



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Др Јелена С. Ристић

**УТИЦАЈ ХРОНИЧНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА  
ИНХИБИТОРИМА ФОСФОДИЕСТЕРАЗЕ 1 САМОСТАЛНО  
И У КОМБИНАЦИЈИ СА ФИЗИЧКОМ АКТИВНОШЋУ НА  
ФУНКЦИОНАЛНИ ОПОРАВАК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА  
ПАЦОВА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2020.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Jelena S. Ristić, MD

**THE INFLUENCE OF CHRONIC PRE-CONDITIONING OF  
PHOSPHODIESTERASE 1 INHIBITORS ALONE AND IN  
COMBINATION WITH PHYSICAL ACTIVITY ON THE  
FUNCTIONAL RECOVERY OF THE ISOLATED HEART OF  
RATS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2020.

<b>I Аутор</b>	
Име и презиме: Јелена С. Ристић	
Датум и место рођења: 02.10.1975 Скопље, Северна Македонија	
Садашње запослење: Директор представништва Richter Gedeon Nyrt	
<b>II Докторска дисертација</b>	
Наслов: Утицај хроничног прекондиционирања инхибиторима фосфодиестеразе 1 самостално и у комбинацији са физичком активношћу на функционални опоравак изолованог срца пацова	
Број страница: 156	
Број слика: 67 Графикона, 14 табела, 22 слике	
Број библиографских података: 218	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
Научна област (УДК): медицина	
Ментор: др сци. мед. Марко Фолић. Редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу	
<b>III Оцена и одбрана</b>	
Датум пријаве теме:	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-538/4 од 28.06.2017.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф.др Душан Ђурић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, председник</li><li>2. Проф. др Славољуб Јовић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан</li><li>3. Доц. др Владимир Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан</li></ol>	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
Датум одбране дисертације:	

<b>I Autor</b>	
Ime i prezime: Jelena S. Ristić	
Datum i mesto rođenja: 02.10.1975. Skoplje, Severna Makedonija	
Sadašnje zaposlenje: Direktor predstavništva Richter Gedeon Nyrt	
<b>II Doktorska disertacija</b>	
Naslov: Uticaj hroničnog prekondicioniranja inhibitorima fosfodiesteraze 1 samostalno i u kombinaciji sa fizičkom aktivnošću na funkcionalni oporavak izolovanog srca pacova	
Broj stranica: 156	
Broj slika: 67 grafikona, 14 tabela, 22 slike	
Broj bibliografskih podataka: 218	
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu.	
Naučna oblast (UDK): Medicina	
Mentor: dr sci. med. Marko Folić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu	
<b>III Ocena i odbrana</b>	
Datum prijave teme:	
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-538/4 од 28.06.2017.	
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Prof. dr Dušam Đurić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Klinička farmacija, predsednik</li><li>2. Prof. dr Slavoljub Jović, vandredni profesor Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Fiziologija, član</li><li>3. Doc. Dr Vladimir Živković, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član</li></ol>	
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:	
Datum odbrane disertacije:	

<b>I Author</b>	
Name and surname:	Jelena S. Ristić
Date and place of birth:	02.10.1975. Skoplje, North Macedonia
Current employment:	Director of Representative Office Richter Gedeon Nyrt
<b>II Doctoral dissertation</b>	
Title:	The influence of chronic pre-conditioning of phosphodiesterase 1 inhibitors alone and in combination with physical activity on functional recovery of an isolated heart of rats
No. of pages:	156
No. of images:	67 Graphics, 14 Tables, 22 Pictures
No. of bibliographic data:	218
Institution and place of work:	Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK):	medicine
Mentor:	dr. sc. Marko Folić, full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>III Grade and Dissertation Defense</b>	
Topic Application Date:	
Decision number and date of accep of doctoral/artistic dissertation topic:	IV-03-538/4 from 28.06.2017.
Comission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dr.sc. Dušan Đurić, associate professor, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, speciality Clinical pharmacy, president</li> <li>2. Dr.sc. Slavoljub Jović, associate professor, Faculty of Veterinary Medicine speciality Physiology and Biochemistry, member</li> <li>3. Dr.sc. Vladimir Zivkovic, assistant professor, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, speciality of Physiology, member</li> </ol>
Comission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:	
Date of Dissertation Defense:	

**Увод:** Редовна физичка активност умереног интензитета се сматра неопходном здравственом мером као основном нефармаколошкој терапији кардиоваскуларних болести. Циљ ове студије је био да процени ефекте PDEIs на кардиодинамске параметре и системски редокс статус, након фармаколошког и физичког прекондиционирања миокарда

**Материјал и методе:** Студија је спроведена на 96 мужјака *Wistar albino* пацова, подељених у следеће групе са и без физичког тренинга (12 по групи): седентарна контрола, Никардипин (6 mg/kg/дан), Винпоцетин (10 mg/kg/дан), Нимодипин (10 mg/kg/дан), тренинг умереног интензитета контролна група (MIT), Никардипин (MIT + 6 mg/kg/дан лека), Винпоцетин (MIT + 10 mg/kg/дан лека), Нимодипин (MIT + 10 mg/kg/дан лека). Од кардиодинамских параметара праћени су: dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, фреквенца срца и коронарни проток. У коронарном ефлуенту као и у хемолизату еритроцита животиња одређивани су параметри оксидационог стреса и антиоксидационе заштите: нитрити ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксидни анјонски радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), водоник-пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), индекс липидне пероксидације, супероксид дисмутаза, каталаза и редуковани глутатион.

**Резултати:** Прекондиционирање PDE1 инхибиторима и тренингом умереног интензитета повећавају параметре контрактилности срца, са доминантнијим повећањем dp/dt min и max као и СПЛК након примене винпоцетина и нимодипина и смањује ослобађање про-оксиданаса.

**Закључак:** Физички тренинг умереног интензитета довољног трајања самостално или у комбинацији са PDE1 инхибиторима доводи до развијања позитивних протективних адаптивних механизма који се манифестују смањењем оксидационог стреса и побољшањем хемодинамских параметара, а тиме и укупне способности организма.

**Кључне речи:** инхибитори фосфодиестеразе, тренинг умереног интензитета, редокс статус, кардиодинамски параметри, коронарни проток

## Abstract

**Introduction:** Regular physical activity of moderate intensity is considered a necessary health measure as a basis for non-pharmacological therapy of cardiovascular diseases. The aim of this study was to evaluate the effects of PDEIs on cardiodynamic parameters and systemic redox status, after pharmacological and physical myocardial preconditioning

**Material and methods:** The study was performed on 96 male Wistar albino rats, divided into the following groups with and without physical training (12 per group): sedentary control, Nicardipine (6 mg/kg/day), Vinpocetine (10 mg/kg/day), Nimodipine (10 mg/kg/day), moderate intensity training control group (MIT), Nicardipine (MIT + 6 mg/kg/day), Vinpocetine (MIT + 10 mg/kg/day), Nimodipine (MIT) + 10 mg/kg/day). The following parameters were monitored: dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF and parameters of oxidative stress and antioxidant protection: nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), lipid peroxidation index (suzaroxide dismuta), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH).

**Results:** Preconditioning with PDE1 inhibitors and moderate-intensity training increase cardiac contractility parameters, with a more dominant increase in dp/dt min and max as well as SLVP after administration of vinpocetine and nimodipine, and decrease pro-oxidant release.

**Conclusion:** Physical training of moderate intensity of sufficient duration alone or in combination with PDE1 inhibitors leads to the development of positive protective adaptive mechanisms which are manifested by reduction of oxidative stress and improvement of hemodynamic parameters, and thus the overall ability of the organism.

**Key words:** phosphodiesterase inhibitors, moderate intensity training, redox status, cardiodynamic parameters, coronary flow

## Садржај

1.	УВОД.....	2
1.1.	Исхемијска болест срца .....	2
1.2.	Патофизиологија исхемије миокарда .....	2
1.3.	Оксидациони стрес и функција ендотела у патофизиологији исхемијске болести срца...5	
1.4.	Конвенционални и неконвенционални фактори ризика .....	7
1.5.	Физичка (не)активност и исхемијска болест срца.....	10
1.6.	Дијагностика и терапија исхемијске болести срца.....	12
1.7.	Исхемијско прекондиционирање миокарда .....	12
1.8.	Фармаколошко прекондиционирање миокарда.....	15
1.9.	Инхибитори фосфодиестераза.....	15
2.	ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
2.1.	Општи циљ .....	22
2.2.	Специфични циљеви .....	22
3.	МЕТОДОЛОГИЈА .....	24
3.1.	Материјал .....	24
3.2.	Етички аспекти истраживања.....	24
3.3.	Анимални модел физичког тренинга.....	24
3.4.	Анимални модел фармаколошког прекондиционирања.....	25
3.5.	Протокол истраживања .....	26
3.6.	Langendorff-ова перфузија .....	26
3.7.	Хируршка метода изоловања срца пацова .....	27
3.8.	Биохемијске методе.....	28
3.8.1.	Материјал за биохемијске анализе .....	28
3.8.2.	Параметри редокс статуса .....	28
3.8.2.1.	Супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ).....	28
3.8.2.2.	Индекс липидне пероксидације (TBARS).....	29
3.8.2.3.	Водоник-пероксид ( $H_2O_2$ ).....	29
3.8.2.4.	Одређивање нитрита ( $NO_2^-$ ) .....	30
3.8.2.5.	Одређивање активности ензима каталазе .....	30
3.8.2.6.	Одређивање концентрације редукованог глутатиона .....	31
3.8.2.7.	Одређивање активности ензима супероксид дисмутазе.....	31
3.9.	Хистолошка анализа ткива срца и скелетног мишића .....	32
3.10.	Статистичка анализа података .....	32
4.	РЕЗУЛТАТИ .....	34
4.1.	Кардиодинамски параметри .....	34
4.1.1.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на максималну стопу раста притиска у левој комори изолованог срца пацова.....	34
4.1.2.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања миокарда на минималну стопу раста притиска у левој комори изолованог срца пацова.....	39
4.1.3.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања миокарда на систолни притисак у левој комори изолованог срца пацова .....	44



4.1.4.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на дијастолни притисак у левој комори изолованог срца пацова .....	49
4.1.5.	Утицај прекондиционирања тренингом и фармаколошког прекондиционирања на срчану фреквенцу изолованог срца пацова .....	54
4.1.6.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на коронарни проток и коронарну циркулацију изолованог срца пацова .....	59
4.2.	Поређење ефеката прекондиционирања миокарда инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове на кардиодинамске параметре.....	64
4.3.	Поређење ефеката прекондиционирања миокарда инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у комбинацији са физичким тренингом у односу на контролне услове на кардиодинамске параметре.....	70
4.4.	Маркери оксидационог стреса у коронарном перфузату .....	76
4.4.1.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на концентрацију супероксид анјон радикала у коронарном перфузату изолованог срца пацова .....	76
4.4.2.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на концентрацију водоник-пероксида у коронарном перфузату изолованог срца пацова.....	81
4.4.3.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на концентрацију азот-монооксида у коронарном перфузату изолованог срца пацова.....	86
4.4.4.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на концентрацију индекса липидне пероксидације у коронарном перфузату изолованог срца пацова .....	90
4.4.5.	Поређење ефеката прекондиционирања миокарда инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове на маркере оксидационог стреса у ефлуенту .....	96
4.4.6.	Поређење ефеката прекондиционирања миокарда инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у комбинацији са физичким тренингом у односу на контролне услове на маркере оксидационог стреса у ефлуенту.....	100
4.5.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и различитим инхибиторима фосфодиестеразе (PDE1) на вредности маркера оксидационог стреса у крви пацова ..	104
4.6.	Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и различитим инхибиторима фосфодиестеразе (PDE1) на вредности одабраних параметара система антиоксидационе заштите.....	109
4.7.	Морфометријске промене мишићног ткива срца и скелетног мишића.....	113
4.7.1.	Хистолошка анализа ткива леве коморе срца пацова.....	113
4.7.2.	Хистолошка анализа ткива <i>musc. quadriceps</i> -а.....	119
5.	ДИСКУСИЈА.....	124
6.	ЗАКЉУЧЦИ .....	135
7.	ЛИТЕРАТУРА .....	137

# УВОД

## 1. УВОД

### 1.1. Ишемијска болест срца

Кардиоваскуларне болести (КВБ) или срчане болести представљају хетерогену групу обољења (1). Болести кардиоваскуларног система су препознате као један од водећих узрока смрти на глобалном нивоу, са годишњом стопом умирања од преко 17 милиона становника. Морталитет услед кардиоваскуларних болести је уско повезан са променом профила кардиоваскуларних фактора ризика током времена и у зависности од географске локације. Док је током последњих деценија уочен образац смањења морталитета од кардиоваскуларних болести у земљама са високим приходима, у земљама са ниским и средњим дохотком је насупрот томе концентрисано три четвртине укупних случајева превременог морталитета због кардиоваскуларних болести. Са развојем економије и привреде, логично је да опада и учесталост обољевања од КВБ, па је тако стопа морбидитета и морталитета и даље највиша у неразвијеним земљама (2). Већ деценијама уназад, инциденца обољевања од срчаних болести расте, па је тако на почетку двадесетог века од кардиоваскуларних поремећаја оболевао тек сваки десети становник, да би се са почетком 21. века овај број знатно повећао. Управо се то раздобље назива епидемиолошком транзицијом јер је дошло до повећања инциденце за 30%. Велики терет кардиоваскуларних болести у земљама у развоју се може приписати порасту инциденце атеросклеротичних болести (услед урбанизације, веће заступљености фактора ризика, попут гојазности, дијабетес мелитуса, дислипидемије, хипертензије итд.) и њиховој ранијој манифестацији, као и порасту популације и високом уделу особа млађе одрасле и средње животне доби у популацији ових земаља. У погледу обољевања и умирања у зависности од типа кардиоваскуларних поремећаја, највећу учесталост имају исхемијске болести срца, након којих следе цереброваскуларне болести (3). Ишемијска болест срца (ИБС) резултат је смањене перфузије миокарда која изазива ангину пекторис (АП), инфаркт миокарда (ИМ) или срчани застој и најчешћа је болест ове велике групе. Ишемијска болест срца чини једну трећину до половину случајева кардиоваскуларних болести, па због тога представља значајан здравствени и социо-економски проблем (4).

Ишемијска болест срца је најчешћи узрок морбидитета и морталитета и жена и мушкараца од 40 до 60 година старости, и још увек представља највећи терапијски изазов у стручним круговима (5). Процењује се да ће до краја 2020. године ова болест постати најчешћи медицински и социјални проблем (6). Пораст морталитета услед исхемијске болести срца предвиђен за период између 1990. и 2020. Године у земљама у развоју износи 120% за жене и 137% за мушкарце, што је значајно више од процената очекиваних у развијеним земљама (29% за жене и 48% за мушкарце). Ове пројекције су углавном засноване на предвиђеним демографским променама, али не и на потенцијалном уделу фактора ризика, што указује да пораст може бити и већи од очекиваног (7). Ишемијска болест срца је мултифакторијални ентитет који настаје услед интеракције између фактора спољашње средине, предиспозиције и експресије гена за одређени поремећај (8). Последњих година научници све више напора улажу у расветљавање механизма којим настају исхемијско-реперфузионе повреде које су одговорне за акутну срчану дисфункцију и смрт миоцита, као и за касније хроничне компензационе промене у срчаној морфологији које доводе до инсуфицијенције и смрти (9).

### 1.2. Патофизиологија исхемије миокарда







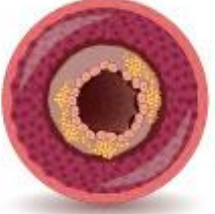
У физиолошким условима, снабдевање миокарда кисеоником је адекватно без обзира на потребе. Коронарни проток је променљива карактеристика кардиоваскуларног система који се нагло повећава када миокард захтева додатне количине кисеоника.

Максималне потребе миокарда за кисеоником зависе од брзине срчаног рада, контракција срчаног мишића и отпора у крвним судовима миокарда. Проток кроз коронарне крвне судове одвија током фазе дијастоле миокарда и релаксације и искључиво зависи од притисака у коронарним ушћима и десној преткомори, унутар самог миокарда и притиска у коронарним крвним судовима. Највећи удео коронарног протока одвија се у великим епикардним артеријама, преартериоларним крвним судовима и артериолама и капиларима миокарда. Управо се у наведеним крвним судовима налазе и разлози за потенцијално смањење коронарног протока због спазма или атеросклерозе (10). Коронарни проток се прилагођава свакој физиолошкој промени крвног притиска да би се задовољиле потребе миокарда за кисеоником и тај феномен се назива ауторегулација (11).

У самој патофизиолошкој основи коронарне болести, тачније исхемијске болести срца налази се атеросклероза као патолошки поремећај на нивоу крвних судова која онемогућава адекватну перфузију миокарда уз садејство различитих биомаркера (12,13).

Атеросклероза је основни и најчешћи узрок коронарне исхемијске болести и представља хроничну имуноинфламаторну фибропролиферативну болест великих (субепикардијалних) артерија на одређеним предилекционим сегментима васкуларног стабла. Атеросклероза је хронично стање током кога долази до оштећења артерија услед нагомилавања плакова, односно атеросклеротских лезија. Атеросклеротске лезије у свом саставу имају компоненту која се углавном састоји од глатких мишићних ћелија и макрофага, матрикса везивног ткива и ванћелијског и унутарћелијског липидног ткива које макрофаге претвара у пенасте ћелије (14). Атеросклеротске лезије настају након неког инфламаторног стимулуса са последичним лучењем цитокина, синтезом ткивног матрикса, пролиферацијом глатких мишићних ћелија и колекцијом макрофага и липида (Слика 1) (15). У основи поремећаја је ендотелна дисфункција, која се одликује неспособношћу ендотела да синтетише азот-моноксид и простациклине који инхибирају настанак тромба и агрегацију тромбоцита.

Познавање етиологије и патофизиологије атеросклеротске болести је од кључног значаја за познавање узрока и механизма исхемијске болести срца (16,17). Упркос бројним сазнањима и истраживањима, још увек није сасвим разјашњена етиопатогенеза атеросклеротске болести и последичне исхемијске болести срца и још увек је актуелна тема у научним круговима (18).

			
<b>Плак</b> LDL oxLDL CRP, Fbg IL-6 IL-10, IL-18 TNF alfa	<b>Нестабилни плак</b> MMP-9 MPO ICAM VCAM	<b>Руптура плака</b> sCD40L PIGF PAPP-a VCAM	<b>Тромбоза</b> PAI-1 sCD40L VwF D-Dimer
			
<b>Ишемија</b> IMA FFA Holin BNP IL-6/TF	<b>Некроза</b> cTNT cTNI СК-МВ Myg	<b>ЛК ремоделовање</b> BNP NT-ProBNP MMP	

**Слика 1. Ишемијска каскада миокарда са елевацијом биомаркара у зависности од фазе болести**

**LDL** (енгл. *low density lipoprotein*) липопротеин ниске густине; **oxLDL** (енгл. *oxidized low density lipoprotein*) оксидовани липопротеин ниске густине; **CRP** (енгл. *C-reactive protein*) С-реактивни протеин; **Fbg** (енгл. *fibrinogen*), фибриноген; **IL-6** (енгл. *interleukin-6*) интерлеукин-6; **IL-10** (енгл. *interleukin-10*) интерлеукин-10; **IL-18** (енгл. *interleukin-18*) интерлеукин-18; **TNF alfa** (енгл. *Tumor Necrosis Factor alfa*) фактор некрозе тумора алфа; **MMP-9** (енгл. *matrix metalloproteinase-9*) матрикс металопротеиназа-9; **MPO** (енгл. *myeloperoxidase*) мијелопероксидаза; **ICAM-1** (енгл. *intracellular adhesion molecule-1*) интрацелуларни адхезиони молекул; **VCAM-1** (енгл. *vascular cell adhesion molecule-1*) васкуларни ћелијски адхезиони молекул; **sCD40L** (енгл. *soluble CD40 ligand*) солубилни CD40 лиганд; **PIGF** (енгл. *placental growth factor*) плацентални фактор раста; **PAPP-a** (енгл. *pregnancy associated plasma protein*) плазма протеин А повезан са трудноћом; **PAI-1** (енгл. *plasminogen activator inhibitor-1*) инхибитор активатора плазминогена; **VwF** (енгл. *von Willebrand factor*) von Willebrand-ов фактор; **D-Dimer** (енгл. *D-dimer*) Д-димер; **IMA** (енгл. *ischemia-modified albumin*) албумин модификован ишемијом; **FFA** (енгл. *unbound free fatty acid*) слободне масне киселине; **choline** (енгл. *choline*) холин; **ANP** (енгл. *atrial natriuretic peptide*) атријални натриуретски пептид; **TNT** (енгл. *troponin T*) Тропонин Т; **TNI** (енгл. *troponin I*) тропонин I; **СК-МВ** (енгл. *creatine kinase MB-fraction*) креатин киназа-МВ; **Myg** (енгл. *myoglobin*) миоглобин; **BNP** (енгл. *brain natriuretic peptide*) мождани натриуретски пептид; **NT-ProBNP** (енгл. *natriuretic pro-brain natriuretic peptide*) N-терминални В-тип натриуретски пептид, **MMP** (енгл. *matrix metalloproteinase*) матрикс металопротеиназа.

Услед сужења крвног суда атеросклеротском променом, коронарни проток је снижен врло често и до минималног протока крви тако да ткиво миокарда не добија довољну количину кисеоника.

Сваки клинички облик исхемијске болести срца има патофизиолошки механизам из ког проистиче клиничка слика. У основи сваке исхемичне промене синергистички делују два или више фактора на једном локалитету која се одликује сиромашнијом или богатијом симптоматологијом. Врло опасан феномен у исхемијским болестима узроковане атеросклеротским променама на већим крвни судовима јесте емболија, односно руптура атерома. Исхемија настаје и услед потпуне оклузије крвног суда када настаје инфаркт тог органа, а то исто стање може изазвати и вазоспазам крвног суда какав је случај код Принцметалове ангине (19).

Исхемијска болест срца у ретким случајевима није узрокована коронарном атеросклерозом и може настати као последица конгениталних малформација коронарних артерија, васкулитиса, сифилиса, емболуса код инфективног ендокардитиса и сл.

### 1.3. Оксидациони стрес и функција ендотела у патофизиологији исхемијске болести срца

Оксидациони стрес се, у ширем смислу, дефинише као нарушена равнотежа између прооксиданаса и антиоксиданаса, која води до потенцијалног оштећења ћелијских структура. Концепт равнотеже између про и антиоксиданаса је од кључне важности за разумевање оксидационог стреса из више разлога. Најпре, наглашава да до поремећаја може доћи на обе стране – у виду абнормалне продукције кисеоничних радикала, али и у виду неадекватне одбране антиоксидационог система. Такође, пружа увид у постојање хомеостатских концентрација, и тиме физиолошке улоге, кисеоничних радикала (20). Супероксидни радикал, водоник-пероксид, хидроксилни радикали и синглет кисеоник ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $O_2$ ) се убрајају у реактивне кисеоничне врсте (енгл. *reactive oxygen species*, ROS, у даљем тексту РОС) које настају као метаболички производи у биолошким системима (21). РОС се углавном стварају у митохондријама у физиолошким условима. Супероксидни анјон настаје у процесима ћелијског дисања и метаболизма арахидонске киселине, али до његовог стварања долази и у ендотелним и запаљенским ћелијама (22). Када дође до повећаног стварања РОС, они због своје високе реактивности и неспецифичне природе, почињу да испољавају штетне ефекте на скоро све важне ћелијске структуре (протеини и липиди) (23).

У азотне реактивне врсте (РНС) се најпре убрајају азот-моноксид ( $NO^\cdot$ ), и пероксинитрил ( $ONOO^\cdot$ ). Хронична продукција пероксинитрила узрокује оксидацију ДНК и ћелијских липида, има директан утицај на дилататорна својства артерија и води до развоја ендотелне дисфункције (24).

