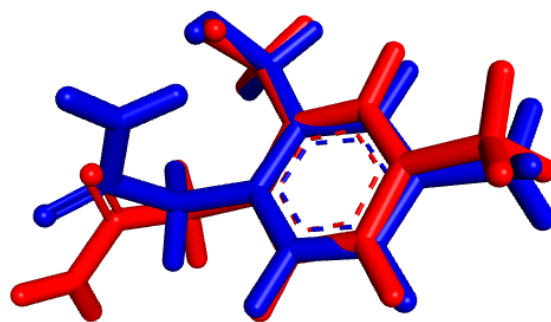


Figure 7. Blue represents the conformation of compound D27 from docking studies, while red indicates the conformation of compound 27 with minimum energy observed during the MD simulation.

One of the key strengths of this study is the use of human blood vessels in the *in vitro* experiments, significantly enhancing the relevance and applicability of our findings to human physiology and potential therapeutic interventions. To our knowledge, this study is the first to evaluate the role of TRPA1 channels in human blood vessels. Furthermore, the combination of various *in silico* approaches provides detailed insights into the properties of the designed molecules.

However, this study also has its limitations. The organ bath setup isolates tissue from its natural environment, which excludes systemic interactions and may affect the accuracy of *in vivo* replication. Although the validation parameters of the 3D-QSAR model are satisfactory, a more homogeneous dataset with additional similar molecules activating TRPA1 could further enhance modeling accuracy.

Our future research will focus on synthesizing the suggested compounds and experimentally testing their activities and ADMET properties to validate our *in silico* predictions.

4. Conclusions

The present study showed that vasorelaxant effect caused by carvacrol in HMA model was partially reversed by the application IPP (10 μ M) and A967079 (1 μ M), further indicating the involvement of TRPA1 channels. A reliable 3D-QSAR model able to predict the activity of TRPA1 agonists with dependable accuracy was created. Considering the results obtained from different *in silico* studies, compound D27 has the most promising predicted properties to be a potential novel TRPA1 agonist, regarding its activity, ADMET profile, interaction, and stability in complex with TRPA1 channel. Nevertheless, further studies are necessary in order to synthesize D27 and other improved TRPA1 agonists and to evaluate their activities in experimental *in vitro* conditions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics16070951/s1>, Figure S1: Chemical structures of TRPA1 antagonists (a) IPP and (b) A967079; Table S1: Chemical structures of compounds from training and test datasets; Table S2: Chemical structures of all designed compounds with their predicted EC₅₀ values.

Author Contributions: Conceptualization, Đ.Đ., R.Š., S.M.T. and Ž.G.; methodology, Đ.Đ., M.G.B., S.M.T. and R.Š.; software, Đ.Đ., R.S. and Ž.G.; validation, Đ.Đ., S.M.T., R.S., M.G.B. and Ž.G.; formal analysis, Đ.Đ., S.M.T., M.G.B. and R.S.; investigation Đ.Đ., M.G.B. and R.S.; data curation, Đ.Đ., R.S., S.M.T., M.G.B. and Ž.G.; writing—original draft preparation, Đ.Đ. and R.S.; writing—review and editing, R.Š., S.M.T. and Ž.G.; visualization, Đ.Đ., R.Š., M.G.B. and R.S.; supervision, R.Š. and Ž.G.; funding acquisition, R.Š. and Ž.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by the Ministry of Scientific and Technological Development and Higher Education of the Republic of Srpska, grant number 19.032/961-28/23.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University Clinical Centre of the Republic of