Током претходне две декаде генерисан је значајан број података који подржавају концепт да продужена изложеност факторима ризика попут дислипидемије, пушења и дијабетес мелитуса, која води ка стварању реактивних кисеоничних и азотних врста, представља значајан стимулус за оштећење ДНК у ћелијама унутар атеросклеротског плака. Нестабилност генома на нивоу ћелије може директно да утиче на васкуларну функцију, водећи до застоја ћелијског циклуса, апоптозе и преурањеног васкуларног старења (25). До данас постоје чврсти докази да оштећење ДНК има кључну улогу у механизмима атеросклеротског процеса. У циркулишућим ћелијама пацијената који имају атеросклерозу уочени су прекиди ДНК ланаца и оштећења на нивоу хромозома, а степен ових промена корелира са тежином болести. Оштећење ДНК у атеросклеротском плаку се јавља у дијапазону од „макро“ оштећења, укључујући делеције или додавања читавих хромозома или делова хромозома, до „микро“ оштећења попут губитка хетерозиготности и микросателитских нестабилности (мутације ДНК које могу утицати на генску експресију) (26). До грешака на нивоу ДНК може доћи приликом директне

интеракције са РОС, када се ствара велики број оштећења на базним паровима и шећерним групама ДНК (27). Међу припадницима РОС, супероксидни анјон и водоник-пероксид не показују реактивност према ДНК молекулу. Оба ова једињења се Фентоновом реакцијом конвертују у високо реактивни хидроксилни радикал. Оксидационо оштећење изазвано деловањем хидроксилног радикала доводи до вишеструких мутација ДНК, укључујући једноланчане и дволанчане прекиде ДНК и модификацију база попут тимин гликола и 8-хидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) (28). Од свих штетних продуката оксидације ДНК, 8-OHdG је најспецифичнији пример последице модификација азотних база, будући да доводи до значајних мутагених лезија (29). Липидном пероксидацијом под дејством РОС настаје велики број продуката (нпр. епоксиди, алдехиди итд.), који су такође реактивне природе и склони интераговању са ДНК. Један од примера јесте малондиалдехид, који делује мутагено интерагујући са аденином, цитозином и гуанином (30).

Активација имунских ћелија, запаљење, исхемија и старење су само неки од фактора одговорних за ендегену продукцију слободних радикала (31). Све већи број доказа указује на то да оксидациони стрес може бити одговоран за настанак и/или прогресију различитих обољења, у које се убрајају и кардиоваскуларне болести, што не чуди ако се има на уму да су сви горе наведени фактори уједно и битни учесници у процесу атеросклерозе и развоју ИБС (32).

Оксидациони стрес је један од главних окидача процеса атеросклерозе. Добро је познато да је формирање атероматозног плака последица ране инфламације на нивоу ендотела, која заузврат води стварању РОС у макрофагама регрутованим на месту запаљења (33). Ова инфламација је последица оштећења ендотела, које може настати под дејством различитих фактора, као што су повишен крвни притисак, изложеност токсинима (ксенобиотици из дуванског дима) и повишен ниво физиолошких метаболита (попут глукозе, хомоцистеина или холестерола). Иако се висок ниво холестерола у плазми сматра окидачем атеросклеротског процеса, уочено је да је заправо оксидација липопротеинских честица ниске густине (енгл. *low density lipoprotein*, LDL) које садрже највећи удео холестерола у циркулацији неизоставан корак у овом процесу (34,35).

Циркулишући, интактни LDL бива преузет у субендотелни простор, где ће бити оксидован од стране реактивних кисеоничних врста, након чега га макрофаге преузимају у виду oxLDL, што води стварању пенастих ћелија и акумулације липида у зиду крвног суда (36). Процес се одржава на тај начин што oxLDL и оксидовани Lp(a) стимулишу стварање супероксидног анјона, који даље узрокује апоптозе ћелија зидова крвних судова (37). Постоје подаци који сугеришу да повећано стварање супероксидног анјона лежи у основи нарушене способности релаксације зидова крвних судова посредоване ендотелном дисфункцијом. Ендотелна дисфункција је један од кључних чинилаца атерогенезе и карактерише се ограниченом биорасположивошћу азот-моноксида (38). Супероксидни анјон врши оксидативну инактивацију азот-моноксида, тиме ометајући његову вазодилаторну функцију (39). Додатно, овај оксидациони процес резултује формирањем пероксинитритног радикала, за који је показано да иницира липидну пероксидацију и игра битну улогу у процесу оксидације липопротеина (40). Истовремено, чак и ниски нивои oxLDL стимулишу синтезу екстрацелуларног матрикса, што је један од корака у формирању атеросклеротског плака. Оксидовани облик LDL-а делује хемотактички на циркулишуће макрофаге и глатке мишићне ћелије, олакшавајући адхезију моноцита за ендотел и њихову акумулацију у субендотелном простору, и тиме одржава зачарани круг оксидационих процеса (41).

Антиоксиданс се дефинише као било која агенс који када је заступљен у ниској концентрацији, у значајној мери одлаже или превенира оксидацију тог супстрата (42). Када се РОС и РНС генеришу у *in vivo* условима, њиховом дејству се супротставља добро координисан интринзични антиоксидациони одбрамбени систем (43). Овај систем се састоји из ензимских и неензимских компоненти које контролишу ниво РОС/РНС и

поправљају ћелијска оштећења настала оксидацијом. У ензимске компоненте, које чине прву линију одбране и врше директну неутрализацију РОС/РНС, убрајају се ензими: супероксидна дисмутаза (СОД), глутатион пероксидаза и каталаза (44). СОД катализује дисмутацију супероксидног анјона у водоник-пероксид, док САТ врши конверзију водоник-пероксида у воду и кисеоник, а GPx га уклања катализујући његову редукцију на рачун оксидације редуковане форме глутатиона до његове оксидоване форме (45). Другу линију одбране чине антиоксиданси „чистачи“ који инхибирају ланчану реакције оксидације (46). Када слободни радикал интерагује са другим молекулом долази до стварања секундарних радикала, који потом реагују са другим циљним молекулима што води даљој продукцији реактивних једињења. Класичан пример овакве ланчане реакције је липидна пероксидација, чија ће се пропација наставити све док се два радикала не искомбинују тако да формирају стабилан продукт или док не буде неутрализована од стране антиоксиданаса (47).

Ова група антиоксиданаса се дели на хидросолубилне и липосолубилне. Хидросолубилни антиоксиданси су дистрибуирани у цитоплазми, док липосолубилни могу са лакоћом да пролазе кроз ћелијске мембране и мембране митохондрија, акумулирајући се у њима, што је значајно са аспекта чињенице да су митохондрије значајно место стварања РОС укључених у патогенезу кардиоваскуларних болести. Антиоксиданси липидне фазе делују тако што „чисте“ ћелијске мембране и липопротеинске честице од слободних радикала, због чега су кључни у превенцији липидне пероксидације (48).

Витамин Е је најзначајнији липидни антиоксиданс који функционише на тај начин што брже ступа у реакцију са полинезасићеним масним киселинама од пероксил радикала и на тај начин блокира ланчану реакцију липидне пероксидације (49). Најпотентнији од изомера витамина Е, као и најзаступљенији код људи јесте алфа токоферол, који са пероксил радикалом формира релативно стабилан токофероксил радикал, који је потом подложен даљој стабилизацији или уклањању помоћу неког од других антиоксидационих механизма. Витамин Е има и способност да смањи холестеролом индуковану експресију mRNKCD36 рецептора, који је одговоран за преузимање oxLDL из крвотока у зид крвног суда, затим његово преузимање од стране макрофага и даље њихову трансформацију у тзв. пенасте ћелије, што је један од првих и најзначајнијих корака у процесу атеросклерозе (50,51). Каротеноиди, од којих најзначајнији бета каротен, такође функционишу као хватачи пероксил радикала, али и као прекурсори витамина А, који такође поседује антиоксидациона својства (52,53). Од хидросолубилних антиоксиданаса, најзначајнији инхибитор ланчане реакције је витамин С, односно аскорбинска киселина, који успешно уклања супероксидне анјоне, водоник-пероксид и хидроксилне анјоне (54). Аскорбинска киселина је неопходна и за регенерацију редукованог  $\alpha$ -токоферола и тиме обнављање његове антиоксидативне способности (55). Флавоноиди, захваљујући структури богатој хидроксилним групама, такође имају способност „чишћења“ слободних радикала, али и хелирања јона метала неопходних за катализу ланчаних оксидационих реакција (56). Епидемиолошке студије су показале обрнуту пропорционалност између ризика од коронарне болести срца и дијетарног уноса флавоноида (57,58).

Имајући на уму све описане улоге чинилаца оксидационог стреса, мерење нивоа липида и липопротеина у плазми и евалуација редокс статуса пацијената значајно може помоћи у процени ризика од обољевања, као и дефинисању профилаксе и терапије коронарне болести.

#### **1.4. Конвенционални и неконвенционални фактори ризика**

Познавање круцијалне улоге фактора ризика у развоју исхемијске болести срца је једна од најзначајнијих предности у разумевању обољења. Досадашња епидемиолошка



истраживања су издвојила пушење, дијабетес мелитус, хиперлипидемију и хипертензију као независне факторе ризика за ИБС. Показано је да лечење ових фактора ризика смањује ризик од будућих кардиоваскуларних догађаја. Због јачине доказа који подржавају њихову улогу у патогенези ИБС, ова 4 фактора се називају „конвенционалним“ факторима ризика (59). Конвенционални фактори ризика су кључни ентитети у развоју атеросклерозе.

Сматра се да преко 50% пацијената код којих се дијагностикује коронарна болест у својој анамнези имају наведене факторе ризика. Остатак пацијената који имају коронарну болест али ниједан од конвенционалних фактора ризика, вероватно имају неки од неконвенционалних фактора ризика који још увек нису довољно испитани у смислу њихових молекуларних механизма у патофизиологији коронарне болести (60). Повећана концентрација Lp(a) (61), хомоцистеина (62), повишен оксидациони стрес, низак ниво антиоксиданаса, седентеран и/или стресан начин живота су означени као додатни фактори ризика за настанак и развој коронарне артеријске болести (63,64).

Конзумирање цигарета, чак и мање од 10 на дан, је значајан променљив фактор ризика за многе кардиоваскуларне болести: периферне васкуларне болести, мождани удар и конгестивну срчану болест (65,66). Повећање оксидације LDL-а код особа које конзумирају цигарете промовише адхезију моноцита и померање у субинтиму (67). Стимулација ћелија интима оксидованим LDL-ом води до настанка атеросклерозе. Поред тога, дуван може изазвати инсулинску резистенцију која је фактор ризика за коронарну болест (68). Механизам којим дуван и пушење цигарета доводе до разних поремећаја је синергизам тромбозе, атеросклерозе, ендотелне дисфункције и хемодинамских ефеката.

Клиничке студије су доказале да је конзумирање алкохола повезано са повећаном стопом морталитета од кардиоваскуларних болести уколико је у питању конзумирање у већим количинама. Конзумирање алкохола представља и ризик за развој хипертензије, срчаног и можданог удара, хипертриглицеридемије и кардиомиопатије ако се конзумира више од три чаше пића дневно (69).

Дијабетес мелитус повећава шансу за развој коронарне болести 2-4 пута. Последњи подаци релевантних истраживања наводе и чињеницу да чак поремећена глукорегулација може повећати могућност настанка коронарне болести и утицати на прогресију атеросклерозе. Повишене вредности гликемије резултирају ендотелном дисфункцијом у дијабетичним крвним судовима што даље доводи до развоја кардиоваскуларног обољења (70). Кардиоваскуларне болести су главни узрок морталитета широм света код особа са дијабетес мелитусом тип 2, и чак и чак 65-80% ових пацијената умире због кардиоваскуларних компликација. Дијабетес мелитус тип 2 је око 20 пута чешћи од типа 1, а преваленца хипертензије код дијабетеса тип 2 је 70-80%. У основи ове повезаности се налази повишен оксидациони стрес и продукти липидне пероксидације као кључни медијатори у настанку ендотелне дисфункције и експресије инфламаторних гена.

Хипертензија код пацијената повећава ризик за настанак кардиоваскуларних догађаја и компликација (71). Хипертензија удвостручује ризик од развоја кардиоваскуларних болести и значајно убрзава развој атеросклерозе. Крвни притисак игра кључну улогу у процесу атеросклерозе. Дуготрајна хипертензија неминовно за последицу има нарушавање архитектуре целокупног циркулаторног система. На нивоу малих крвних судова (дијаметра једнаког или мањег од 250  $\mu\text{m}$ ) долази до смањења пречника лумена крвног суда и повећања дебљине *tunica media*, односно еутрофичког ремоделовања ка унутрушњости крвног суда. Ово значи да постоји сужење лумена крвног суда без хипертрофије и повећања броја глатких мишићних ћелија, већ као резултат реорганизације ових ћелија тако да формирају више слојева и тиме смање укупан пречник крвног суда. Описана промена је иницијални механизам адаптације, који временом попушта под порастом васкуларног отпора, након чега започиње хипертрофичко ремоделовање. На нивоу зида срца и крвних судова средње величине, као

хистопатолошка промена у одговору на повишен крвни притисак уочена је хипертрофија. Пре него што дође до последичне дилатације срца, овај хипертрофични одговор се јавља на рачун шупљине срчане коморе, односно срчани зид хипертрофира ка унутрашњости коморе, тиме смањујући њену запремину (72).

Хипертензија доприноси повећању оптерећења срчаног мишића и тиме појачаној потражњи кисеоника од стране миокарда. Са друге стране, долази до смањења протока крви кроз коронарне артерије, што заједно са повећаним оптерећењем миокарда доводи до несразмерног односа између потражње и снабдевања срчаног мишића кисеоником. У складу са тим, смањење артеријског притиска је основни терапијски циљ у току коронарне болести (73).

Годинама уназад је познато да је дислипидемија у директној повезаности са ризиком за кардиоваскуларне болести. Дислипидемија односно поремећај нивоа плазма липопротеина је један од најзначајнијих узрока развоја и прогресије атеросклеротске кардиоваскуларне болести.

Механизам којим липопротеини учествују у атерогенези је у приличној мери расветљен. Липопротеини ниске густине и други атерогени апо Б-липопротеини промовишу сакупљање холестерола у макрофагама као и инфламаторни одговор унутар зида крвног суда водећи ка настанку атеросклерозе. Таложјење масних наслага у зиду крвног суда почиње мобилизацијом липопротеина ниске густине из крви у зид крвног суда (74). Једном када се нађу у интими-медији могу се развити три сценарија: могу се вратити у крвоток (знак регресије лезије и тада могу деловати терапијске методе смањења количине липида у циркулацији, на пример примена антихиперлипидемика), могу се оксидирати кроз директну активацију леукоцита или активацијом слободних радикала или могу бити преузети од стране моноцита који се утквљавањем (преласком из циркулације у зид крвног суда) трансформишу у макрофаге које даље преузимањем липидног садржаја постају пенасте ћелије (75). Оксидовани LDL је нарочито атероген и делује хемостатички за моноците-макрофаге.

Оксидациона модификација LDL-а је праћена продукцијом слободних радикала који узрокују деградацију полинезасићених масних киселина и стварање лизолецитина, оксистерола и модификацију алдехида. Оксидација LDL-а води до многих промена у самој структури овог липопротеина што зависи од концентрације и типа оксиданса који је начинио промену као и од дужине његовог деловања (76,77).

У зависности од степена оксидације, код минимално или мало оксидованог LDL-а, апоБ је промењен само делом и још увек има способност да се веже за LDL рецептор, док максимално или јако оксидован LDL омета везивање за рецептор и бива препознат од стране рецептора чистача (енгл. *scavenger*). Као такав, оксидовани LDL је токсичан и атероген по ендотел, делује хемотаксично привлачећи моноците и Т ћелије, изазива њихово задржавање на површини зида крвног суда, затим улазак у субендотелни простор, где долази до стварања пенастих ћелија, па масних пруга које су део атеросклеротског плака.

Повезаност ниских нивоа липопротеина високе густине (енгл. *high density lipoprotein*, HDL) и ризика за атеросклерозу и коронарну болест се може објаснити помоћу неколико механизма. HDL и његов главни аполипопротеин апо А-I изазивају ефлукс холестерола из макрофага, и то је први корак у поновном процесу успостављања транспорта холестерола, а имају и антиинфламаторни, антитромботични и антиоксидациони ефекат у инхибицији атеросклерозе.

Повишени нивои триглицерида сматрају се фактором ризика за настанак ране кардиоваскуларне болести. Разлог за то може бити исхрана савременог човека препуна угљених хидрата. У вези са овим фактором ризика је и гојазност која поприма карактер епидемије али је на срећу у питању фактор који је могуће променити.

Гојазност је независан фактор ризика за развој коронарне болести. Гојазност је повезана и са убрзаном прогресијом овог стања након постављања дијагнозе (78).

Прекомерна телесна тежина и гојазност предиспонирају развој инсулинске резистенције и дијабетес мелитуса тип 2, који потом убрзавају прогресију коронарне болести и погоршавају њену прогнозу (79). Иако се гојазност званично не убраја у прву линију фактора ризика, показано је да губитак тежине има значајан позитиван утицај на „главне“ конвенционалне факторе ризика (80). Од нарочитог значаја је централна или абдоминална гојазност која је основ кардиометаболичког поремећаја. Висцерално масно ткиво је предиктор дислипидемије, инсулинске резистенције, системске инфламације, дијабетеса и хипертензије.

Поред свих наведених кардиометаболичких фактора ризика, чак преко 50% фактора који узрокују коронарну болест су још увек непознати или недовољно објашњени, па је зато још увек висок проценат оболелих од кардиоваскуларних болести.

Старење је још један важан фактор ризика за исхемијску болест срца (81). Коронарна атеросклероза почиње у детињству и развија се током година. Коронарна артеријска болест се јавља код особа у двадесетим годинама у чак 5-9% те популације. Стопа морталитета расте са годинама и незнатно је виша код мушкараца него код жена, нарочито у периоду између 35 и 55 година живота. После 55. године, стопа смртности од коронарне болести код мушкараца опада а код жена почиње да расте (82). На почетку пубертета, жене имају бољи липидни профил од мушкараца, нивои липопротеина мале густине (LDL) и нон-HDL липопротеини су знатно нижи код младих и жена средње животне доби у односу на мушкарце. Међутим, ова ситуација се мења у менопаузи жене, што говори у прилог томе да су године живота итекако важне и сматрају се значајним фактором ризика за исхемијску болест срца (83).

Позитивна породична анамнеза је важан фактор ризика за развој коронарне болести (84). Први наследници особе код које је дијагностикована коронарна болест у ранијим годинама су у већем ризику да оболе од исхемијске болести од оних који немају позитивну породичну историју оболевања од кардиоваскуларних болести. Научници су открили преко 250 гена који могу имати улогу у коронарној болести. Овакви срчани поремећаји најчешће настају као последица мутације више гена истовремено и такви полигени ефекти указују да је наслеђивање коронарне болести веома комплексно и за сваког појединца представља индивидуални ризик за развој болести (85).

Поред наведених фактора ризика, значајни су социо-економски статус појединца, пушење, конзумирање алкохола и нездрав стил живота, а међу њима и недовољни и потпуни недостатак физичке активности као разлог за настанак исхемијске болести (86).

Иако је значај конвенционалних фактора ризика добро утврђен, више од 50% пацијената са ИБС немају ниједан од тих фактора. Ово имплицира да и други фактори имају улогу у развоју ИБС, као и да постоји доста непознаница у актуелном разумевању патологије ИБС (87,88).

Удео улоге конвенционалних и неконвенционалних фактора ризика у патогенези ИБС је и даље предмет дискусије и захтева додатна истраживања. У неконвенционалне факторе ризика се убрајају: хомоцистеин, коагулациони и фибринолитички фактори, инфламаторни фактори и С реактивни протеин, Lp(a) (89-91). Физичка неактивност као посебан ентитет, фактор ризика, заслужује посебно место у овом истраживању па ћемо га посебно и разматрати (92). Управо је и циљ овог истраживања био да анализира неке од нових фактора ризика и предложи потенцијалне терапијске могућности.

## **1.5. Физичка (не)активност и исхемијска болест срца**

Користи од физичке активности у промоцији здравља добро су документоване током људске историје. Различите облике вежбања прописивали су стари Кинези, Индијци, Грци и Римљани, чинећи вежбање најстаријом терапијском интервенцијом за лечење или спречавање болести (93).

Физички тренинг је добро планирана и организована физичка активност која може бити аеробна и анаеробна. Током аеробних физичких вежби ангажоване су велике групе мишића ногу, трупа и руку. Неки од примера физичке активности су трчање, пливање, вожња бицикла, шетња и сл. Анаеробна физичка активност подразумева физички тренинг употребом великих оптерећења и наглих експлозивних покрета. Способност кардиоваскуларног система унапређују само аеробне активности. Поред те основне поделе, физичка активност се може поделити у односу на тип вежбе из којих се састоји, па тако постоје вежбе за растезање мишића, вежбе за јачање мишића и вежбе за повећање густине костију.

У односу на интензитет аеробних активности, физичка активност може бити ниског, умереног и високог интензитета. Интензитет физичке активности представља степен тежине физичког рада потребног да би се обавила нека физичка активност. Напор који производе вежбе различитог интензитета је индивидуална карактеристика сваког и зависи од утренираности организма појединца. Ниско-интензивна физичка активност је на пример свакодневна активност: обављање кућних послова, лагана шетња и др. Умерено-интензивна физичка активност представља активност већег интензитета и рада мишића и кардиоваскуларног система. Високо-интензивна физичка активност ангажује срце, плућа и велике групе мишића (94,95). Умерена аеробна физичка активност (>150 минута/недељно), обухвата активности: пешачење (>4 км/час), бициклизам (<12 км/час), водене спортове, тенис (дубл), плес, јогу. Под високо-интензивном физичком активношћу (>75 минута/недељно) сматра се: веома брзо ходање, бициклизам (>12 км/час), трчање, тенис (сингл), аеробно играње, интензивније свакодневне активности (баштованство, копање, заливање итд.).

Епидемиолошке студије наглашавају директну везу између физичке неактивности и кардиоваскуларних болести, односно физичка неактивност је независни фактор ризика за развој слабости срца (96,97). Код жена ризик за развој кардиоваскуларних поремећаја услед седентарног начина живота је чак и већи, имајући у виду да су и други кардиометаболички фактори учесталији код жена као што је гојазност и инсулинска резистенција (98,99). У контроли свих фактора ризика, физичка активност има неколико улога јер доприноси снижавању артеријске тензије и смањује нивое триглицерида у серуму; доприноси снижавању LDL-холестерола и повећању HDL-холестерола (100); смањује вредности инфламаторних фактора као што је C реактивни протеин (101); смањује количину масног ткива а тиме и гојазност и помаже у одвикавању од пушења.

Механизми физичке активности којима она остварује своје ефекте на различите органе и органске системе огледа се у дејству дозираних и систематских физичких активности на метаболичке, периферно-мускуларне, плућне и кардиоваскуларне функције. Деловање умерене физичке активности на кардиоваскуларни систем подразумева смањење срчане фреквенце и смањење рада симпатикуса, а последично и смањење потребе за кисеоником при истом напору. Циљ бављења физичком активношћу је довести рад срца у што економичнији статус. Повећана липолиза и повећање концентрације HDL-холестерола, као и позитиван утицај на процес коагулације су позитивни ефекти хроничне умерене физичке активности (102).

Посебно важан ефекат физичка активност остварује и на метаболизам угљених хидрата, а повећањем мишићне масе утиче на инсулинску резистенцију (103). Физичка активност, деловањем на продукцију реактивних врста кисеоника и на биорасположивост азот-мооксида (NO) делује на ендотелну дисфункцију чиме показује своје васкуларне ефекте нарочито важне у кардиоваскуларним поремећајима (104,105). Претходне студије наводе да се после само четири недеље умереног тренинга, код пацијената са кардиоваскуларним поремећајем побољшава ендотелна дисфункција са повећањем коронарне резерве за 29%. Путем деловања на липидни статус односно на ензиме метаболизма липопотеина (липототеинска и хепатична липаза), дозирана и хронична физичка активност снижава концентрацију укупног холестерола и триглицерида, као и

LDL-холестерола. Аеробна физичка активност је делотворнија када је очигледан губитак телесне масе управо због ефеката дислипидемије на укупни кардиоваскуларни ризик о чему је било речи раније (106). Тип, односно трајање, је битније од самог интензитета физичке активности када је у питању превенција коронарних болести. Конкретно, на молекуларном нивоу делује на триглицериде и VLDL честице, повећава ниво Апо А-1 смањујући активност хепатичне липазе.

На метаболизам масти нарочито добро делује активност која захтева динамичке дуготрајне вежбе, као што су брзо ходање, пливање и трчање, са вредностима срчане фреквенце између 40-85% од максималног (107). Умерена и дуготрајна физичка активност има за последицу и комплетно побољшање психофичког статуса, поред редукације кардиоваскуларног ризика.

### **1.6. Дијагностика и терапија исхемијске болести срца**

Дијагностички критеријуми исхемијске болести срца се заснивају на препознавању клиничних симптома и анализи анамнестичких података, лабораторијских налаза као и спровођењу специфичних дијагностичких процедура: ЕКГ у миру, тест физичким оптерећењем, ехокардиографски тест, рендген срца и плућа и коронарна ангиографија. У зависности од присутних фактора ризика спороводе се рутинске биохемијске анализе, а након тога пацијент се подвргава специфичним дијагностичким процедурама.

Основни циљ терапије исхемијске болести срца је побољшати прогнозу болесника, спречити трајно оштећење миокарда и настанак акутног инфаркта миокарда.

Спровођење превентивних мера је примарно начело терапије исхемијске болести срца. Циљ је да се смањењем и кориговањем променљивих фактора ризика (регулисање повишеног крвног притиска, смањење телесне тежине, увођење здравог начина исхране, умерене физичке активности, редовне терапије и контроле дијабетес мелитуса и других болести) могућност обољевања сведе на минимум (108).

Терапија исхемијске болести срца се може поделити на неинвазивну, односно медикаментозну и инвазивну. Медикаментозно лечење применом лекова из групе антиагрегационих лекова, бета блокатора, статина, АЦЕ-инхибитора, нитрата, калцијумских антагониста, и блокатора ангиотензин рецептора предстаља основу секундарне превенције (109).

Реваскуларизација миокарда инвазивним процедурама обухвата коронарну артеријску бајпас реваскуларизацију, перкутану коронарну интервенцију уградње стента и перкутану транслуминалну коронарну ангиопластику (РТСА). РТСА има циљ да отвори непроходне коронарне крвне судове специјалним катетером и уз примену антиагрегационих и тромболитичких лекова. У случају трајних сужења коронарних крвних судова приступа се уградњи стента. Примена стентова обложених леком (инхибиторима пролиферације ћелија) смањила је степен рестеноза али повећала учесталост тромбоза. И на крају, када за то постоје дијагностички параметри који указују да је непоходно хируршким путем уклонити опструкцију крвног суда и трајно решити оклузију, приступа се инвазивној методи хируршке реваскуларизације оклудираног крвног суда (110).

### **1.7. Исхемијско прекондиционирање миокарда**

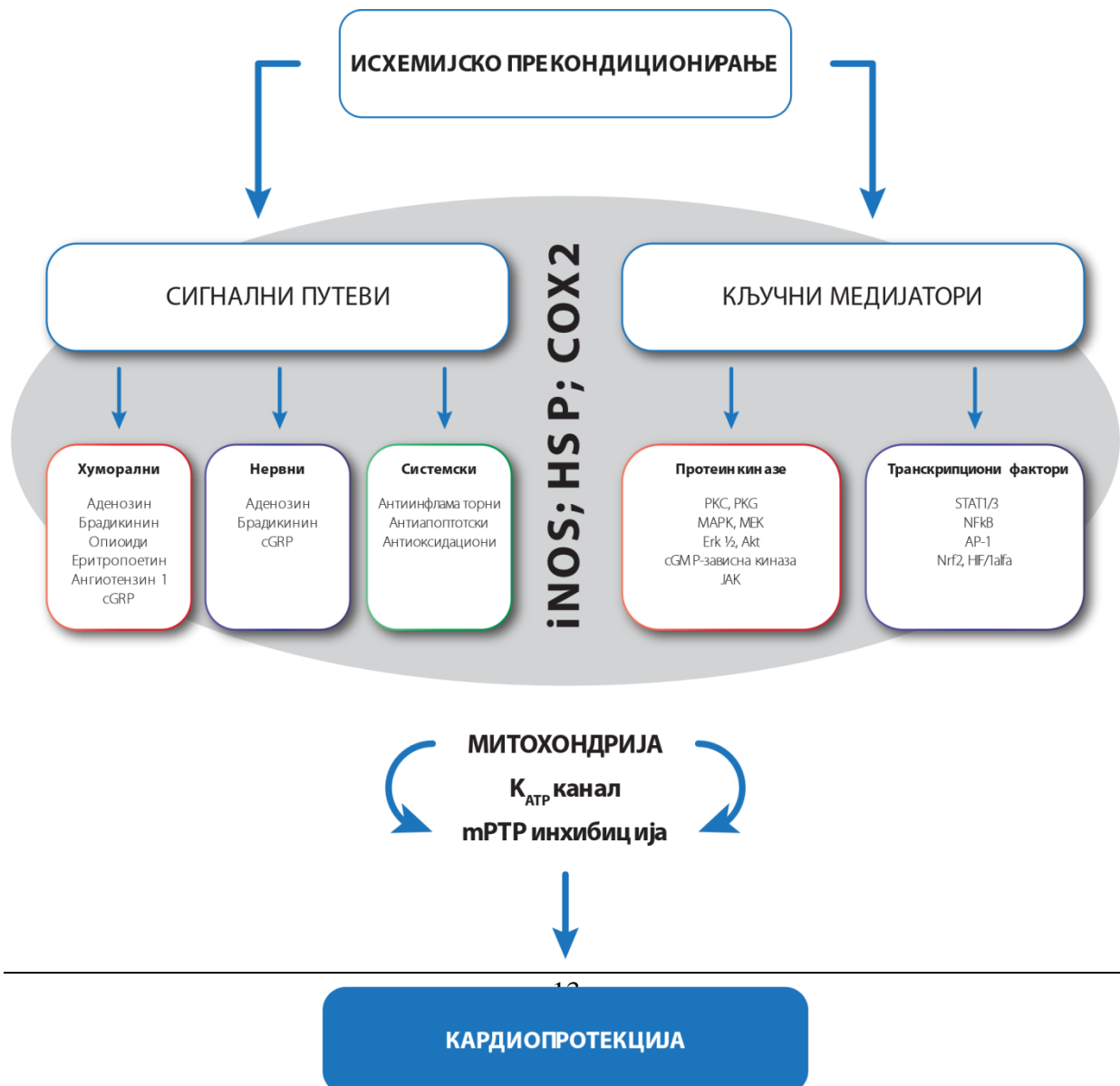
Појам исхемијског прекондиционирања је појава кратких периода исхемије миокарда праћених реперфузијом који делују протективно у смислу боље адаптације миокарда на следећи дужи период исхемије, смањујући величину реперфузионог оштећења (111). Услед инфаркта миокарда настаје некроза дела срчаног мишића са губитком функције, те је од изузетног значаја пронаћи идеалну методу смањења поља некрозе. Исхемијско прекондиционирање се намеће као решење проблема (112).

Давне 1986. године научници *Murry, Jennings* и *Reimer* су први пут увели појам прекондиционарања који су на моделу паса применили периоде кратке исхемије, 4 пута по 5 минута, праћене реперфузијом од 5 минута. Након исхемије, потпуно су опструирали коронарни крвни суд и изазвали инфаркт миокарда. Упоређујући поље некрозе код ових паса у односу на оне код којих није било претходних кратких периода исхемије, утврдили су да је некроза била мања за чак 75% (113,114).

Ови револуционарни резултати су подстакли и друге научнике да исхемијско прекондиционарање све више схватају озбиљном превентивном методом али и да трагају за новим начинима прекондиционарања (115). Да би исхемија деловала протективно, мора довољно дуго, али не превише да траје, по литературним подацима 2-5 минута код животиња а код људи до 90 секунди.

Тачан механизам настанка прекондиционарања је још увек недовољно објашњен у литератури али се претпоставља да је у основи деловање аденозина који се током исхемије ослобађа разградњом аденозин трифосфата и везује за кардиомиоците. Тада се активира протеин киназа С, а сличан ефекат остварују и брадикинин, ендотелин и ангиотензин. У случајевима када је прекондиционарање удружено са појачаном активношћу азот-моноксид синтазе, синтетише се азот-моноксид који отвара калијумове канале на митохондријама и тиме се остварује антиаритмијски ефекат на срце (Слика 2) (116,117).

Примећено је да уколико се у току хируршке реваскуларизације спроведу кратки периоди исхемије помоћу аортних штипаљки, смањује се оштећење миокарда и концентрација тропонина у крви пацијената подвргнутих операцији.



**Слика 2. Механизам исхемијског прекондиционирања**

AP-1, активатор протеина-1; cGMP, циклични гуанозин монофосфат; CGRP, калцитонин зависни пептид; COX2, циклооксигеназа 2; HIF-1 $\alpha$ , хипоксија индуцибилни фактор 1 $\alpha$ ; HSP, *heat shock* протеин; iNOS, индуцибилна азот-моноксид синтаза; JAK, Јанус киназа; MEK, MAPK киназа; mPTP, митохондријална пропустљива транспортна пора; Nrf2, нуклеарни фактор еритроид 2-повезани фактор 2; STAT1/3, сигнални трансдуксер и транскрипциони фактор

Клиничке студије наводе податак да болесници са ангином пекторис имају честу појаву исхемијског прекондиционарања које их штити од инфаркта, појаве шока и срчане слабости. Ангинозни болови су учестала појава исхемије која може деловати и протективно, али је битно доzirати физичко оптерећење и исхемију, која може бити протективна али и фатална за ове пацијенте (116).

Проналажање агенса и фармаколошког препарата који би довео до прекондиционарања би имало немерљив значај, како код пацијаната са ангином пекторис и инфарктом миокарда, тако и код пацијаната који се припремају за уградњу стента односно перкутану коронарну интервенцију и хируршко премошћавање.

### 1.8. Фармаколошко прекондиционарање миокарда

Поред добро познатих антиангинозних лекова који могу изазвати исхемијско прекондиционарање, у литератури се описују и ефекти кортикостероида, анестетика (десфлуран, изофлуран, халотан), ресвератрола, инхибитора циклооксигеназе (аспирин), инхибитора протонске пумпе (118-122). Заједничко за већину фармаколошких агенаса је то што посредством азот-моноксида делују и остварују исхемијско прекондиционарање. Азот-моноксид активира ензим гуанилат-циклазу, повећавајући количину cGMP-а, што представља први корак у релаксацији глатког мишића (123). Треба нагласити да је за кардиопротективне ефекте било ког агенса потребно време, односно да код пацијента код кога су се јавиле ангинозне тегобе и при томе јавио инфаркт, исхемијско прекондиционарање нема ефекта.

Ефекат исхемијског прекондиционарања има нитроглицерин, чији ефекат траје 72 часа, а механизам његовог деловања се заснива на ослобађању азот-моноксида и вазодилатацији (124). У литератури је описана и улога никорандила као никотинамидског агенса на миокард. Као један од првих откривених лекова из класе новијих антиангинозних лекова, има комбинован механизам деловања, посредством ослобађања азот-моноксида и отварања  $K^+$  канала, делује вазодилаторно, и доводи до исхемијског прекондиционарања (125). Пацијенти са нестабилном ангином пекторис који користе никорандил, имају значајно мању инциденцу ангинозних тегоба (126).

Различити фармаколошки приступи прекондиционарању су обимно испитивани, али још увек није у потпуности расветљен њихов комплексни кардиопротективни ефекат. Контрoверзна мишљења и подаци из литературе имплицирају улогу различитих супстанци, као што су аденозин, брадикинин, норепинефрин као и слободни радикали и АТР-сензитивних калцијумских канала (127,128).

### 1.9. Инхибитори фосфодиестераза

Фосфодиестеразе (енгл. *phosphodiesterase, PDE*) су разнородна фамилија ензима која врши хидролизу цикличних нуклеотида што указује на њихову кључну улогу у регулацији унутарћелијских нивоа секундарних гласника: цикличног аденозин монофосфата (cAMP) и гуанозин монофосфата (cGMP) и самим тим у функционисању ћелије.

Откриће фосфодиестераза почиње давне 1886. године истраживањем доктора *Henry Hyde Salter*-а. Као астматичар, приметио је да када попије шољицу јаке кафе пре obroка, значајно лакше дише а ефекат побољшања респираторне функције приписао је кофеину. Иако у то време тачан механизам деловања није био ни приближно познат, претпостављало се да је кофеин неселективни умерено јак инхибитор фосфодиестеразе. Касније, управо аналози кофеина као што је теофилин, добијају своју примену и успешно се користе у третману отежаног дисања и опструкције дисајних путева. Скоро 100 година након овог епохалног открића, догађају се нова истраживања. Тачније, 1958. године *Earl Sutherland* и *Ted Rall* објављују резултате проналаска цикличног аденозин монофосфата



(сАМР) у екстракту јетре, као секундарног гласника и напомињу да његова активност зависи од ћелијских ефеката неуротрансмитера и хормона (129).

Пет година након овог открића, научници откривају и други секундарни гласник, циклични гуанозин монофосфат (сGMP) у урину пацова (130). У истој студији, фосфодиестеразе су идентификоване као ензими способни да инактивирају сАМР. Активација фосфодиестераза се одвија у присуству јона магнезијума, а инхибиција је посредована кофеином.

За веома кратак период, доста се истраживало и већ седамдесетих година прошлог века се знало да постоји више различитих изоформи PDE, које се разликују по афинитету за супстрат и осетљивости на калцијум-калмодулин комплекс. Иницијално су идентификоване три изоформе, CaM-PDE, сАМР-PDE и сGMP-PDE. Остале изоформе су откривене 1995. године, да би се исте године стандардизовала номенклатура и званична подела PDE изоформи. Данас се зна да постоји 11 група изоензима фосфодиестеразе и преко 50 изоформи. PDE су активне у скоро свакој ћелији у организму и распрострањене су и на ћелијском и субћелијском нивоу, што говори о њиховом значају, као и о могућем терапијском потенцијалу њихових инхибитора.

Научници се последњих година фокусирају на селективност инхибитора фосфодиестераза и трагају за карактеристичном специфичношћу за поједина ткива, посебно за ткиво срца и респираторном систему. Због своје неселективности, PDE инхибитори имају широко индикационо подручје у клиничкој примени. Инхибитори PDE2 се користе у сепси и акутном респираторном дистрес синдрому, PDE3 код конгестивне срчане слабости (131,132), PDE4 за третман хроничне опструктивне болести плућа, псоријазе, мултипле склерозе, Алцхајмерове болести, губљења меморије и атопичног дерматитиса. Инхибитори PDE5 се користе у терапији плућне хипертензије, кардиоваскуларних болести, сексуалних дисфункција, možданог удара, леукемије и болести бубрега (Табела 1).

**Табела 1. Суперфамилија фосфодиестераза (133-136)**

Фамилија фосфодиестераза	Супстрат	Ефекат	Инхибитори	Клиничка примена
<b>PDE 1</b>	cAMP/cGMP	Ca <sup>2+</sup> -калмодулин активација	Винпоцетин Никардипин Нимодипин 8-МеОМ-ИВМХ	Деменција, губљење памћења
<b>PDE 2</b>	cAMP/cGMP	cGMP активација	ЕННА	Сепса, акутни респираторни дистрес синдром, губљење памћења
<b>PDE 3</b>	cAMP/cGMP	cGMP инхибиција	Ликсазинон Цилостамид Милринон Цилостазол Дихидро-пиридазинон	Гломерулонефритис, конгестивна срчана слабост, интермитентна клаудикација, тромбоза, плућна хипертензија
<b>PDE 4</b>	cAMP	cGMP несензитивност Фосфорилација посредована РКА, ERK	Ролипрам Денбуфилин Циломиласт Рофлумиласт	Гломерулонефритис, астма, ХОБП, биполарни поремећај, аутоимунски енцефаломијелитис, трансплантација органа
<b>PDE 5</b>	cGMP	РКА/PKG фосфорилација везивањем cGMP	Силденафил Дипиридамола Запринаст Варденафил Тадалафил Арифло	Хронична срчана слабост Ретенција течности код нефротског синдрома, плућна хипертензија, еректилна дисфункција, трансплантација органа
<b>PDE 6</b>	cGMP	Активација трансдуцина	Дипиридамола Запринаст Варденафил Тадалафил	Селективни инхибитори фосфодиестеразе-6 имају малу примену због нежељених дејстава
<b>PDE 7</b>	cAMP	Ролипрам несензитивност	Дипиридамола Тиадиазол	Болести респираторног и имунског система
<b>PDE 8</b>	cAMP	Ролипрам несензитивност ИВМХ несензитивност	Дипиридамола	Поремећаји имунског система
<b>PDE 9</b>	cGMP	ИВМХ несензитивност	Запринаст	Потенцијални хипогликемијски ефекти
<b>PDE 10</b>	cAMP/cGMP	Непознато	Дипиридамола Папаверин	Третман схизофреније и других психијатријских поремећаја
<b>PDE 11</b>	cAMP/cGMP	Непознато	Тадалафил Запринаст Дипиридамола	Потенцијално побољшање функције тестиса

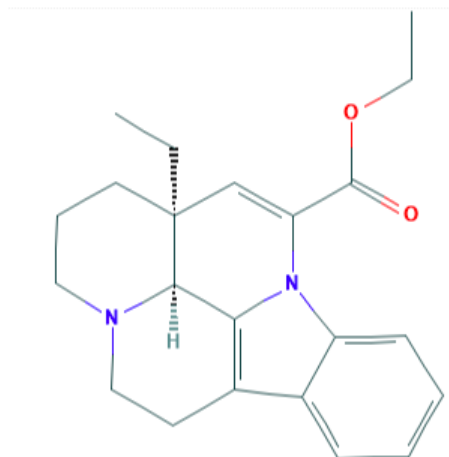
Силденафил је један од најпознатијих представника инхибитора PDE и он инхибицијом PDE5 узрокује вазодилатацију повећањем концентрације cGMP чиме се постиже релаксација васкуларних глатких мишићних ћелија (137). Примарна и најпознатија индикација силденафила је еректилна дисфункција мушкарца, иако је основно деловање овог лека, због чега је иницијално и развијан, било је везано за његов позитиван утицај на артеријску плућну хипертензију (PAH). Мета анализе потврђују смањење смртности и броја хоспитализација код пацијената са PAH на терапији силденафилом независно од примењене дозе (138).

Инхибитори PDE1 су познати по свом специфичном механизму деловања односно потенцијацији глутаминергичке трансмисије (139). Тачније, инхибитори PDE1 повећавају cAMP/cGMP нивое инхибицијом ових ензима, што даље доводи до фосфорилације  $\alpha$ -амино-3-хидрокси-5-метил-изоксазолпропионске киселине (AMPA) и глутаминергичке трансмисије. У лекове који имају поред других ефеката и инхибицију PDE1 спадају: винпоцетин, амантадин, депренил, кофеин, запринаст и нимодипин. Калмодулин бива активиран калцијумом и доводи до конверзије аденозин монофосфата у циклични аденозин монофосфат, то је основни механизам PDE1 инхибиције. Постоји неколико изоформи PDE1, па тако PDE1A1 се налази и плућима и срцу, док се PDE1A2 и PDE1B1 налазе у мозгу. PDE1C1 испољава снажну експресију у ткиву срца, иако се налази и у можданом ткиву (140).

Због локализације ензима фосфодиестеразе тип 1 у срчаном ткиву, инхибиција овог ензима би могла да буде један од начина прекондиционирања миокарда. Фосфодиестераза тип 1 хидролизује циклични аденозин монофосфат и циклични гуанозин монофосфат и њена експресија је ограничена на срце. PDE1 инхибитори индукују вазодилатацију крвних судова, што указује на значај ових лекова у третману хипертензије и вазоспазма. Лек никардипин је одобрен за примену у терапији хипертензије, вазоспазма и ангине пекторис (141), винпоцетин је индикован у терапији когнитивног пропадања и у фази је истраживања као потенцијални лек у третману епилепсије (140, 142, 143). Нимодипин је лек који доминантно делује на контрактилност крвних судова јер као 1,4-дихидропиридински блокатор калцијумских канала стабилизује волтажно зависне канале за калцијум L-типа и тиме превенира контракцију мишићних ћелија и последничну вазоконтракцију. Оно што га издваја од других блокатора калцијумских канала је то што снажније делује на церебралну циркулацију него на периферну, па се из тог разлога користи за побољшање неуролошких исхода након субарахноидалних крварења (144).

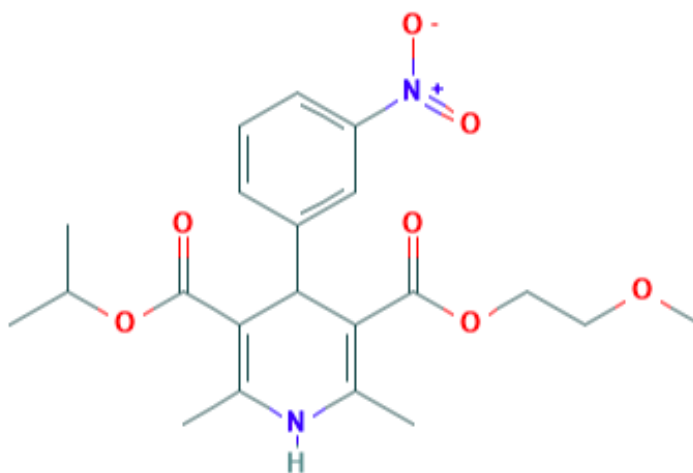
Винпоцетин (Cavinton®)(IUPAC номенклатура: *ethyl (15S,19S)-15-ethyl-1,11-diazapentacyclo[9.6.2.02,7.08,18.015,19]nonadeca-2,4,6,8(18),16-pentaene-17-carboxylate*) је лек који се користи у третману симптома различитих облика цереброваскуларних поремећаја, стања након можданог удара и у васкуларној деменцији (145,146). Винпоцетин је синтетисан из алкалоида винкамина и класичан је представник инхибитора PDE1. Механизам дејства се огледа и у инхибицији волтажно зависних канала за натријум и калцијум као и инхибицији N-метил-D-аспартат (NMDA) и AMPA рецептора. Централни механизам деловања на мождани метаболизам се огледа у појачавању преузимања глукозе и кисеоника од стране церебралног ткива. Повећањем транспорта глукозе, делује на повећање толеранције на хипоксију (147). Селективно инхибира калцијум ( $\text{Ca}^{2+}$ )-калмодулин зависни cGMP-PDE ензим, повећавајући нивое цикличних нуклеотида у можданом ткиву. Познато је да винпоцетин делује и на агрегацију тромбоцита и вискозност крви, повећава ткивни транспорт кисеоника редуковањем афинитета еритроцита за кисеоник. Поред свог ноотропног дејства, винпоцетин испољава антиинфламаторно, антиоксидационо, вазодилататорно, антиепилептично и неуропротективно дејство (148). Код хроничних кардиоваскуларних болесника, винпоцетин побољшава нарушене хемодинамске особине, побољшава

ендотелну функцију, повећава церебрални крвни проток и метаболизам што има повољне ефекте на кардиоваскуларни систем (149).