Srpska, Banja Luka, the Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina (No. 01–19–515–2/20) (Decision no 01–19–491–2/23, dated 26 December 2023).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived because the branches of the mesenteric artery obtained from resected colon tissue during routine abdominal surgeries are considered as biomedical waste. These arteries were delivered unmarked to the Centre for Biomedical Research and used only for functional pharmacological studies. Consequently, these samples cannot be linked to any patient’s personal or medical records.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: A pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet* **2021**, *398*, 957–980. [CrossRef] [PubMed]
2. Tackling, G.; Borhade, M.B. *Hypertensive Heart Disease*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539800/> (accessed on 20 March 2024).
3. Wang, J.; Feng, B.; Yang, X.; Liu, W.; Xiong, X. Chinese herbal medicine for the treatment of prehypertension. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 493521. [CrossRef] [PubMed]
4. Steegers, E.A.; von Dadelszen, P.; Duvekot, J.J.; Pijnenborg, R. Pre-eclampsia. *Lancet* **2010**, *376*, 631–644. [CrossRef] [PubMed]
5. Bouyahya, A.; Chamkhi, I.; Benali, T.; Guaouguaou, F.E.; Balahbib, A.; El Omari, N.; Taha, D.; Belmehdi, O.; Ghokhan, Z.; El Menyiy, N. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *265*, 113318. [CrossRef] [PubMed]
6. Sharifi-Rad, M.; Berkay, Y.Y.; Antika, G.; Salehi, B.; Tumer, T.B.; Kulandaisamy, V.C.; Das, G.; Patra, J.K.; Karazhan, N.; Akram, M.; et al. Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Origanum*. *Phytother. Res.* **2021**, *35*, 95–121. [CrossRef]
7. De Vincenzi, M.; Stamatii, A.; De Vincenzi, A.; Silano, M. Constituents of aromatic plants: Carvacrol. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 801–804. [CrossRef] [PubMed]
8. Sharifi-Rad, M.; Varoni, E.M.; Iriti, M.; Martorell, M.; Setzer, W.N.; Del Mar Contreras, M.; Salehi, B.; Soltani-Nejad, A.; Rajabi, S.; Tajbakhsh, M.; et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother. Res.* **2018**, *32*, 1675–1687. [CrossRef] [PubMed]
9. Suručić, R.; Kundaković, T.; Lakušić, B.; Drakul, D.; Milovanović, S.R.; Kovačević, N. Variations in Chemical Composition, Vasorelaxant and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activities of Essential Oil from Aerial Parts of *Seseli pallasii* Besser (Apiaceae). *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1600407. [CrossRef] [PubMed]
10. Aydin, Y.; Kutlay, O.; Ari, S.; Duman, S.; Uzuner, K.; Aydin, S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1365–1371. [CrossRef]
11. Gonçalves, T.A.F.; Lima, V.S.; de Almeida, A.J.P.O.; de Arruda, A.V.; Veras, A.C.M.F.; Lima, T.T.; Soares, E.M.C.; Santos, A.C.D.; Vasconcelos, M.E.C.; de Almeida Feitosa, M.S.; et al. Carvacrol Improves Vascular Function in Hypertensive Animals by Modulating Endothelial Progenitor Cells. *Nutrients* **2023**, *15*, 3032. [CrossRef]
12. Dias, C.J.; Costa, H.A.; Alves Dias-Filho, C.A.; Ferreira, A.C.; Rodrigues, B.; Irigoyen, M.C.; Romão Borges, A.C.; de Andadre Martins, V.; Branco Vidal, F.C.; Ribeiro, R.M.; et al. Carvacrol reduces blood pressure, arterial responsiveness and increases expression of MAS receptors in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2022**, *917*, 174717. [CrossRef] [PubMed]
13. Đukanović, Đ.; Bojić, M.G.; Marinković, S.; Trailović, S.; Stojiljković, M.P.; Škrbić, R. Vasorelaxant effect of monoterpene carvacrol on isolated human umbilical artery. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2022**, *100*, 755–762. [CrossRef] [PubMed]
14. Clapham, D.E.; Runnels, L.W.; Strübing, C. The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 387–396. [CrossRef] [PubMed]
15. Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R.; Mosbacher, J.; Hricik, T.R.; Earley, T.J.; Hergarden, A.C.; Andersson, D.A.; Hwang, S.W.; et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **2003**, *112*, 819–829. [CrossRef] [PubMed]
16. Bautista, D.M.; Jordt, S.E.; Nikai, T.; Tsuruda, P.R.; Read, A.J.; Poblete, J.; Yamoah, E.N.; Basbaum, A.I.; Julius, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **2006**, *124*, 1269–1282. [CrossRef] [PubMed]
17. Andrei, S.R.; Sinharoy, P.; Bratz, I.N.; Damron, D.S. TRPA1 is functionally co-expressed with TRPV1 in cardiac muscle: Co-localization at z-discs, costameres and intercalated discs. *Channels* **2016**, *10*, 395–409. [CrossRef] [PubMed]
18. Qian, X.; Francis, M.; Solodushko, V.; Earley, S.; Taylor, M.S. Recruitment of dynamic endothelial Ca²⁺ signals by the TRPA1 channel activator AITC in rat cerebral arteries. *Microcirculation* **2013**, *20*, 138–148. [CrossRef] [PubMed]