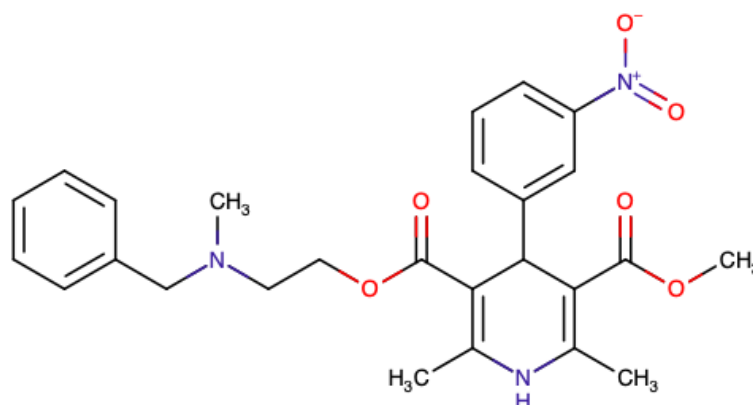
Слика 3. Хемијска структура винпоцетина (*PubChem*)

Нимодипин (*НИМотоп S®*, *НИМодипин®*) (IUPAC номенклатура: *3-O-(2-methoxyethyl) 5-O-propan-2-yl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate*) се користи у третману превенције исхемијског неуролошког дефицита узрокованог церебралним вазоспазмом након субарахноидалне хеморагије која настаје услед руптуре анеуризме (150). Интравенска примена нимодипина у току 5-14 дана, настављена оралном применом током три седмице, значајно смањује степен неуролошког дефицита. Орална терапија се може започети и од почетка, до 4 дана од почетка крварења. Појединачне дозе од 60 mg дају се на 4 сата, укупна дневна доза је 360 mg, током 3 недеље. Нимодипин блокира калцијумске канале дихидропиридинске групе и изазива вазодијатацију (151). Први пут је одобрен од стране FDA 1988. године. Деполаризацијом глатких мишићних ћелија у крвним судовима блокира волтажностависне канале за калцијум, превенирајући вазоконстрикцију која може бити смањена и до 75%. Има већи афинитет према церебралним крвним судовима с обзиром на то да је липофилне структуре, пролази кроз хемато-енцефалну баријеру, повећава церебралну перфузију, дилатацијом артерија (152). Примена нимодипина *off-label* код пацијената са Алцхајмеровом болешћу и васкуларном деменцијом је још увек контроверзна, па ипак упркос несигурностима у погледу ефикасности, нимодипин се прописује код когнитивних оштећења и деменције у неколико земаља Европе (153).



Слика 4. Хемијска структура нимодипина (*PubChem*)

Никардипин (IUPAC номенклатура: *2-(benzyl-methyl amino)ethyl methyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(m-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylate monohydrochloride*) је блокатор калцијумских канала и припада групи дихидропиридинских агенаса који се због својих вазодилататорних ефеката користи у третману хипертензивних стања (154). Спада у лекове прве линије у третману хипертензивне кризе поред нитропрусида, фенолдопама и лабеталола (155). Као дихидропиридин друге генерације има снажно вазодилататорно дејство са ефектом на церебралну и коронарну циркулацију. Инхибирајући инфлукс калцијума у срчани мишић и глатке мишићне ћелије остварује ефекат на контрактилност (156).



Слика 5. Хемијска структура никардипина (*PubChem*)

Имајући у виду све наведене чињенице, још увек није у попуности објашњен тачан механизам деловања инхибитора фосфодиестеразе тип 1 у срцу, а нарочито да ли у комбинацији са физичким тренингом може деловати на кардиоваскуларни систем и на који начин. Очекујемо да резултати овог истраживања пруже додатне информације о деловању ових лекова, односно још увек недовољно истражених њихових ефеката на кардиодинамику и коронарну циркулацију, као и на редокс статус и пруже потенцијална терапијска решења за будућу клиничку праксу. Поред тога, након свих наведених чињеница намеће се питање на који начин различити облици прекондиционирања утичу на функционалост срца.

## **ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА**

## 2. Циљ истраживања

### 2.1. Општи циљ

Циљ ове докторске дисертације је испитивање улоге инхибитора фосфодиестеразе 1 у прекондиционирању миокарда са посебним освртом на улогу физичке активности као модела нефармаколошког прекондиционирања срчаног мишића.

### 2.2. Специфични циљеви

- i. Испитивање ефеката хроничне администрације различитих инхибитора фосфодиестеразе-1 на експерименталном моделу прекондиционирања миокарда на миокардну функцију и коронарну циркулацију.
- ii. Анализа ефеката физичке активности на кардиодинамику срчаног мишића као и коронарну циркулацију али и утицаја комбиноване примене са фармаколошким прекондиционирањем;
- iii. Испитивање улоге биомаркера оксидационог оштећења као што су: азот-моноксид, супероксид анјон радикал, водоник-пероксид и липидни пероксиди на кардиодинамику на анималном моделу фармаколошког и нефармаколошког прекондиционирања миокарда;
- iv. Испитивање улоге одабраних ензимских и неензимских параметара антиоксидационе заштите организма (ензима каталазе и супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона) на анималном моделу фармаколошког и нефармаколошког прекондиционирања миокарда.

# МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ



### **3. МЕТОДОЛОГИЈА**

#### **3.1. Материјал**

За биохемијске анализе одређивања биомаркера оксидационог стреса и ензима антиоксидативне заштите коришћени су комерцијални реагенси и супстанце аналитичке чистоће за припрему пуфера и перфузионих раствора.

#### **3.2. Етички аспекти истраживања**

Сва експериментална и лабораторијска испитивања су урађена у складу са релевантним европским директивама у тој области (ЕУ директива за заштиту животиња намењених експерименталним и другим научним сврхама број 86-609 ЕЕС), у складу са Правилником о раду са експерименталним животињама и принципима етике који су донети на седници институционалног Етичке комисије за заштиту добробити животиња које се користе у истраживачке сврхе (Медицински факултет, Универзитет у Крагујевцу).

#### **3.3. Анимални модел физичког тренинга**

За физичку активност, коришћен је модел трчања на тредмилу за пацове са опсегом брзине од 2 до 50 метара у минути и убрзањем од 0.1 метара у минути. Адаптација животиња на трчање је спровођена 10 минута дневно пет дана уз 2 дана одмора током две недеље (прва недеља 5 m/min, друга недеља 10 m/min). Да би се детерминисао интензитет тренинга, одређиван је аеробни капацитет животиња коришћењем тестова као што је максимално оптерећење на тредмилу. На основу добијених вредности аеробне способности израчунава се брзина којом су животиње трчале током тренажног процеса, како би се обезбедио умерени интензитет тренинга који је, према литературним подацима најефикаснији у постизању позитивних ефеката на кардиоваскуларни систем (157) (Табела 2).

Након адаптације животиња и детерминисања интензитета тренинга, животиње су 8 недеља у трајању од 60 минута биле подвргнуте тренингу на тредмил траци пет пута у току недеље (158) (Слика 3).

	Понедељак-Петак	Субота-Недеља
1 и 2 недеља	10 m/min 1 h	Период одмора
3 недеља	11 m/min 1 h	
4 и 5 недеља	12 m/min 1 h	
6 недеља	13 m/min 1 h	
7 недеља	14 m/min 1 h	
8 недеља	15 m/min 1 h	

**Табела 2. Протокол умерене физичке активности**



**Слика. 3 Специјализовани тредмил за пацове и протокол физичке активности умереног интензитета**

### 3.4. Анимални модел фармаколошког прекондиционирања

Шесте недеље од почетка тренинга, ова група је подељена на 4 подгрупе, при чему је прва подгрупа била контролна, односно није била подвргнута фармаколошком прекондиционирању, док су преостале три групе биле подвргнуте фармаколошком прекондиционирању (интраперитонеална инјекција одговарајућег инхибитора фосфодиестеразе 1) у трајању од 3 недеље. Лекови из групе инхибитора PDE1 су растворени у разблаженом раствору диметил-сулфоксида (DMSO) [DMSO: физиолошки раствор (10:90)]. Једнака количина DMSO је примењивана и у контролним групама. Изабране концентрације агенаса (10 mg/kg/дан-винпоцетин, 10 mg/kg/дан-нимодипин и 6 mg/kg/дан-никардипин) одређене су на основу доступне литературе и претходних експеримената (159-161).

### 3.5. Протокол истраживања

Истраживање је обухватило пацове, *Wistar albino* соја, старости 8 недеља, просечне телесне масе  $250 \pm 50$  g, мушког пола. Адаптација животиња и чување се обављало у специјални виваријумима са специјалним лабораторијским условима.

У зависности од тога да ли су биле подвргнуте прекондиционарању физичком активношћу, све животиње су подељене на две експерименталне групе, а у зависности од инхибитора фосфодиестеразе 1 којим је спровођено фармаколошко прекондиционарање, обе експерименталне групе су подељене на четири одговарајуће подгрупе.

Прва група (n=48) је обухватила животиње које су бити подвргнуте прекондиционарању физичком активношћу (Т-трчање) у трајању од 8 недеља. Након шест недеља од почетка физичке активности, животиње су биле подељене на четири подгрупе у зависности од лекова који су се користили за фармаколошко прекондиционарање. Животињама из све четири подгрупе је током три недеље у једној дневној дози интраперитонеално (и.п.) апликован одговарајући лек, односно физиолошки раствор уколико је реч о контролној групи.

- I. Подгрупа Тренинг контрола (n=12) – физиолошки раствор (1ml/дан и.п.);
- II. Подгрупа Тренинг+Винпоцетин (n=12) – 10 mg/kg/дан винпоцетина (и.п.);
- III. Подгрупа Тренинг+Нимодипин (n=12) – 10 mg/kg/дан нимодипина (и.п.);
- IV. Подгрупа Тренинг+Никардипин (n=12) – 6 mg/kg/данникардипина (и.п.).

Друга група пацова (n=48) (старости 11 недеља) је била подвргнута само фармаколошком прекондиционарању у трајању од 3 недеље. У зависности од примењеног лека за фармаколошко прекондиционарање подељена је на 4 подгрупе. Прва подгрупа је била контролна (и.п. физиолошки раствор), док су се друга, трећа и четврта међусобно разликовале по интраперитонеално апликованом инхибитору фосфодиестеразе 1 (и.п. инјекција одговарајућег инхибитора фосфодиестеразе 1 у трајању од 3 недеље).

- I. Подгрупа Контрола (n=12) – физиолошки раствор (1ml/дан и.п.);
- II. Подгрупа Винпоцетин (n=12) – 10 mg/kg/дан винпоцетина (и.п.);
- III. Подгрупа Нимодипин (n=12) – 10 mg/kg/дан нимодипина (и.п.);
- IV. Подгрупа Никардипин (n=12) – 6 mg/kg/данникардипина (и.п.).

Након хроничних третмана прекондиционарања миокарда животиње су жртвоване. Непосредно пре жртвовања експерименталне животиње су изложене краткотрајној етарској наркози. Жртвовање је вршено цервикалном дислокацијом.

### 3.6. Langendorff-ова перфузија

Модел изолованог срца утемељио је *Oscar Langendorff* (1853-1908) који служи за изучавање функције коронарне циркулације, кардиодинамике и уопште функције срца глодара. Овај немачки лекар и физиолог је пре свега остао упамћен по свом експерименталном моделу испитивања срца и апарату на којем се врши испитивање, тзв. Langendorff-ов апарат. Поред тога, заслужан је и за откриће респирација односно улоге симпатичког и периферног нервног система.

Ретроградна перфузија изолованог срца или ретроперфузија је артефицијални метод који имитира допремање крви и кисеоника путем крви кроз вене до миокарда. Метода се заснива на *ex vivo* техници, и данас се ова метода управо и назива Langendorff-ом перфузијом (162).

Током препарације срца, орган се уклања из животиње чувајући крвне судове. Перфузија се одвија кроз аорту, обично обогаћеним раствором и кисеоником, тзв. Krebs-

Henseleit раствором или Тиродовим раствором. Притисак у аорти помаже затварање аортне валвуле потискујући крв у коронарне крвне судове што се и дешава у физиолошким условима. Овако нахрањено срце, нутритијентима и кисеоником је способно да буде у функцији још неколико сати након изоловања. Описани начин перфузије је одличан модел за испитивање лекова, јер лекови пролазе помоћу перфузата кроз срце, али без утицаја хуморалних и нервних ефеката организма што је случај у *in vivo* испитивањима.

У нашем истраживању је изабран модел у коме се остварује константан притисак у васкуларном кориту док је проток променљива величина, због сличности са интактном циркулацијом, где се перфузиони притисак одржава константним.

### 3.7. Хируршка метода изоловања срца пацова

Хируршка метода изоловања срца пацова подразумева брзу интервенцију са употребом хладног физиолошког раствора. Срце се вади из грудног коша, и секу се крвни судови на бази срца. Срце се одмах ставља у охлађени физиолошки раствор ( $-4^{\circ}\text{C}$  до  $-10^{\circ}\text{C}$ ), да би се метаболички процеси у миокарду свели на минимум. Приступа се тупој препарацији базе срца, са отклањањем свих елемената осим асцендентне артерије. Описана хируршка процедура траје 2-3 минута. Овако припремљено срце се поставља на модификовани систем за изоловано срце по методи установљеној по чувеном физиологу Оскару Лангендорфу, по коме је апарат и добио назив Лангендорфов апарат (произвођач Експериметриа, Будимпешта, Мађарска).

Након постављања изолованог срца на апарат *Langendorff*, учињено је уклањање аурикуле и дисекција митралне валвуле кроз претходно проширени отвор плућних вена. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле у леву комору се уводи балон од латекса у коме се налази раствор без мехурића који је повезан за сензор притиска (*transducer BS4 73-0184, Experimentia Ltd, Budapest, Hungary*), а чиме се континуирано софтверски региструју жељени кардиодинамски параметри функције леве коморе. Срце се перфундује константно Кребсовим раствором који се загрева и одржава на константној температури ( $37^{\circ}\text{C}$ ), уз константну оксигенацију (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Због већег притиска у аорти, течност се креће из аорте у леву преткомору, леву комору а затим у коронарне крвне судове и то све на константном коронарном притиску од  $70 \text{ cmH}_2\text{O}$ . Промене притиска у левој комори региструје сензор, трансдјусер претвара механички сигнал у електрични и преноси га до појачивача.

Кардиодинамски параметри које смо одређивали у овом истраживању били су следећи:

- а)  $dp/dt \max$  - максимална стопа промене притиска у левој комори,
- б)  $dp/dt \min$  - минимална стопа промене притиска у левој комори,
- в) *СПЛК* - систолни притисак леве коморе,
- г) *ДПЛК* - дијастолни притисак леве коморе и
- ђ) *СФ* - срчана фреквенца
- е) *КП* - коронарни проток

Одмах након изолације срца из грудног коша и постављања на аортну канилу, почиње период стабилизације параметара функције срца и протока. После тога, следи експериментални период који подразумева изазивање глобалне исхемије од 20 минута и поновно успостављање протока односно периода реперфузије у трајању од 30 минута. Тачке од интереса су тачка пре и после исхемије, и након тога тачка након сваких пет минута у реперфузији (реперфузија 1 до реперфузија 7).

### **3.8. Биохемијске методе**

#### **3.8.1. Материјал за биохемијске анализе**

За одређивање параметара редокс статуса које подразумева одређивање биомаркера оксидационог стреса (прооксиданаса и продуката њиховог деловања) и параметара антиоксидационе заштите (ензимског и неензимског дела) коришћени су: коронарни венски ефлуент и узорци крви, односно компоненте које су добијене након центрифугирања крви: крвна плазма и хемолизат еритроцита.

#### **3.8.2. Параметри редокс статуса**

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента и у крвној плазми стандардизованом методом на спектрофотометру смо одређивали следеће биомаркере:

1. Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet -}$ ),
2. Индекс липидне пероксидације у виду ТБАРС односно тиобарбитурна киселина реагујуће супстанце,
3. водоник-пероксид ( $H_2O_2$ ),
4. азот-моноксид у форми нитрита ( $NO_2^-$ ).

У хемолизату еритроцита су одређиване вредности параметара антиоксидационе заштите:

1. активност ензима каталазе (КАТ),
2. активност ензима супероксид дисмутазе (СОД),
3. концентрација редукованог глутатиона (GSH)

Параметри редокс статуса су одређивани у Лабораторији за експерименталну кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу применом спектрофотометријских метода (спектрофотометар UV-1800 SPECTROPHOTOMETER, Shimadzu, Japan).

##### **3.8.2.1. Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet -}$ )**

Детерминација биомаркера  $O_2$ - перфузату подразумева мерење овог маркера током хемијске реакције са NBT-ом. При таласној дужини од 550 нанометара, и слепој проби у виду дестиловане воде одређивана је концентрација супероксид анјон радикала (163).

### **Реагенси - хемикалије**

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминоетан,  $C_4H_{11}NO_3$ , 50 mM, pH=8,6  
Хлороводонична киселина (HCl), 37% $\rho=1,19$  g/cm<sup>3</sup>,  
Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1 mM  
Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT,  $C_{40}H_{30}C_1N_{10}O_6$ ), 0,1 mM  
Желатин ( $C_{15}H_{11}N_2 NaO_2$ ), 0,1 mg/ml.

### **Поступак**

У епрувете (12x100 mm) се пипетира 50  $\mu$ l узорка коронарни венски ефлуент или плазма) и 950  $\mu$ l реакционе смеше. Као слепа проба, коришћен је Krebs-Henseleit раствор. На почетку реакције, непосредно након додавања узорка (или следеће пробе) и мешања, измерена је почетна екстинкција смеше ( $A_1$ ). Уз континуирано мерење на 60 секунди и мешање, како за узорак тако и за слепу пробу рачуна се концентрација супероксида у узорку, при чему  $A_1$  подразумева почетну а  $A_2$  последњу измерену екстинкцију.

#### **3.8.2.2. Индекс липидне пероксидације**

Концентрација липидних пероксида као важних биомаркера оксидационог стреса је мерена путем индиректне методе мерења нивоа субстанци које су реаговале са тиобарбитуратном киселином (ТБА). С обзиром на то да MDA има највећу концентрацију од свих осталих продуката који реагују са ТБА, сматра се да је концентрација која се одреди овом методом представља концентрацију MDA (164).

### **Реагенси – хемикалије**

ТБА (тиобарбитурна киселина) 1%, растворен у 0,05 M NaOH  
ТСА (трихлорсирћетна киселина), 28%

### **Поступак**

У епрувету се пипетира 800  $\mu$ l узорка (коронарни венски ефлуент) и 200  $\mu$ l 1% ТБА у 0,05 моларном NaOH. Затим се инкубирају (15 минута, 100 °C), након чега се 15 минута инкубирају односно хладе на собној температури пре читавања апсорбације. Апсорбација се мери на  $\lambda=530$  nm. Одређивање нивоа TBARS у плазми има корак депротеинизације са 28% ТСА (800  $\mu$ l плазме и 400  $\mu$ l киселине), а слепа проба подразумева употребу исте количине дестиловане воде.

#### **3.8.2.3. Водоник-пероксид ( $H_2O_2$ )**

Водоник пероксид као важан биомаркер оксидационог стреса је могуће измерити методом која подразумева употребу фенол црвеног уз присуство ензима пероксидазе. Мерењем на таласној дужини пд 610 нанометара и слепоу пробу у виду дестиловане воде мери се конветрација ослобођеног водоник пероксида током одређеног временског периода од 60 минута (165).

### **Реагенси - хемикалије**

Фенол црвено (енгл. *phenol red solution*, PRS), 0,28 mM

NaCl, 140 mM,  
Калијум фосфатни пуфер, 10 mM (pH =7,0), 5,5 mM  
D(+)-глукоза, 5,5 mM  
Пероксидаза (HRPO), 1:20  
NaOH, 1 M

### **Поступак**

У епрувете (12x100 mm) се пипетира 200  $\mu$ l коронарног венског ефлуента и 800  $\mu$ l реакционе смеше. Реакциона смеша настаје мешањем NaCl, калијум фосфатног пуфера (pH =7,0), глукозе и Phenol Red-a.

За конструисање стандардне криве, користи се стандардни раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, уз претходну проверу концентрације мерењем апсорбанције раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A<sub>230</sub> за 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> износи 0,810). Ово је неопходно зато што је видоник-пероксид нестабилно једињење и стајањем долази до његове деградације.

#### **3.8.2.4. Одређивање нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

Индиректна спектрофотометријска метода одређивања количине азот монооксида подразумева практичну и брзу методу мерењем нивоа нитрита у коронарном перфузату употребом Грисеовог реагенса (166).

### **Реагенси-хемикалије**

Griess-ов реагенс:

1% сулфанилна киселина растворена у 5% орто-фосфорној киселини и 0,1% воденом раствору N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA).

Амонијачни пуфер, pH=9.0:

(амонијум хлорид (NH<sub>4</sub>Cl) и натријум тетраборат (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>))

1 mM NaNO<sub>2</sub> за стандардну криву

Количина азот монооксида је једнака концентрацији нитрита која се налази у узорку који се спектрофотометријски читава на таласној дужини од 550 нанометара.

#### **3.8.2.5. Одређивање активности ензима каталазе**

Метода одређивања активности ензима каталазе подразумева методу на спектрофотометру која се заснива на хемијској реакцији катаболизма водоник пероксида у присуству каталазе (167).

### **Реагенси-хемикалије**

Пуфер 1: 1M Tris HCl, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH=8,0,

Пуфер 2: 1.0 M фосфатни пуфер pH=7,0,  
10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Поступак

Уз употребу следеће пробе у воду дестиловане воде и мерењем на таласној дужини од 230 нанометара добија се активном ензима каталазе која се изражава у  $U/gHg \times 10^3$ .

#### **3.8.2.6. Одређивање концентрације редукованог глутатиона**

Количина редукованог глутатиона у узорку се одређује стандардизованом методом на спектрофотометру при таласној дужини од 412 нанометара (168).

### Реагенси-хемикалије

0,1% EDTA,

Раствор за преципитацију (1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, до 100 ml дестилована вода).

0,1 M  $Na_2HPO_4$ , pH=7,4,

DTNB (5,5–дитио–бис–6,2–нитробензојеве киселина): 1 mg DTNB/ml у 1% натријум цитрату)

### Поступак

Екстракција глутатиона се добија хемијском реакцијом EDTA и преципитационог раствора који се вортексирају и центрифугирају 10 минута на 4000 обртаја. Уз употребу следеће пробе (дестилована вода) количина редукованог глутатиона се изражава  $U/gHg \times 10^3$ .

#### **3.8.2.7. Одређивање активности ензима супероксид дисмутазе**

Активност супероксид дисмутазе као важног антиоксидативног ензима се мери спектрофотометријском епинефринском методом (169). Из разлике количине слободно аутооксидованог епинефрина у контролном узорку и оног који се аутооксидовао у узорку где је био присутан и ензим СОД, добија се количина епинефрина који се није аутооксидовао односно добија се увид у ниво инхибиције. Што је та разлика већа, већа је и инхибиција од стране СОД, односно већа је његова ензимска активност.

### Реагенси-хемикалије

Карбонатни пуфер, 0,05 mmol/L pH 10,4 коме је додат 1 mmol/L EDTA

Хлороводонична киселина, 20 mM

Раствор адреналина, 10 mM, растворен у 20 mM HCl.

### Поступак

Хемијска реакција се заснива на мешању узорка и карбонатног пуфера уз додавање епинефрина. Мерењем на 470 нанометара, те се активност супероксид дисмутазе се изражава у  $U/gHg \times 10^3$  (170).



### 3.9. Хистолошка анализа ткива срца и скелетног мишића

Хистопатолошка анализа у овом истраживању подразумевала је изоловање, сечење, калупљење и пребојавање исечака ткива скелетног и глатком мишића (бутни мишић и срчани мишић пацова). Прво, обављена је фиксација ткива у великој запремини формалдехида, затим калупљење помоћу парафина на дебљину ткива од пет микрометара а затим и преношење на предметна стакла. Затим је уследило бојење препарата, еозином и хематоксилином. Као такав, након периода сушења од 24 часа, препарат ткива је био спреман за патохистолошку анализу од стране хистолога на микроскопу (171).

Основни критеријуми морфометријских промена срчаног ткива и ткива скелетног мишића односе се на регуларност распореда мишићних влакана, хипертрофију мишићних влакана и дегенеративне промене (једарни полиморфизам, хипертрофија једара, везикуларност), особине саркоплазме (кондензација и хипереозинофилија (исхемија)) и интерстицијума (ширина интерстицијума, целуларност, умноженост колагена влакна (везиво) и масно ткиво (масна инфилтрација) – исхемија) и стања крвних судова (дебљина зида, интима и промене у интими, атеросклеротични плакови, суперпонирана тромбоза, крварење у плаку, хипертрофија медије и дијаметар лумена).

### 3.10. Статистичка анализа података

Статистичка и графичка обрада података је урађена у програму SPSS version 25.0 for Macintosh (IBM, New York, USA). За опис резултата и тумачење коришћене су методе дескриптивне статистике (средња вредност, стандарданда грешка средње вредности), статистички значајна разлика је дефинисана тако да вредности  $p < 0,05$  се сматрају статистички значајним. За поређење средњих вредности између група употребљена је анализа варијансе (ANOVA), параметарска или непараметарска (Kruskal-Wallis-ов тест) према утврђеној расподели података. Основни тестови поређења средњих вредности различитих подгрупа су били праћени одговарајућим post hoc тестовима (Tukey HSD за параметарску анализу, Mann-Whitney U test за непараметарску анализу). За анализу величине разлике резултати су приказани као процентуална разлика (%) у односу на контролне услове.

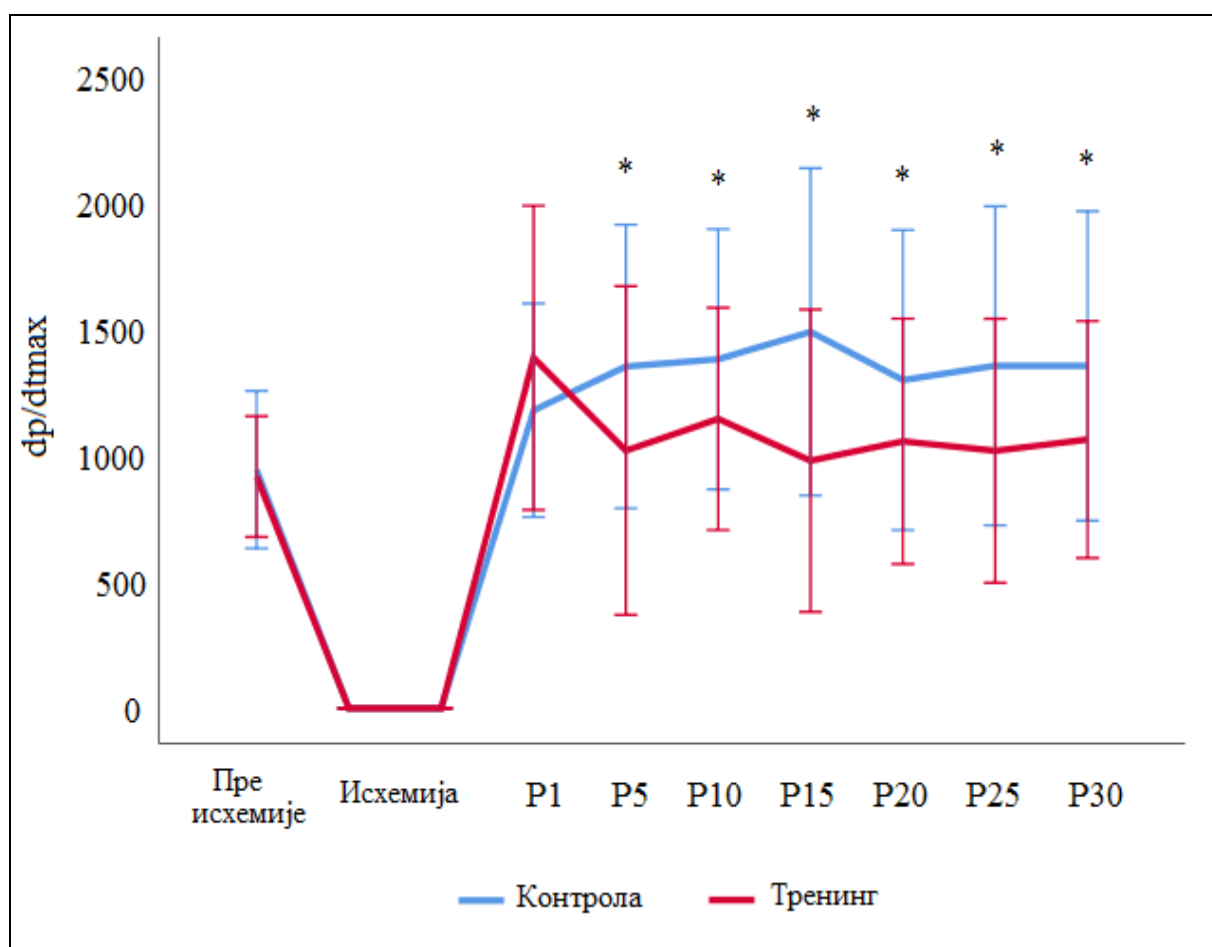
# РЕЗУЛТАТИ

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Кардиодинамски параметри

#### 4.1.1. Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања $dp/dt_{max}$

$dp/dt_{max}$  је била статистички значајно смањена у тренинг групи у поређењу са контролном групом у свим тачкама реперфузије ( $p < 0,05 = P5-P30$ ). Прекондиционирање миокарда физичком активношћу снижава овај параметар у односу на нетрениране животиње (Графикон бр. 1).



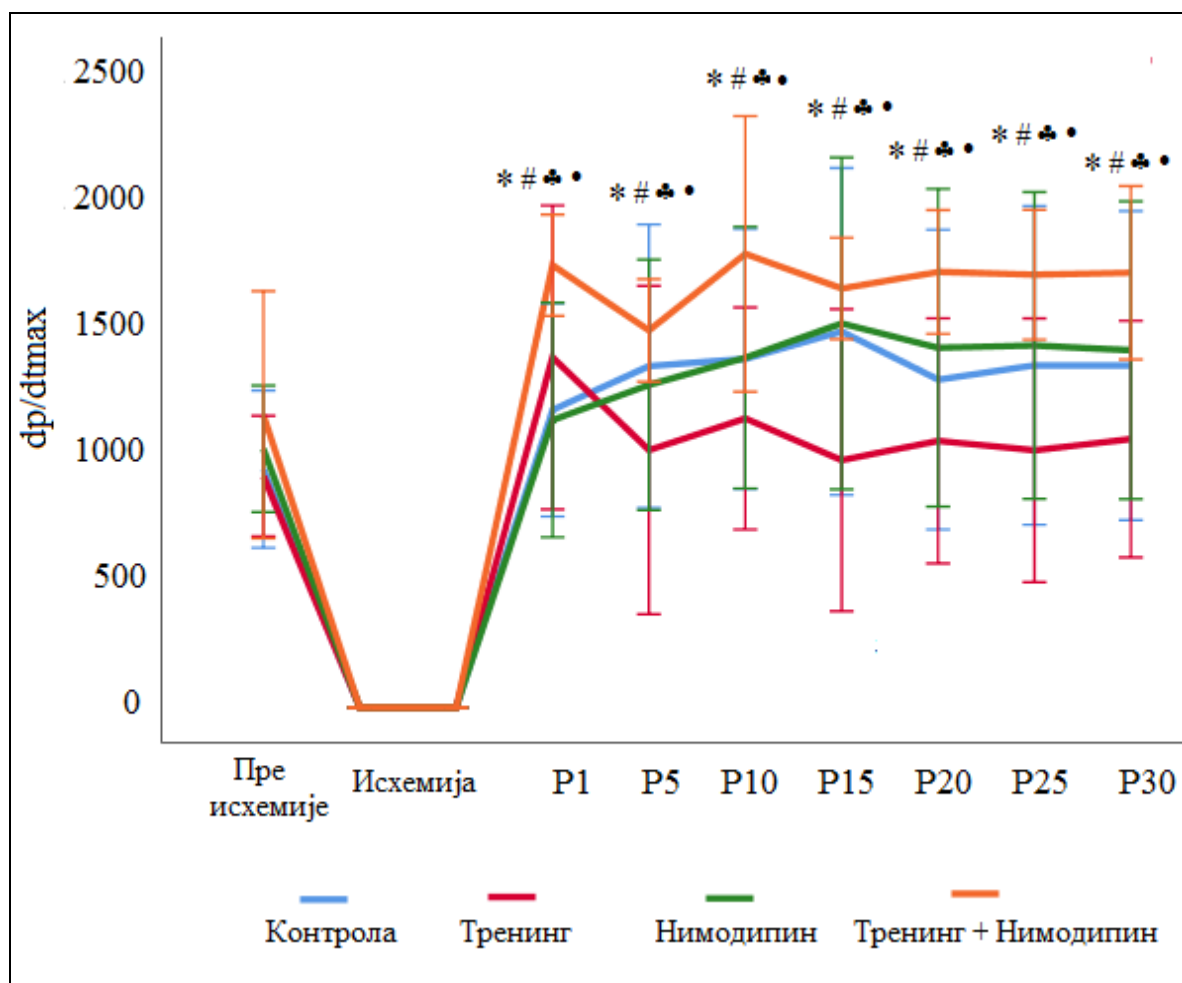
**Графикон бр. 1. Утицај прекондиционирања миокарда физичком активношћу на максималну стопу раста притиска у левој комори (mmHg/s)**

Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  средња стандардна грешка. Статистички значајна разлика у појединим тачкама реперфузије утврђена је Mann-Whitney U тестом

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

$dp/dt_{max}$  је била статистички значајно смањена у Тренинг групи у поређењу са Контролном и Нимодипин групом у свим тачкама реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P30$ ). Са друге

стране, прекондиционирање физичком активношћу у комбинацији са нимодипином (Тренинг+Нимодипин група) статистички значајно је повећала вредности овог параметра у односу на нетрениране животиње ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контролна, Нимодипин vs. Тренинг+Нимодипин) (Графикон бр. 2).



**Графикон бр. 2. Утицај прекондиционирања миокарда нимодипином на максималну стопу раста притиска у левој комори (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc)

\* $p < 0,05$  Тренинг група vs. Контролна група

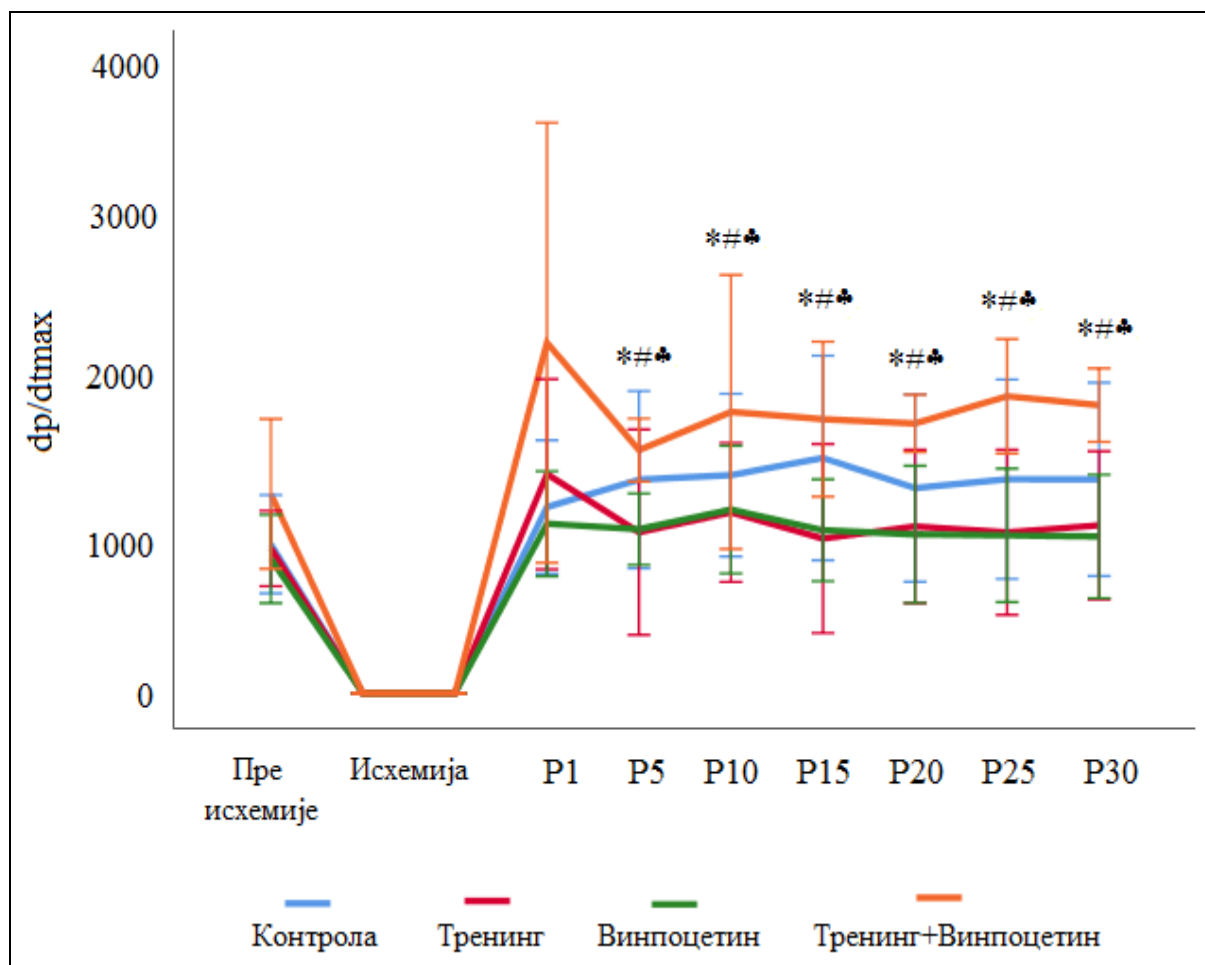
#  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Нимодипин група

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг + Нимодипин група,

●  $p < 0,05$  Нимодипин група vs. Тренинг + Нимодипин група.

Када је у питању примена винпоцетина, примећено је да је у оба случаја, прекондиционирање миокарда винпоцетином довело до статистички значајних разлика у односу на контролну групу тренираних и нетренираних пацова ( $p < 0,05 = P5-P30$  Винпоцетин, Тренинг+Винпоцетин vs. Контрола;  $p < 0,05 = P5-P30$  Тренинг+Винпоцетин

vs. Тренинг). Доминантно повишене вредности  $dp/dt_{max}$  имали су пацови прекондиционирани комбинацијом физичког тренинга и винпоцетина (Графикон бр.3).



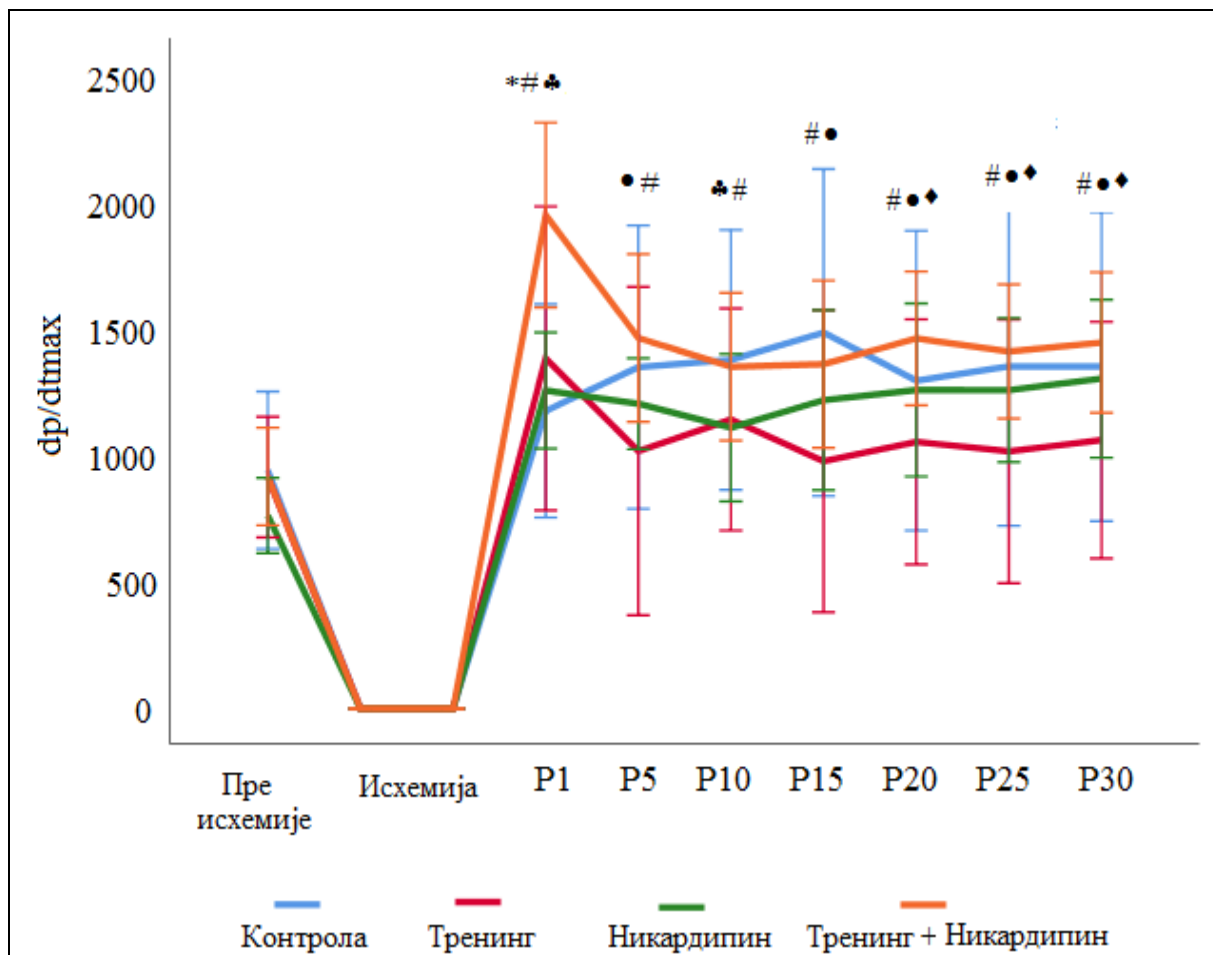
**Графикон бр. 3. Утицај прекондиционарања миокарда винпоцетином на максималну стопу раста притиска у левој комори (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc)

- \* $p < 0,05$  Винпоцетин група vs. Контролна група
- #  $p < 0,05$  Тренинг+Винпоцетин vs. Контролна група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг+Винпоцетин група vs. Тренинг група.

Никардипин је такође довео до статистички значајних промена динамике максималне стопе раста притиска у левој комори. У почетним минутима реперфузије, тренинг у комбинацији са никардипином је статистички значајно повећао вредности овог параметра у поређењу са Контролном, групом третираном само никардипином или само тренингом ( $p < 0,05 = P1$  Контрола, Тренинг група, Никардипин група vs.

Тренинг+Никардипин група;  $p < 0,05 = P5$  Контрола vs. Тренинг група; Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група). У другој половини реперфузије, тренинг доминантно снижава, а комбинација тренинга и никардипина значајно повећава вредности  $dp/dt_{max}$  ( $p < 0,05 = P10, P15$  Контрола, Тренинг+Никардипин група vs. Тренинг група, Никардипин група;  $p < 0,05 = P20-P30$  Тренинг vs. Контрола, Никардипин група, Тренинг+Никардипин група).



**Графикон бр. 4. Утицај прекондиционирања миокарда никардипином на максималну стопу раста притиска у левој комори (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc)

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Никардипин група.

#  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Никардипин група

♣  $p < 0,05$  Никардипин група vs. Тренинг+ Никардипин група

●  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група

◆  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Никардипин група

Анализом динамике промене главног параметра контрактилности,  $dp/dt_{max}$ -а, у свим групама, примећено је да је у групи Тренинг+Никардипин дошло до највеће промене контрактилности у поређењу са осталим групама (од +47,26 до 112,62 %), а затим у Тренинг+Винпоцетин групи (од +21,95 до 75,77%) и Никардипин групи (од +45,5 до 70,84%) у поређењу са вредностима овог параметра пре исхемије. Такође,

најинтезивније промене у свим групама догодиле су се у првим минутима реперфузије (P1, P5), одмах након завршетка глобалне исхемије (Табела 3).