19. Gao, S.; Kaudimba, K.K.; Guo, S.; Zhang, S.; Liu, T.; Chen, P.; Wang, R. Transient Receptor Potential Ankyrin Type-1 Channels as a Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 836. [CrossRef]
20. Wang, Z.; Ye, D.; Ye, J.; Wang, M.; Liu, J.; Jiang, H.; Xu, Y.; Zhang, J.; Chen, J.; Wan, J. The TRPA1 Channel in the Cardiovascular System: Promising Features and Challenges. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1253. [CrossRef]
21. Lu, Y.; Piplani, H.; McAllister, S.L.; Hurt, C.M.; Gross, E.R. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Activation within the Cardiac Myocyte Limits Ischemia-reperfusion Injury in Rodents. *Anesthesiology* **2016**, *125*, 1171–1180. [CrossRef]
22. Petitjean, H.; Héberlé, E.; Hilfiger, L.; Łapies, O.; Rodrigue, G.; Charlet, A. TRP channels and monoterpenes: Past and current leads on analgesic properties. *Front. Mol. Neurosci.* **2022**, *15*, 945450. [CrossRef]
23. Mihara, S.; Shibamoto, T. The role of flavor and fragrance chemicals in TRPA1 (transient receptor potential cation channel, member A1) activity associated with allergies. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2015**, *11*, 11. [CrossRef]
24. Đukanović, Đ.; Gajić, M.; Škrbić, R. Time-dependent and force-dependent vasoreactivity of isolated human umbilical arteries. *Scr. Med.* **2020**, *51*, 134–140. [CrossRef]
25. Gajić Bojić, M.; Đukanović, Đ.; Marinković, S.; Jovičić, S.; Stojiljković, M.P.; Djuric, D.M.; Škrbić, R. Methodological challenges in using human umbilical artery as a model for in vitro studies. *Exp. Physiol.* **2023**, *108*, 1569–1578. [CrossRef] [PubMed]
26. Jin, L.; Xie, Z.; Lorkiewicz, P.; Srivastava, S.; Bhatnagar, A.; Conklin, D.J. Endothelial-dependent relaxation of α -pinene and two metabolites, myrtenol and verbenol, in isolated murine blood vessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2023**, *325*, 1446–1460. [CrossRef]
27. Bang, S.; Yoo, S.; Yang, T.J.; Cho, H.; Hwang, S.W. Isopentenyl pyrophosphate is a novel antinociceptive substance that inhibits TRPV3 and TRPA1 ion channels. *Pain* **2011**, *152*, 1156–1164. [CrossRef]
28. MarvinSketch 5.5.1.0; ChemAxon: Budapest, Hungary, 2011. Available online: <https://www.chemaxon.com> (accessed on 20 January 2024).
29. ChemBio3D Ultra 7.0.0; CambridgeSoft Corporation: Cambridge, MA, USA, 2001. Available online: <http://www.cambridgesoft.com> (accessed on 24 January 2024).
30. Pentacle 1.0.7; Molecular Discovery Ltd.: Perugia, Italy, 2015. Available online: <http://www.moldiscovery.com> (accessed on 6 February 2024).
31. Pastor, M.; Cruciani, G.; McLay, I.; Pickett, S.; Clementi, S. GRIND-INdependent descriptors (GRIND): A novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3233–3243. [CrossRef] [PubMed]
32. Gramatica, P. On the development and validation of QSAR models. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *930*, 499–526. [CrossRef]
33. Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inform.* **2010**, *29*, 476–488. [CrossRef]
34. Pratim, R.P.; Paul, S.; Mitra, I.; Roy, K. On two novel parameters for validation of predictive QSAR models. *Molecules* **2009**, *14*, 1660–1701. [CrossRef]
35. Roy, K.; Kar, S.; Ambure, P. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *145*, 22–29. [CrossRef]
36. ADM. ET Predictor (TM) Version 11.0, 64-bit Edition (Cloud Access); Simulations Plus Inc.: West Lancaster, CA, USA, 2023. Available online: <https://www.simulations-plus.com/software/admetpredictor/> (accessed on 4 March 2024).
37. Protein Data Bank. Available online: <http://www.rcsb.org/> (accessed on 16 January 2024).
38. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [CrossRef] [PubMed]
39. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [CrossRef] [PubMed]
40. Discovery Studio Visualizer 4.1.0.14169; Accelrys Inc.: San Diego, CA, USA, 2014. Available online: <http://accelrys.com> (accessed on 14 March 2024).
41. Taha, M.O.; Habash, M.; Al-Hadidi, Z.; Al-Bakri, A.; Younis, K.; Sisan, S. Docking-based comparative intermolecular contacts analysis as new 3-D QSAR concept for validating docking studies and in silico screening: NMT and GP inhibitors as case studies. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 647–669. [CrossRef] [PubMed]
42. Krieger, E.; Dunbrack, R.L., Jr.; Hooft, R.W.; Krieger, B. Assignment of protonation states in proteins and ligands: Combining pKa prediction with hydrogen bonding network optimization. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *819*, 405–421. [CrossRef] [PubMed]
43. Lorente, I.; Ocete, M.A.; Zarzuelo, A.; Cabo, M.M.; Jimenez, J. Bioactivity of the essential oil of Bupleurum fruticosum. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 267–272. [CrossRef] [PubMed]
44. Pereira-Gonçalves, Á.; Ferreira-da-Silva, F.W.; de Holanda-Angelin-Alves, C.M.; Cardoso-Teixeira, A.C.; Coelho-de-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. 1,8-Cineole blocks voltage-gated L-type calcium channels in tracheal smooth muscle. *Pflug. Arch.* **2018**, *470*, 1803–1813. [CrossRef] [PubMed]
45. Evaristo Rodrigues da Silva, R.; de Alencar, S.A.; Pereira-de-Morais, L.; de Sousa Almeida, N.; Iriti, M.; Kerntopf, M.R.; Menezes, I.R.A.; Coutinho, H.D.M.; Barbosa, R. Relaxant Effect of Monoterpene (-)-Carveol on Isolated Human Umbilical Cord Arteries and the Involvement of Ion Channels. *Molecules* **2020**, *25*, 2681. [CrossRef] [PubMed]
46. Testai, L.; Chericoni, S.; Martelli, A.; Flamini, G.; Breschi, M.C.; Calderone, V. Voltage-operated potassium (Kv) channels contribute to endothelium-dependent vasorelaxation of carvacrol on rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* **2016**, *68*, 1177–1183. [CrossRef]