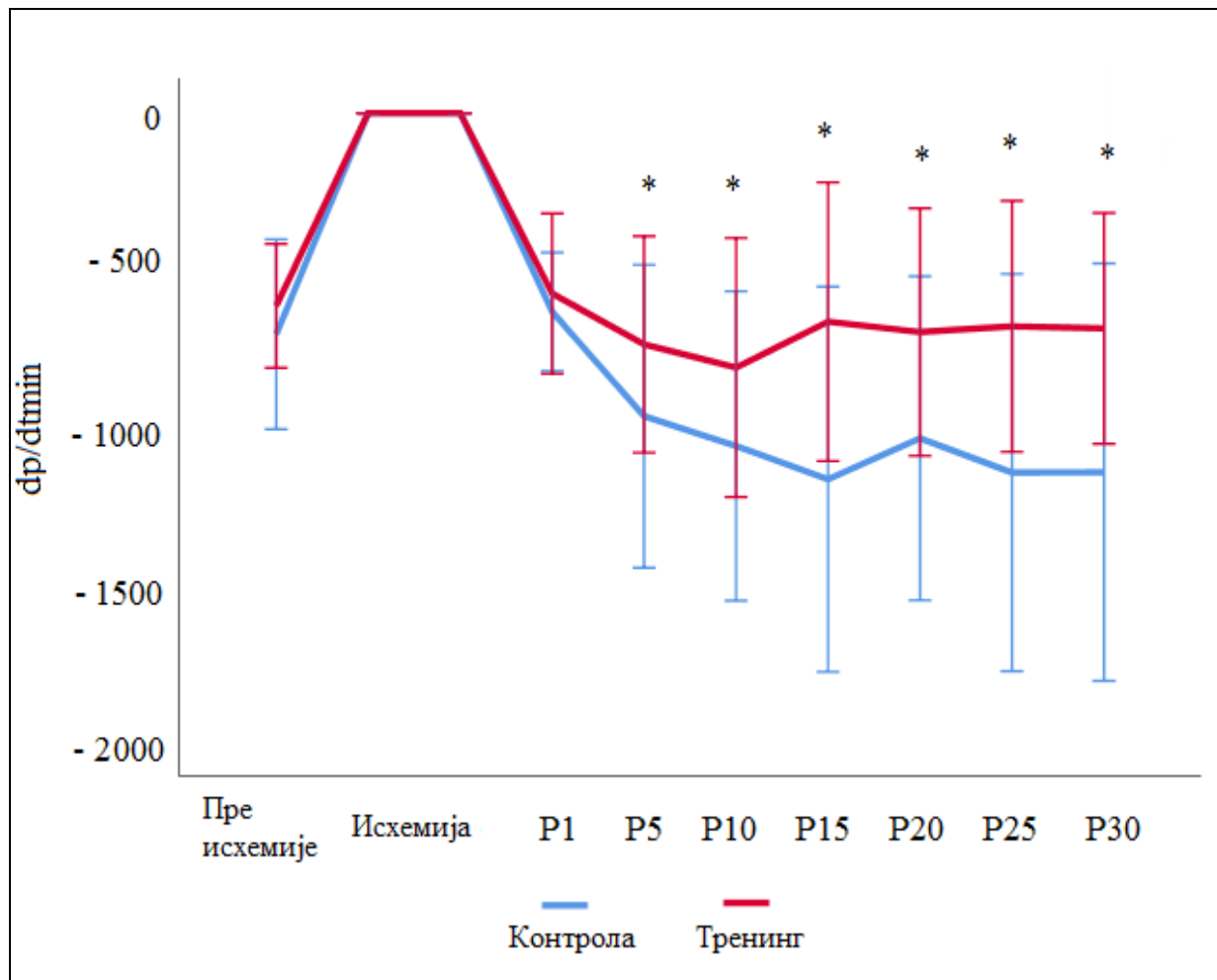
**Табела 3. Динамика промене максималне стопе раста притиска у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>P1</b>	<b>+24.87</b>	<b>+11.13</b>	<b>+26.22</b>	<b>+64.73</b>	<b>+51.31</b>	<b>+51.05</b>	<b>+75.77</b>	<b>+112.62</b>
<b>P5</b>	<b>+43.21</b>	<b>+24.66</b>	<b>+22.16</b>	<b>+57.87</b>	<b>+11.26</b>	<b>+28.80</b>	<b>+21.95</b>	<b>+59.66</b>
<b>P10</b>	<b>+46.24</b>	<b>+35.20</b>	<b>+36.73</b>	<b>+45.50</b>	<b>+24.93</b>	<b>+54.91</b>	<b>+41.06</b>	<b>+47.26</b>
<b>P15</b>	<b>+57.72</b>	<b>+48.40</b>	<b>+21.35</b>	<b>+59.74</b>	<b>+6.88</b>	<b>+43.13</b>	<b>+37.44</b>	<b>+48.37</b>
<b>P20</b>	<b>+37.56</b>	<b>+39.02</b>	<b>+18.27</b>	<b>+65.00</b>	<b>+15.24</b>	<b>+48.77</b>	<b>+35.31</b>	<b>+59.48</b>
<b>P25</b>	<b>+43.50</b>	<b>+39.89</b>	<b>+17.59</b>	<b>+64.92</b>	<b>+11.14</b>	<b>+47.82</b>	<b>+48.92</b>	<b>+53.85</b>
<b>P30</b>	<b>+43.44</b>	<b>+38.04</b>	<b>+16.76</b>	<b>+70.84</b>	<b>+16.00</b>	<b>+48.48</b>	<b>+44.47</b>	<b>+57.70</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*

#### 4.1.2. Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања миокарда на $dp/dt_{min}$ изолованог срца пацова

$dp/dt_{min}$  је статистички значајно повишена у периоду реперфузије Тренинг групе у поређењу са Контролном групом ( $p < 0,05 = P5-P30$ ) (Графикон бр. 5)



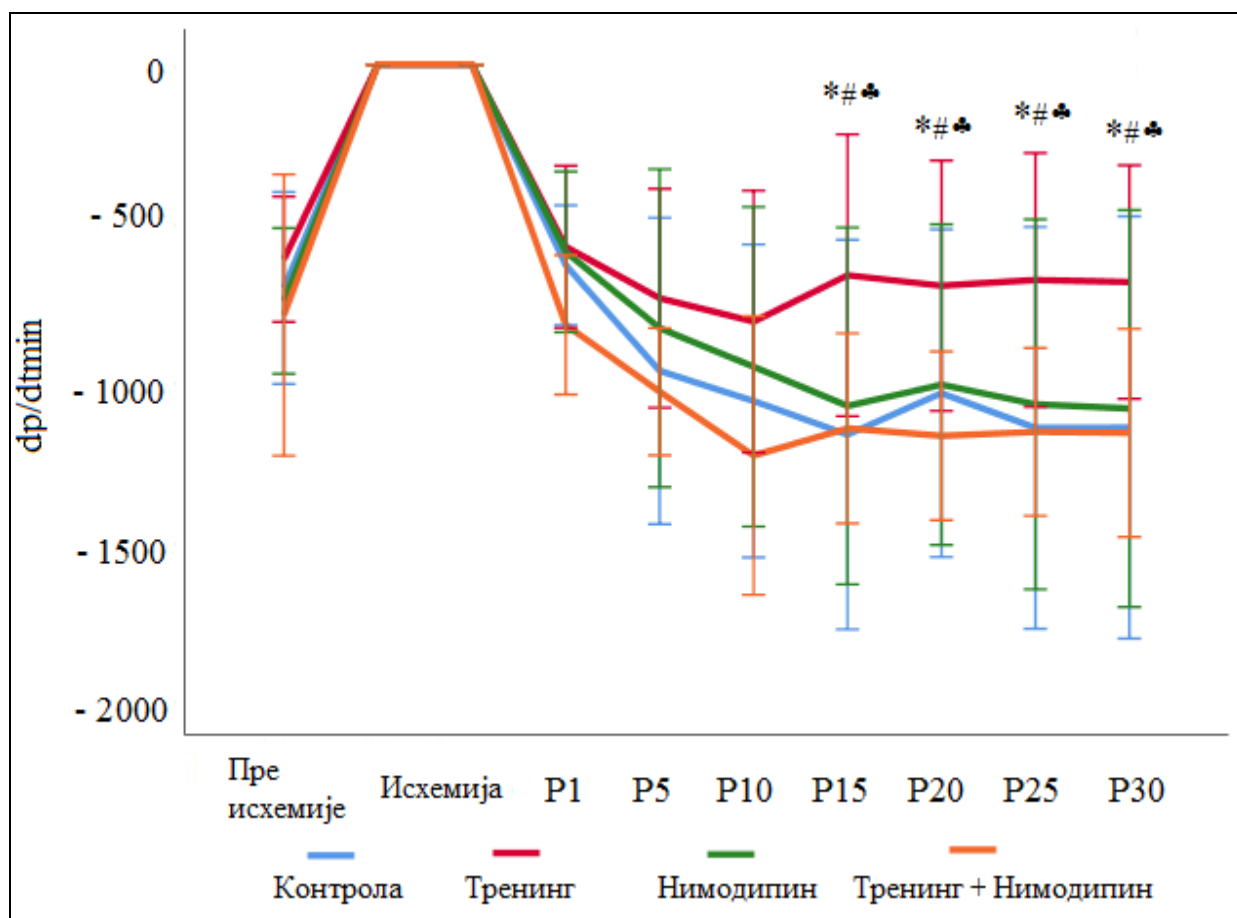
**Графикон бр. 5. Утицај прекондиционирања миокарда физичком активношћу на минималну стопу раста притиска у левој комори (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc)

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

$dp/dt_{min}$  је утврђено статистички значајно повишен у другој половини периода реперфузије у Тренинг групи у односу на остале групе ( $p < 0,05 = P15-P30$  Контрола, Нимодипин група, Тренинг+Нимодипин група vs. Тренинг група). Дакле, нимодипин самостално или у комбинацији са тренингом значајно снижава овај параметар контрактилности (Графикон бр. 6)





**Графикон бр. 6. Утицај прекондиционирања нимодипином на минималну стопу раста притиска у левој комори (mmHg/s)**

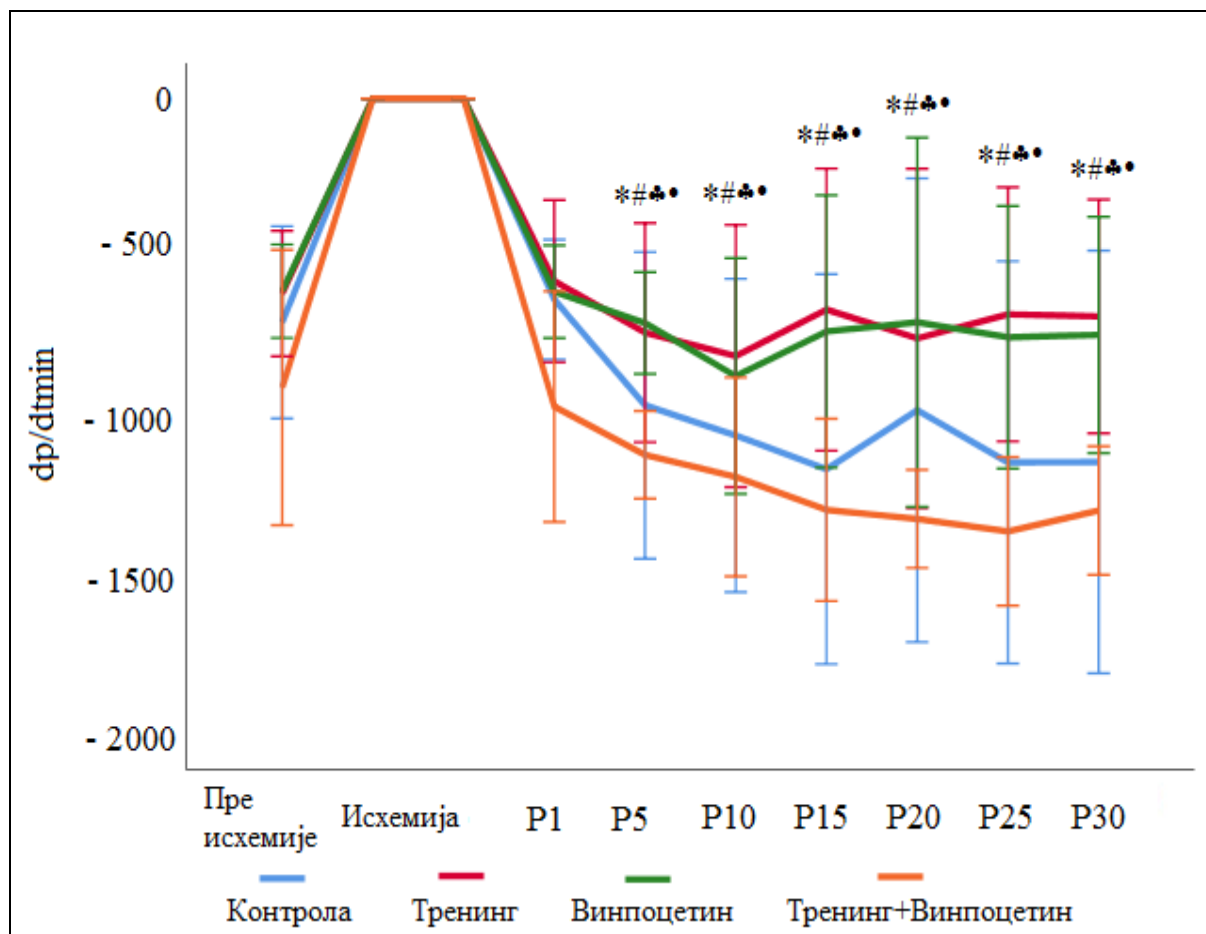
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc)

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Нимодипин група vs. Тренинг група,

♣  $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Тренинг група.

Утврђено је да је  $Dp/dt$  значајно снижен у скоро свим тачкама реперфузије у Контролној и групи Тренинг+Винпоцетин у односу на остале две групе ( $p < 0,05 = P5-P30$  Контрола, Тренинг+Винпоцетин група vs. Тренинг група, Винпоцетин група) (Графикон бр. 7)



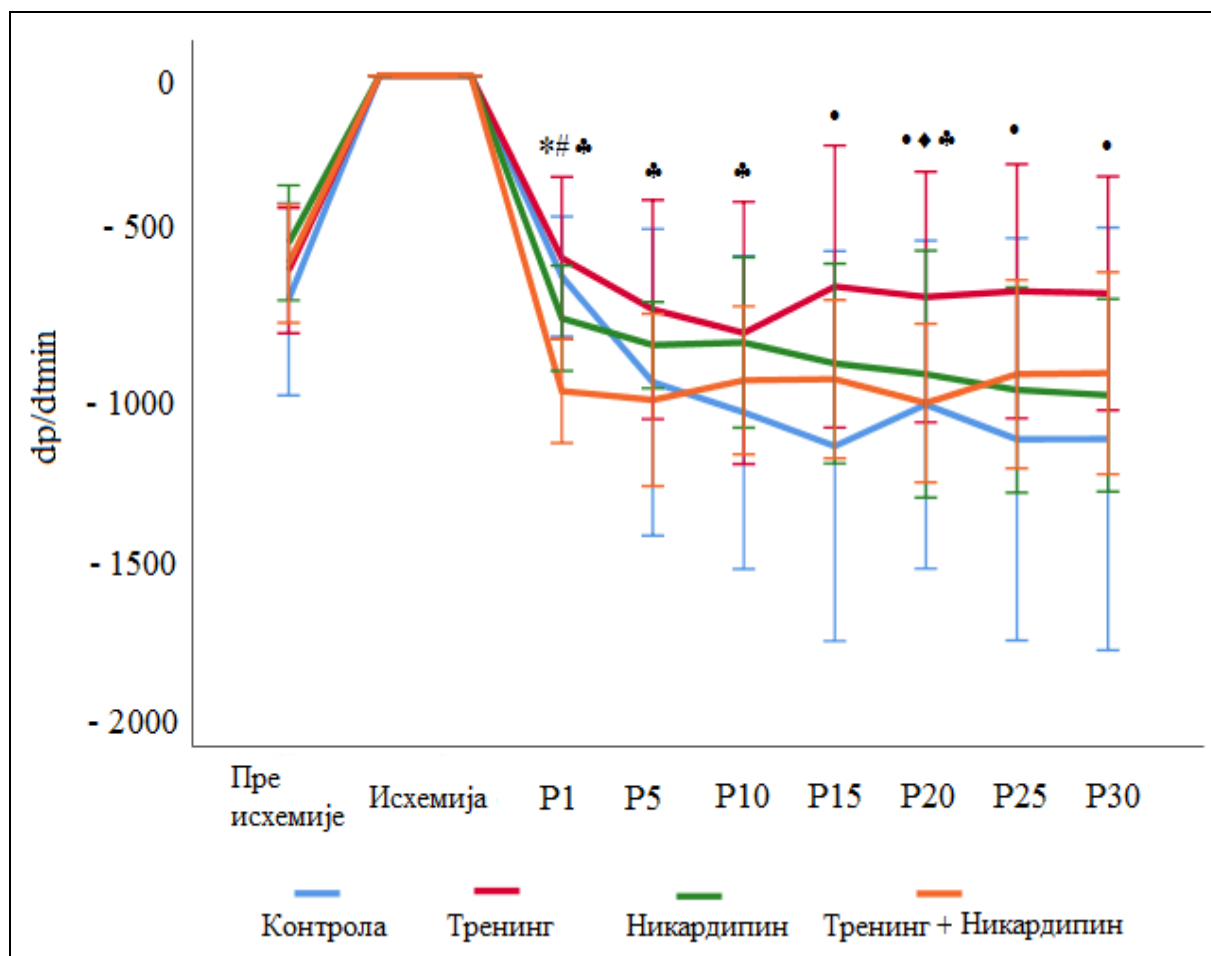
**Графикон бр. 7. Утицај прекондиционирања винпоцетином на минималну стопу раста притиска у левој комори (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc)

- \* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,
- #  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг+ Винпоцетин група vs. Тренинг група,
- $p < 0,05$  Тренинг+ Винпоцетин група vs. Винпоцетин група.

Никардипин је у поређењу са обе контролне групе (Контрола, Тренинг) довео до различитих промена у динамици овог параметра. У првим минутима реперфузије, најдоминантније промене изазива комбинација тренинга са никардипином (снижење), док у другој половини реперфузионог периода, самостално или у комбинацији са тренингом никардипин изазива смањење овог параметра у односу на трениране, а повишење у односу на нетрениране пацове ( $p < 0,05 = P1$  Контрола, Никардипин група, Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група;  $p < 0,05 = P5, P10$  Тренинг+Никардипин

група vs. Тренинг група;  $p < 0,05 = P15, P25, P30$  Контрола vs. Тренинг група;  $p < 0,05 = P20$  Контрола, Никардипин група, Тренинг +Никардипин група vs. Тренинг група) (Графикон бр. 8).



**Графикон бр. 8. Утицај прекондиционирања никардипином на минималну стопу раста притиска у левој комори (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc)

- \* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Никардипин група,
- #  $p < 0,05$  Никардипин група vs. Тренинг+ Никардипин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Никардипин група,
- $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група
- ♦  $p < 0,05$  Никардипин група vs. Тренинг група

Анализом динамике dp/dtmin-а у свим групама, примећено је да је у групама Тренинг+Никардипин и Никардипин дошло до највеће промене овог параметра контрактилности у поређењу са осталим групама (до 91,03 %) са вредностима овог параметра пре исхемије. Интересантно је да је прекондиционирање миокарда тренингом довело до минимизирања ефеката реперфузије на кардиодинамику и дошло је скоро до враћања вредности овог параметра на почетне вредности, односно на вредности пре исхемије. Примена инхибитора фосфодиестеразе 1 узроковала је у свим групама промену контрактилности у правцу повећања заштите срца (Табела 4).

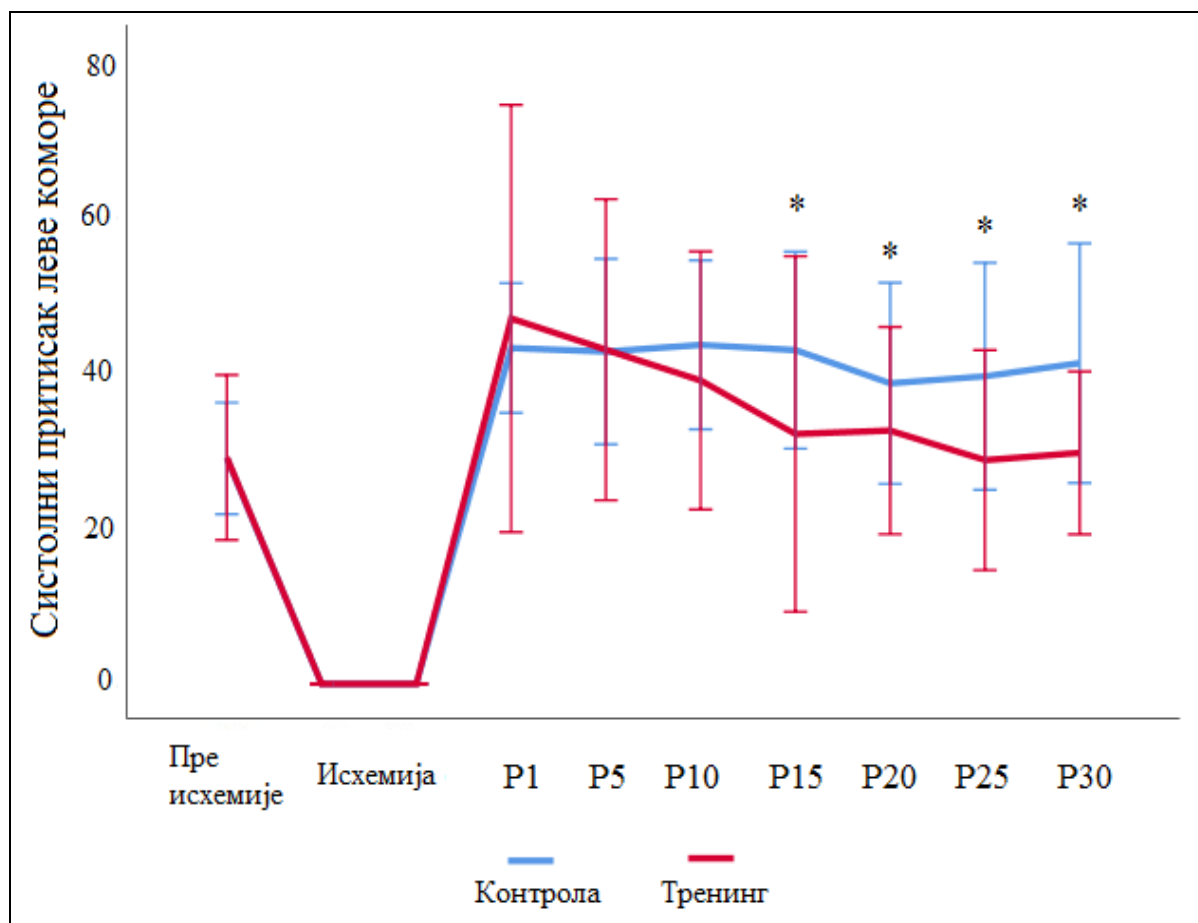
**Табела 4. Динамика промене минималне стопе раста притиска у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>P1</b>	<b>-10.14</b>	<b>-20.72</b>	<b>+0.27</b>	<b>+45.08</b>	<b>-6.38</b>	<b>+3.92</b>	<b>+6.61</b>	<b>+67.88</b>
<b>P5</b>	<b>+37.08</b>	<b>+11.49</b>	<b>+16.50</b>	<b>+61.08</b>	<b>+20.00</b>	<b>+30.57</b>	<b>+23.28</b>	<b>+72.58</b>
<b>P10</b>	<b>+50.53</b>	<b>+27.81</b>	<b>+44.01</b>	<b>+59.58</b>	<b>+32.03</b>	<b>+56.02</b>	<b>+30.91</b>	<b>+62.10</b>
<b>P15</b>	<b>+65.57</b>	<b>+44.36</b>	<b>+20.88</b>	<b>+72.11</b>	<b>+8.24</b>	<b>+45.20</b>	<b>+42.31</b>	<b>+61.52</b>
<b>P20</b>	<b>+47.05</b>	<b>+35.37</b>	<b>+24.94</b>	<b>+78.45</b>	<b>+13.59</b>	<b>+48.19</b>	<b>+45.44</b>	<b>+74.21</b>
<b>P25</b>	<b>+62.55</b>	<b>+43.69</b>	<b>+23.89</b>	<b>+87.88</b>	<b>+10.66</b>	<b>+46.60</b>	<b>+49.75</b>	<b>+58.85</b>
<b>P30</b>	<b>+62.37</b>	<b>+45.48</b>	<b>+22.67</b>	<b>+91.03</b>	<b>+11.68</b>	<b>+47.00</b>	<b>+42.53</b>	<b>+58.33</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*

#### 4.1.3. Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања миокарда SLVP изолованог срца пацова

Систолни притисак леве коморе (СПЛК) је био статистички значајно снижен у групи која је била прекондиционирана тренингом у поређењу са контролном групом у другој половини периода реперфузије ( $p < 0,05 = P15-P30$  Контрола vs. Тренинг група) (Графикон бр. 9).

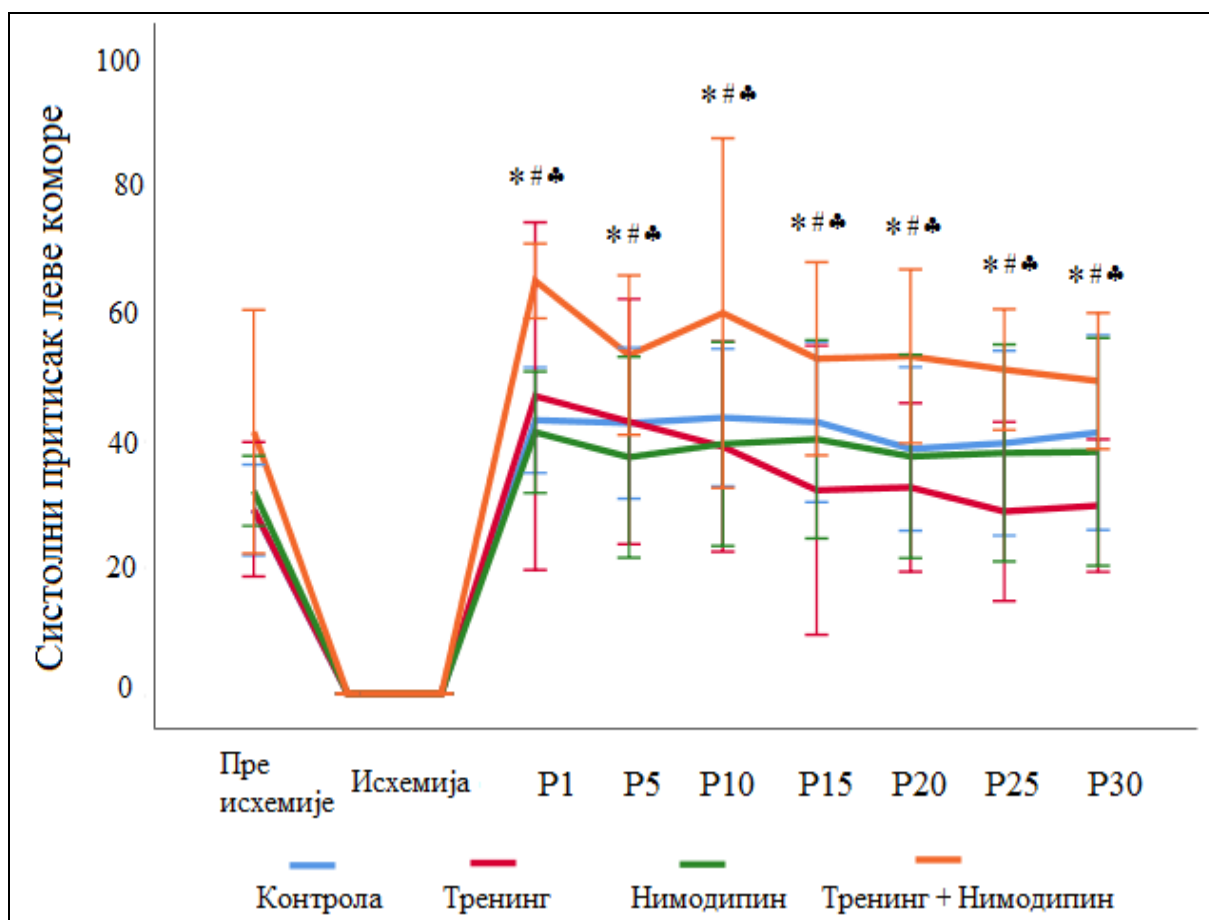


**Графикон бр. 9. Утицај прекондиционирања миокарда физичком активношћу на систолни притисак леве коморе (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је Ман-Витнеи тестом.

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Систолни притисак леве коморе (СПЛК) је био статистички значајно повишен у Тренинг+Нимодипин групи у поређењу са осталим групама у периоду реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола, Тренинг, Нимодипин vs. Тренинг+Нимодипин) (Графикон бр. 10).



**Графикон бр. 10. Утицај прекондиционирања миокарда нимодипином на систолни притисак леве коморе (mmHg/s)**

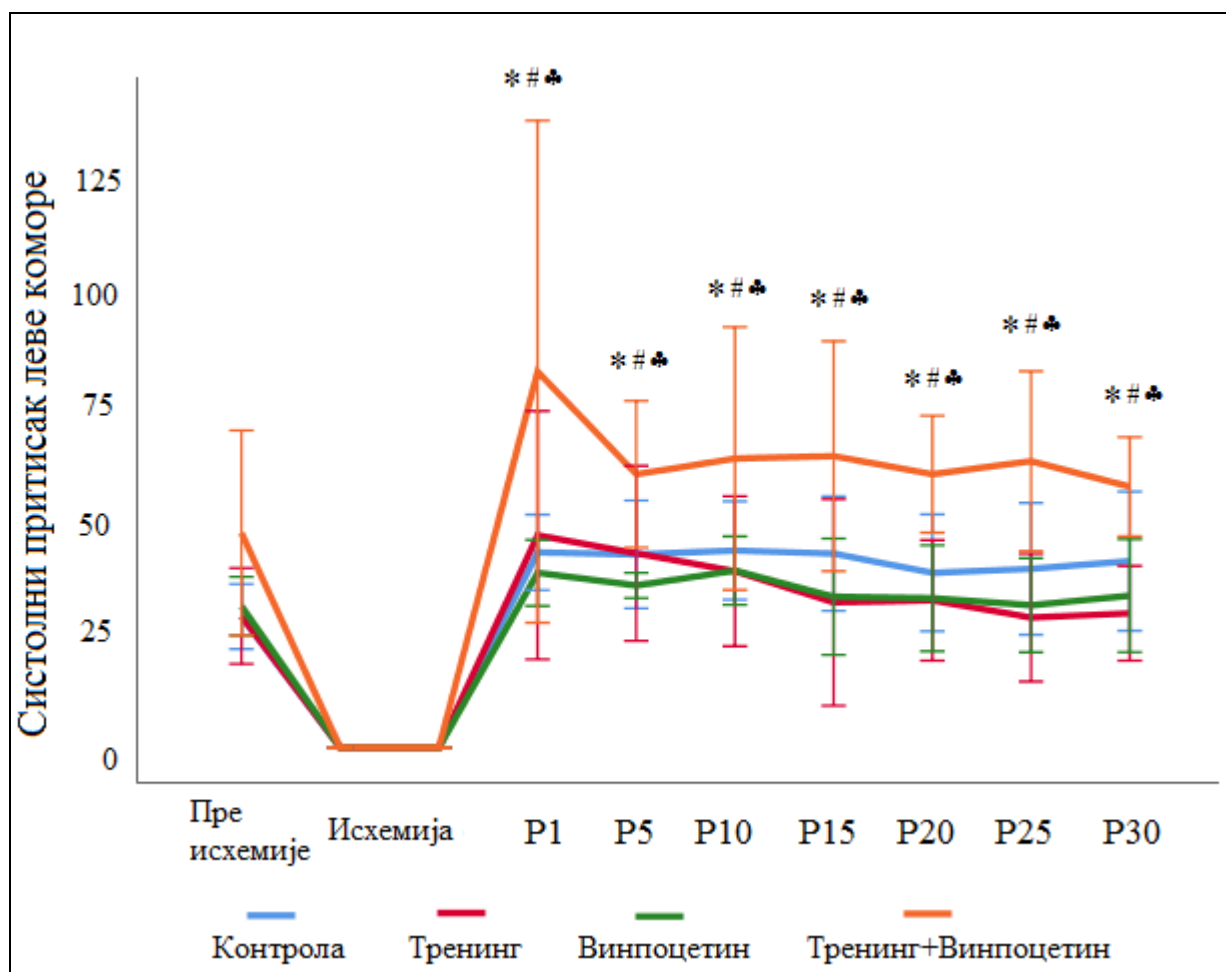
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+Нимодипин група,

#  $p < 0,05$ . Нимодипин група vs Тренинг+Нимодипин група,

♣  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група.

Систолни притисак леве коморе је био статистички значајно повишен у Тренинг+Винпоцетин групи у поређењу са осталим групама у периоду реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола, Тренинг група, Винпоцетин група vs. Тренинг+Винпоцетин група) (Графикон бр. 11).



**Графикон бр. 11. Утицај прекондиционирања миокарда винпоцетином на систолни притисак леве коморе (mmHg/s)**

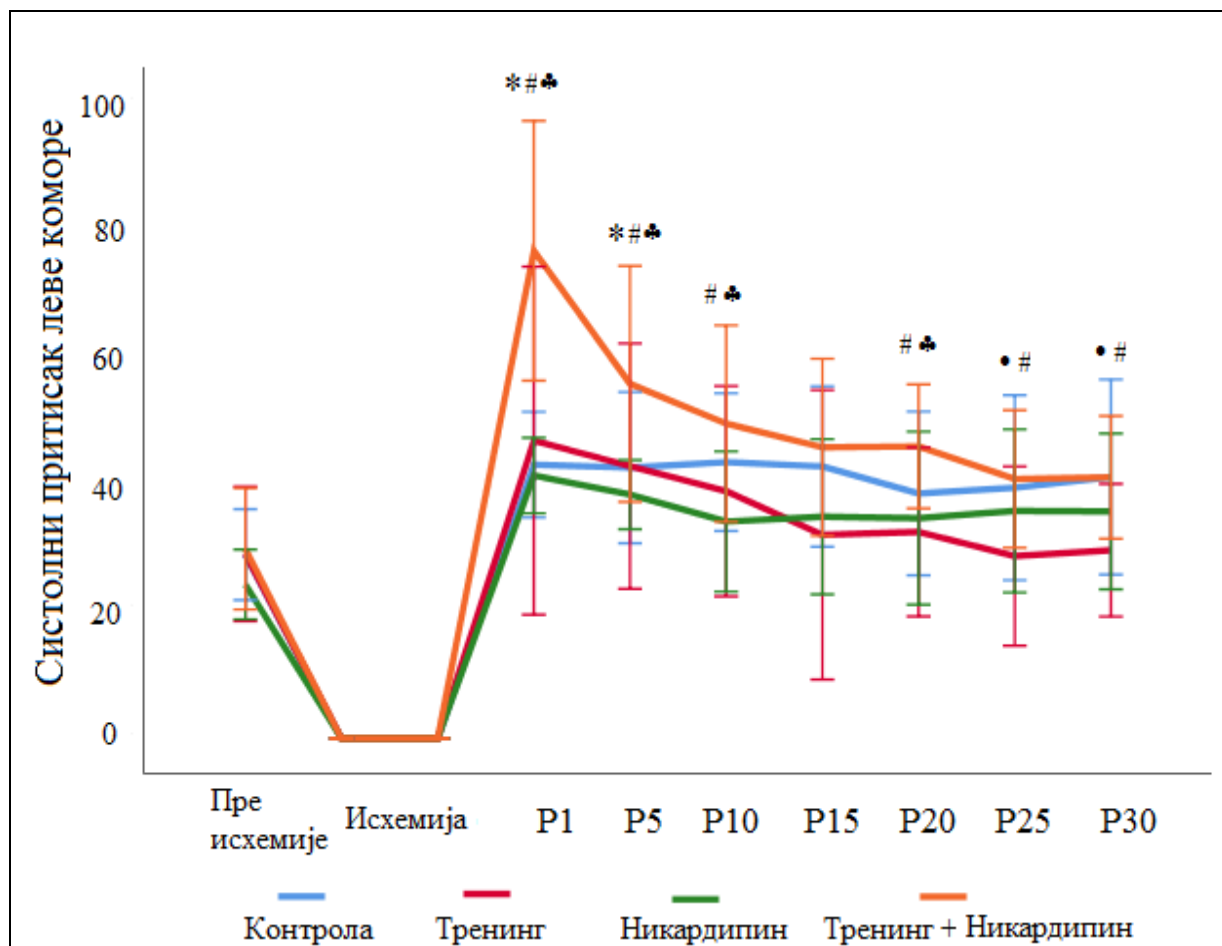
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+Винпоцетин група,

#  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Винпоцетин група vs. Тренинг+Винпоцетин група.

Систолни притисак леве коморе је био статистички значајно повишен у Тренинг+Никардипин групи у поређењу са осталим групама у почетним минутима периода реперфузије, док касније долази до опадања вредности овог параметра у поменутој групи, као и до статистички значајног пада у Тренинг групи ( $p < 0,05 = P1, P5$  Контрола, Тренинг група, Никардипин група vs. Тренинг+Никардипин група,  $p < 0,05 = P10-P20$  Тренинг група, Никардипин група vs. Тренинг+Никардипин група,  $p < 0,05 = P25, P30$  Контрола, Тренинг+Никардипин група vs. Тренинг група) (Графикон бр. 12).



**Графикон бр. 12. Утицај прекондиционирања миокарда никардипином на систолни притисак леве коморе (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

- \* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+Никардипин група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група,
- ♣  $p < 0,05$  Никардипин група vs. Тренинг+Никардипин група,
- $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Најизраженије промене систолног притиска примећене су у никардипин групама, у комбинацији са тренингом или без њега, док су најмање промене примећене у



винпоцетин групи у којој је динамика промене овог параметра врло слична динамици услед примене физичког тренинга. Сви тестирани инхибитори фосфодиестеразе су у комбинацији са физичким тренингом испољили најобимније промене у погледу систолног притиска леве коморе (Табела 5).

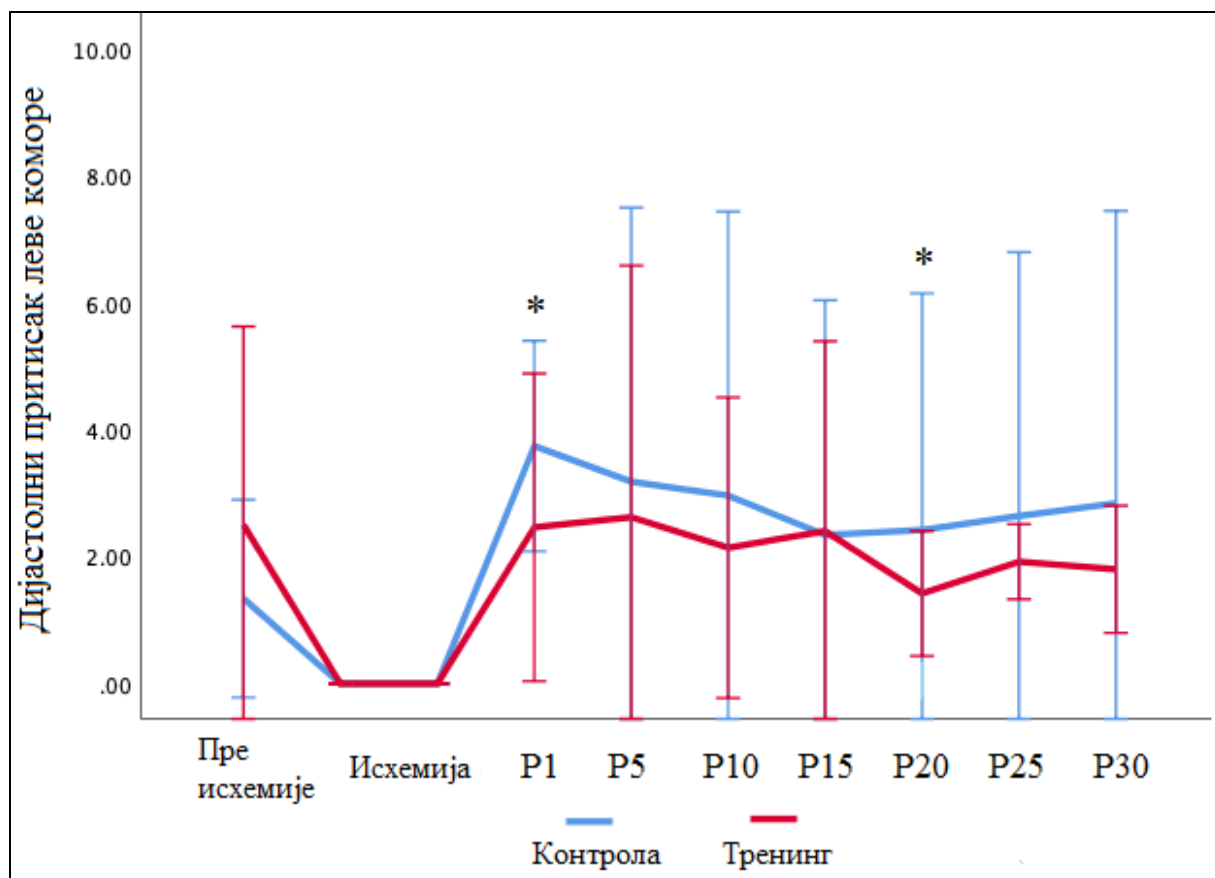
**Табела 5. Динамика промене систолног притиска у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>P1</b>	<b>+48.93</b>	<b>+28.88</b>	<b>+23.46</b>	<b>+70.69</b>	<b>+61.34</b>	<b>+57.59</b>	<b>+75.11</b>	<b>+157.14</b>
<b>P5</b>	<b>+47.34</b>	<b>+16.60</b>	<b>+14.55</b>	<b>+58.30</b>	<b>+47.55</b>	<b>+29.26</b>	<b>+27.35</b>	<b>+86.92</b>
<b>P10</b>	<b>+50.31</b>	<b>+23.12</b>	<b>+25.06</b>	<b>+40.79</b>	<b>+33.98</b>	<b>+45.32</b>	<b>+34.66</b>	<b>+66.00</b>
<b>P15</b>	<b>+47.96</b>	<b>+25.44</b>	<b>+6.60</b>	<b>+43.93</b>	<b>+10.34</b>	<b>+27.90</b>	<b>+35.76</b>	<b>+53.52</b>
<b>P20</b>	<b>+33.29</b>	<b>+16.98</b>	<b>+5.51</b>	<b>+43.02</b>	<b>+11.85</b>	<b>+28.82</b>	<b>+27.39</b>	<b>+53.99</b>
<b>P25</b>	<b>+36.40</b>	<b>+18.67</b>	<b>+0.64</b>	<b>+47.73</b>	<b>-1.17</b>	<b>+23.75</b>	<b>+33.39</b>	<b>+36.82</b>
<b>P30</b>	<b>+42.21</b>	<b>+19.24</b>	<b>+7.37</b>	<b>+47.34</b>	<b>+2.00</b>	<b>+19.36</b>	<b>+21.51</b>	<b>+37.69</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*

#### 4.1.4. Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на DLVP изолованог срца пацова

Дијастолни притисак леве коморе (ДПЛК) је статистички значајно промењен у P1 и P20 тачкама, и то статистички значајним снижењем у Тренинг групи у поређењу са Контролном групом ( $p < 0,05 = P1, P20$  Контролна vs. Тренинг група) (Графикон бр. 13).

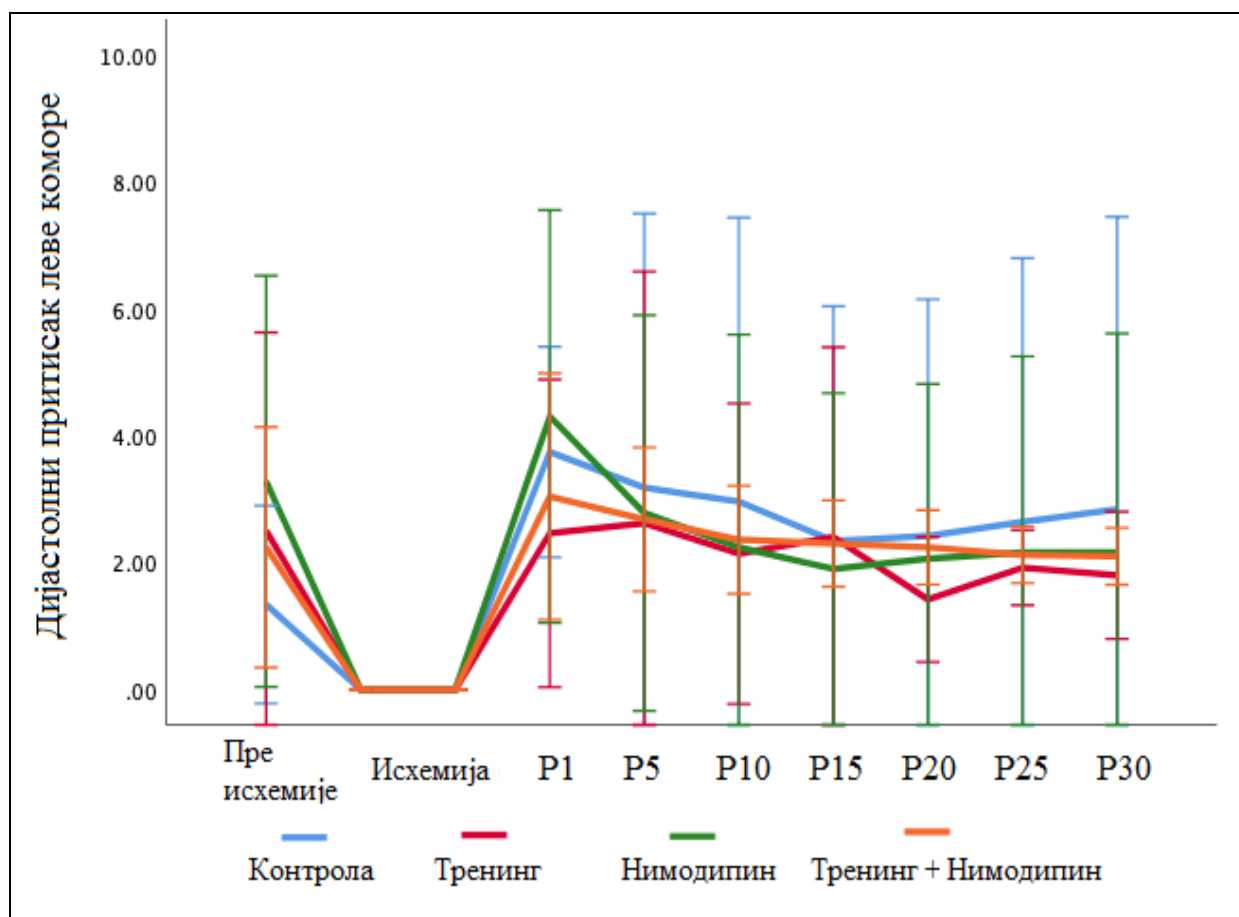


Графикон бр. 13. Утицај прекондиционирања миокарда физичким тренингом на дијастолни притисак леве коморе (mmHg/s)

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је Mann-Whitney тестом.

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

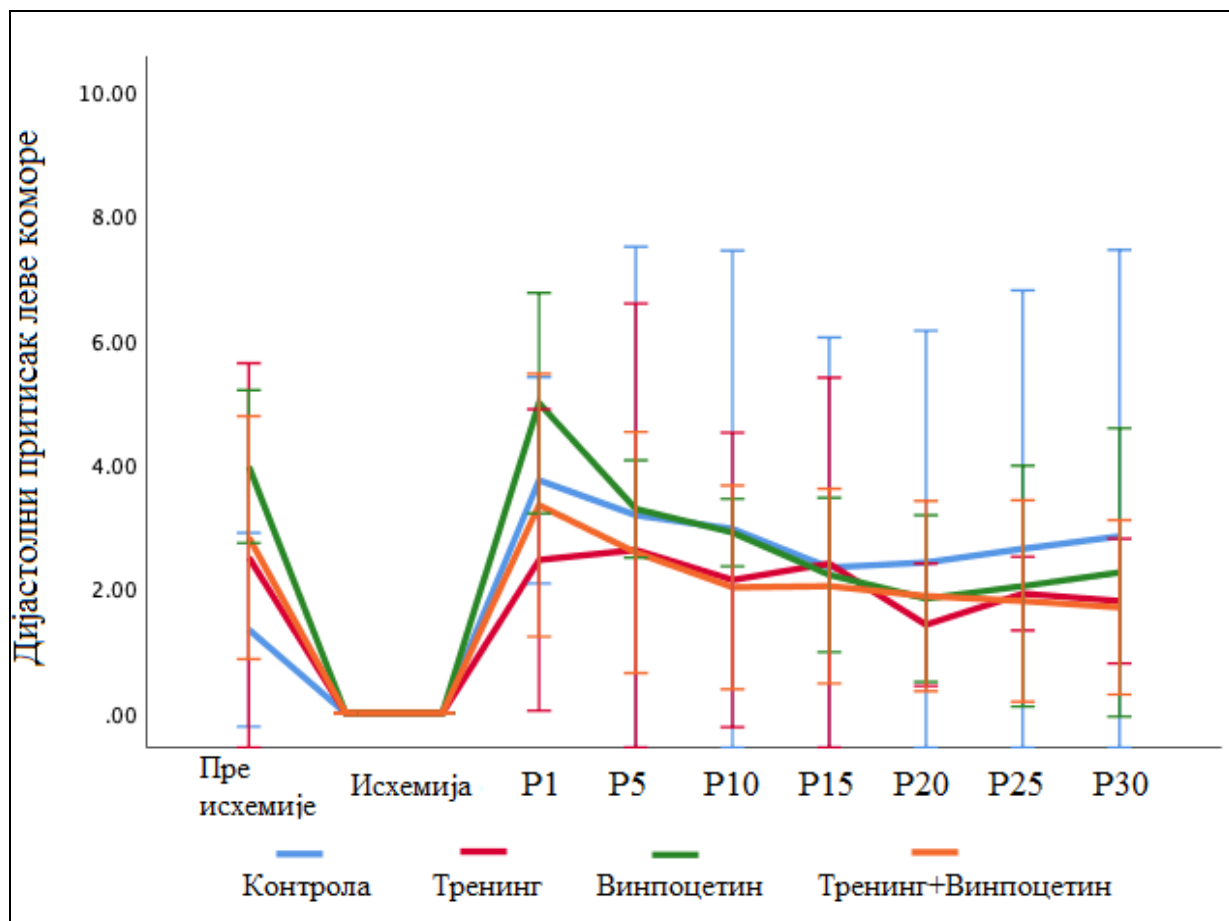
Примена нимодипина није довела до статистички значајних промена дијастолног притиска леве коморе (Графикон бр. 14).