47. Bautista, D.M.; Movahed, P.; Hinman, A.; Axelsson, H.E.; Sterner, O.; Högestätt, E.D.; Julius, D.; Jordt, S.E.; Zygmunt, P.M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12248–12252. [[CrossRef](#)]
48. Jin, L.; Jagatheesan, G.; Guo, L.; Nystoriak, M.; Malovichko, M.; Lorkiewicz, P.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S.; Conklin, D.J. Formaldehyde Induces Mesenteric Artery Relaxation via a Sensitive Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRPA1) and Endothelium-Dependent Mechanism: Potential Role in Postprandial Hyperemia. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Sun, C.; Zhang, L.; Zhang, M.; Wang, J.; Rong, S.; Lu, W.; Dong, H. Zinc pyrithione induces endothelium-dependent hyperpolarization-mediated mesenteric vasorelaxation in healthy and colitic mice. *Biochem. Pharmacol.* **2023**, *217*, 115828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Jin, L.; Lorkiewicz, P.; Xie, Z.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S.; Conklin, D.J. Acrolein but not its metabolite, 3-Hydroxypropylmercapturic acid (3HPMA), activates vascular transient receptor potential Ankyrin-1 (TRPA1): Physiological to toxicological implications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2021**, *426*, 115647. [[CrossRef](#)]
51. Aubdool, A.A.; Kodji, X.; Abdul-Kader, N.; Heads, R.; Fernandes, E.S.; Bevan, S.; Brain, S.D. TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilation: Involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 2419–2433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Earley, S.; Gonzales, A.L.; Crnich, R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca^{2+} -Activated K^{+} channels. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 987–994. [[CrossRef](#)]
53. Bamps, D.; Blockeel, A.J.; Dreesen, E.; Marynissen, H.; Laenen, J.; Van Hecken, A.; Wilke, A.; Shahabi, S.; Johnson, K.W.; Collins, E.C.; et al. TRPA1 Antagonist LY3526318 Inhibits the Cinnamaldehyde-Evoked Dermal Blood Flow Increase: Translational Proof of Pharmacology. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2023**, *114*, 1093–1103. [[CrossRef](#)]
54. Pozsgai, G.; Bodkin, J.V.; Graepel, R.; Bevan, S.; Andersson, D.A.; Brain, S.D. Evidence for the pathophysiological relevance of TRPA1 receptors in the cardiovascular system in vivo. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *87*, 760–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Mihai, D.P.; Nitulescu, G.M.; Ion, G.N.D.; Ciotu, C.I.; Chirita, C.; Negres, S. Computational Drug Repurposing Algorithm Targeting TRPA1 Calcium Channel as a Potential Therapeutic Solution for Multiple Sclerosis. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 446. [[CrossRef](#)]
56. Prampolini, G.; Campetella, M.; Ferretti, A. Solvent effects on catechol's binding affinity: Investigating the role of the intramolecular hydrogen bond through a multi-level computational approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, *18*, 2523–2536. [[CrossRef](#)]
57. Callear, S.K.; Johnston, A.; McLain, S.E.; Imberti, S. Conformation and interactions of dopamine hydrochloride in solution. *J. Chem. Phys.* **2015**, *142*, 014502. [[CrossRef](#)]
58. Niu, C.; Sun, X.; Hu, F.; Tang, X.; Wang, K. Molecular determinants for the chemical activation of the warmth-sensitive TRPV3 channel by the natural monoterpenoid carvacrol. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Paulsen, C.E.; Armache, J.P.; Gao, Y.; Cheng, Y.; Julius, D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **2015**, *525*, 552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Liu, C.; Reese, R.; Vu, S.; Rougé, L.; Shields, S.D.; Kakiuchi-Kiyota, S.; Chen, H.; Johnson, K.; Shi, Y.P.; Chernov-Rogan, T.; et al. A Non-covalent Ligand Reveals Biased Agonism of the TRPA1 Ion Channel. *Neuron* **2021**, *109*, 273–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Arnittali, M.; Rissanou, A.N.; Harmandaris, V. Structure of biomolecules through molecular dynamics simulations. *Procedia Comput. Sci.* **2019**, *156*, 69–78. [[CrossRef](#)]
62. Mukaiyama, M.; Usui, T.; Nagumo, Y. Non-electrophilic TRPA1 agonists, menthol, carvacrol and clotrimazole, open epithelial tight junctions via TRPA1 activation. *J. Biochem.* **2020**, *168*, 407–415. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.