**Графикон бр. 14. Утицај прекондиционарања миокарда нимодипином на дијастолни притисак леве коморе (mmHg/s)**

*Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).*

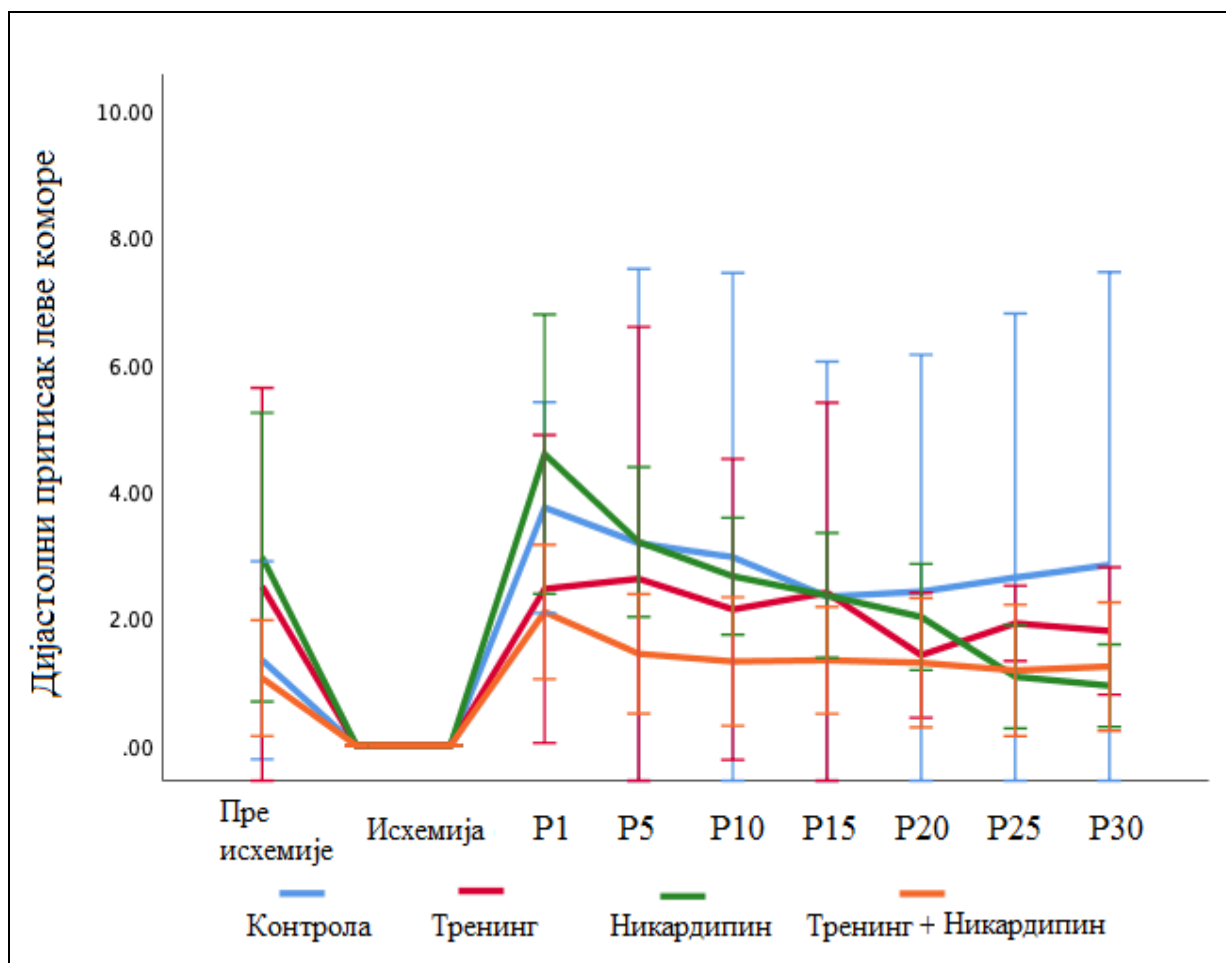
Примена винпоцетина није довела до статистички значајних промена дијастолног притиска леве коморе (Графикон бр. 15).



**Графикон бр. 15. Утицај прекондиционирања миокарда винпоцетином на дијастолни притисак леве коморе (mmHg/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

Примена никардпина није довела до статистички значајних промена дијастолног притиска леве коморе (Графикон бр. 16).



Графикон бр. 16. Утицај прекондиционирања никардипином на дијастолни притисак леве коморе (mmHg/s)

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

Анализом динамике дијастолног притиска леве коморе у свим групама у периоду реперфузије у односу на период пре исхемије, примећена је велика варијабилност

вредности овог параметра. Тачније, у односу на почетне вредности овог параметра унутар сваке групе, дошло је до процентуално изражених великих осцилација и нејасне динамике, од почетка до краја експеримента, што нас наводи на закључак да је значај овог параметра дискутабилан у овом случају (Табела 6).

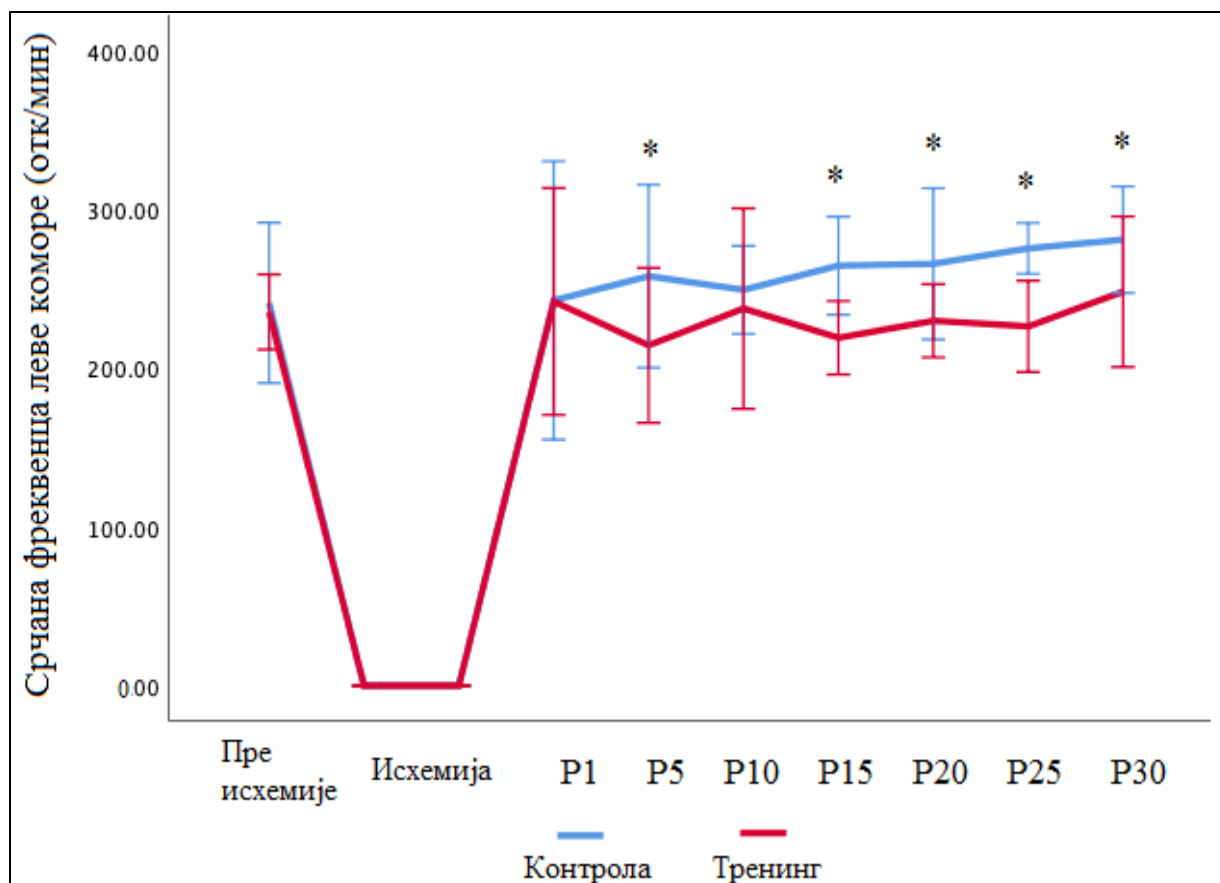
**Табела 6. Динамика промене дијастолног притиска у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>P1</b>	<b>+179.10</b>	<b>+31.10</b>	<b>+25.76</b>	<b>+54.73</b>	<b>-1.60</b>	<b>+35.71</b>	<b>+18.44</b>	<b>+98.11</b>
<b>P5</b>	<b>+137.31</b>	<b>-15.24</b>	<b>-17.17</b>	<b>+8.11</b>	<b>+4.80</b>	<b>+19.64</b>	<b>-8.51</b>	<b>+35.85</b>
<b>P10</b>	<b>+120.90</b>	<b>-31.71</b>	<b>-26.77</b>	<b>-10.14</b>	<b>-14.40</b>	<b>+5.36</b>	<b>-28.37</b>	<b>+24.53</b>
<b>P15</b>	<b>+74.63</b>	<b>-42.07</b>	<b>-43.94</b>	<b>-20.27</b>	<b>-4.00</b>	<b>+2.68</b>	<b>-27.66</b>	<b>+26.42</b>
<b>P20</b>	<b>+80.60</b>	<b>-37.20</b>	<b>-53.54</b>	<b>-31.76</b>	<b>-43.20</b>	<b>0.00</b>	<b>-33.33</b>	<b>+22.64</b>
<b>P25</b>	<b>+97.01</b>	<b>-34.15</b>	<b>-48.48</b>	<b>-63.51</b>	<b>-23.20</b>	<b>-5.36</b>	<b>-36.17</b>	<b>+11.32</b>
<b>P30</b>	<b>+111.94</b>	<b>-34.15</b>	<b>-42.93</b>	<b>-68.24</b>	<b>-28.00</b>	<b>-6.25</b>	<b>-39.72</b>	<b>-16.98</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*

#### 4.1.5. Утицај прекондиционарања тренингом и фармаколошког прекондиционарања HR срца пацова

Срчана фреквенца је значајно статистички снижена у скоро свим тачкама реперфузије у Тренинг групи у поређењу са Контролном групом ( $p < 0,05 = P5, P15-P30$ ) (Графикон бр. 17).



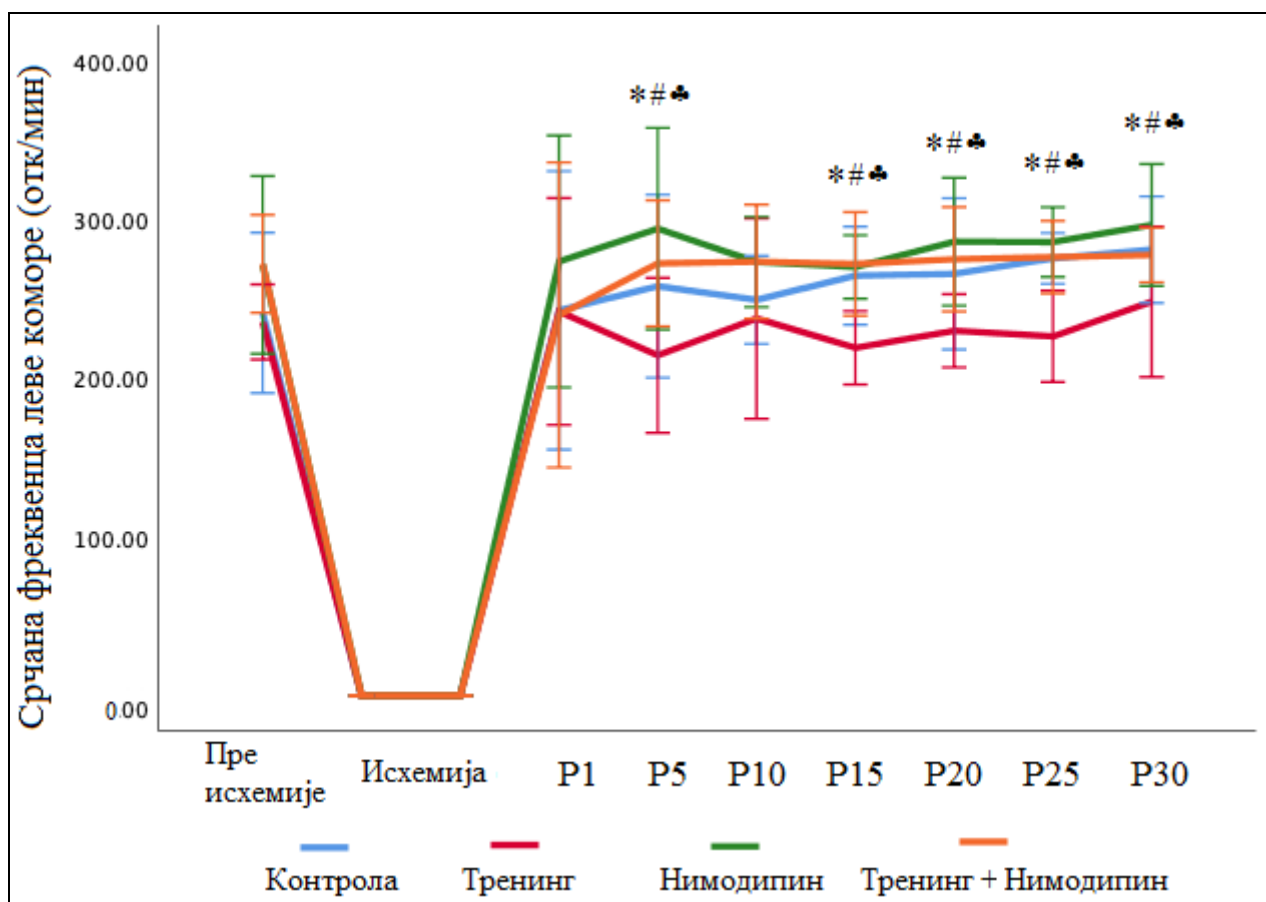
**Графикон бр. 17. Утицај прекондиционарања миокарда физичким тренингом на срчану фреквенцу леве коморе (отк/мин)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена Манн-Витнеј тестом.

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Примена нимодипина није довела до значајних разлика у срчаној фреквенци у поређењу са Контролном групом, али у поређењу са Тренинг групом, вредности у

Нимодипин групама, као и у Контролној групи су биле статистички значајно више у скоро свим тачкама реперфузије ( $p < 0,05 = P5, P15-P30$  Контрола, Нимодипин група, Тренинг+Нимодипин група vs. Тренинг група) (Графикон бр. 18).



**Графикон бр. 18. Утицај преконачионирања миокарда нимодипином на срчану фреквенцу леве коморе (отк/мин)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

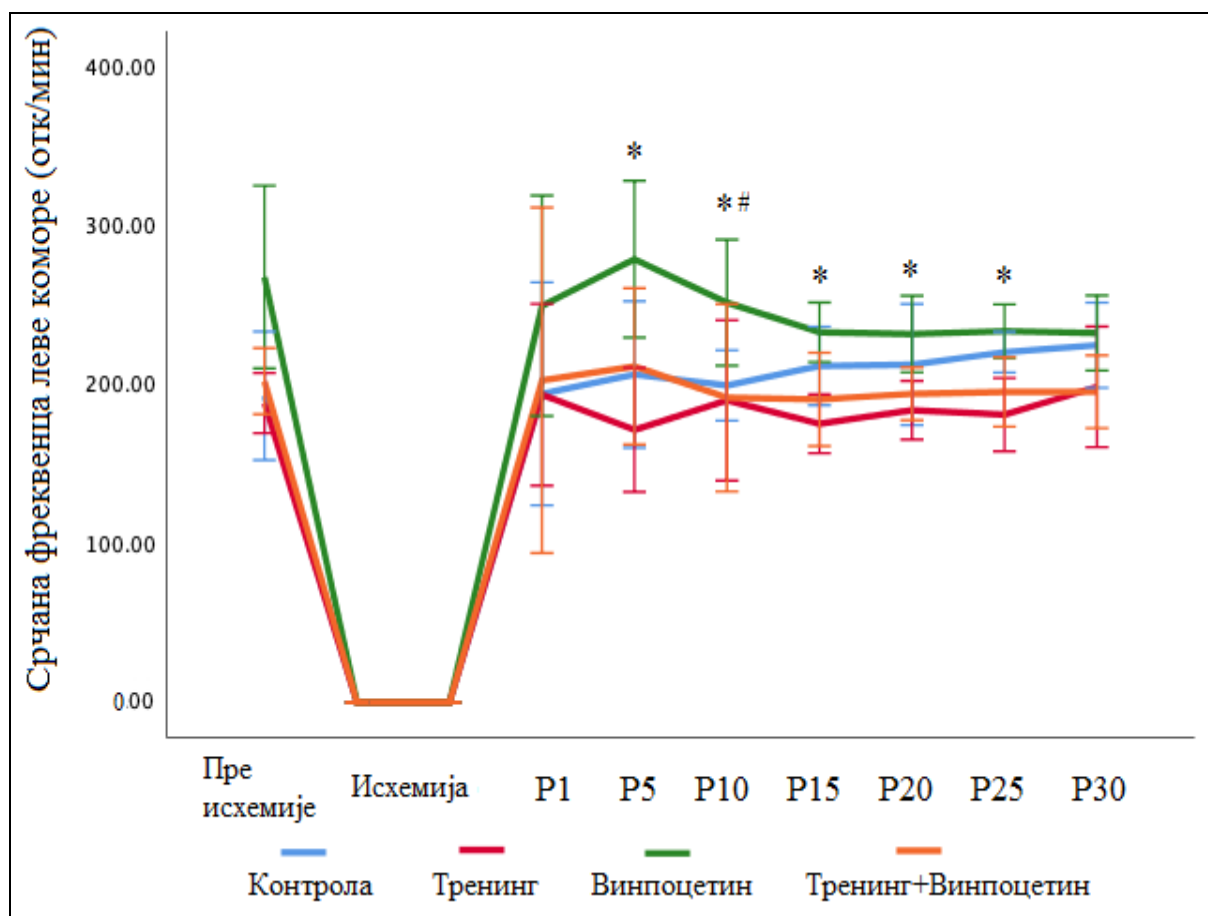
#  $p < 0,05$  Нимодипин група vs. Тренинг група,

♣  $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Тренинг група.

Примена винпоцетина је довела до значајних разлика у срочној фреквенци у поређењу са Тренинг и Тренинг+Винпоцетин групама, у смислу повећања ( $p < 0,05 = P5-$



P25 Тренинг група vs. Винпоцетин група,  $p < 0,05 = P10$  Тренинг група+Винпоцетин група vs. Винпоцетин група) (Графикон бр. 19).



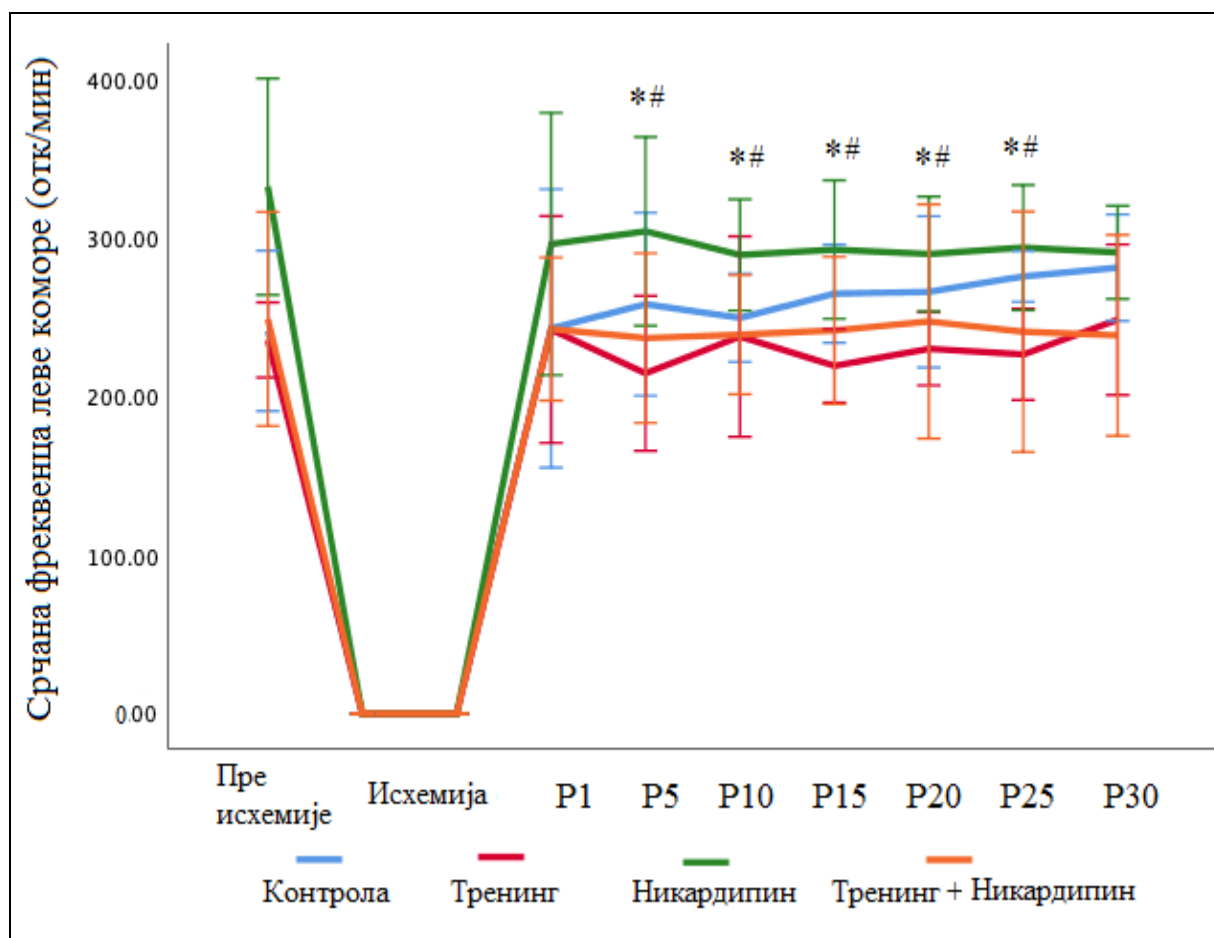
**Графикон бр. 19. Утицај преконачионирања винпоцетиниом на срчану фреквенцу леве коморе (отк/мин)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Тренинг група vs. Винпоцетин група,

#  $p < 0,05$  Тренинг+ Винпоцетин група vs. Винпоцетин група,

Примена тренинга и комбинације тренинга и никардипина је значајно смањила срчану фреквенцу у поређењу са групом која је примала никардипин ( $p < 0,05 = P5-P25$ ) (Графикон бр. 20).



**Графикон бр. 20. Утицај прекондиционирања миокарда никардипином на срчану фреквенцу леве коморе (отк/мин)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Тренинг група vs. Никардипин група,

#  $p < 0,05$  Тренинг+ Никардипин група vs. Никардипин група.

Процентуалном анализом промене срчане фреквенце унутар сваке групе појединачно одузимањем вредности у реперфузији од почетних вредности пре исхемије, примећен је највећи утицај примене никардипина на промене у реперфузији. Винпоцетин такође показује тенденцију смањивања фреквенце, али у другом делу реперфузије. Физички тренинг је изгледа минимизирао поменуте промене инхибитора PDE1 (Табела 7).

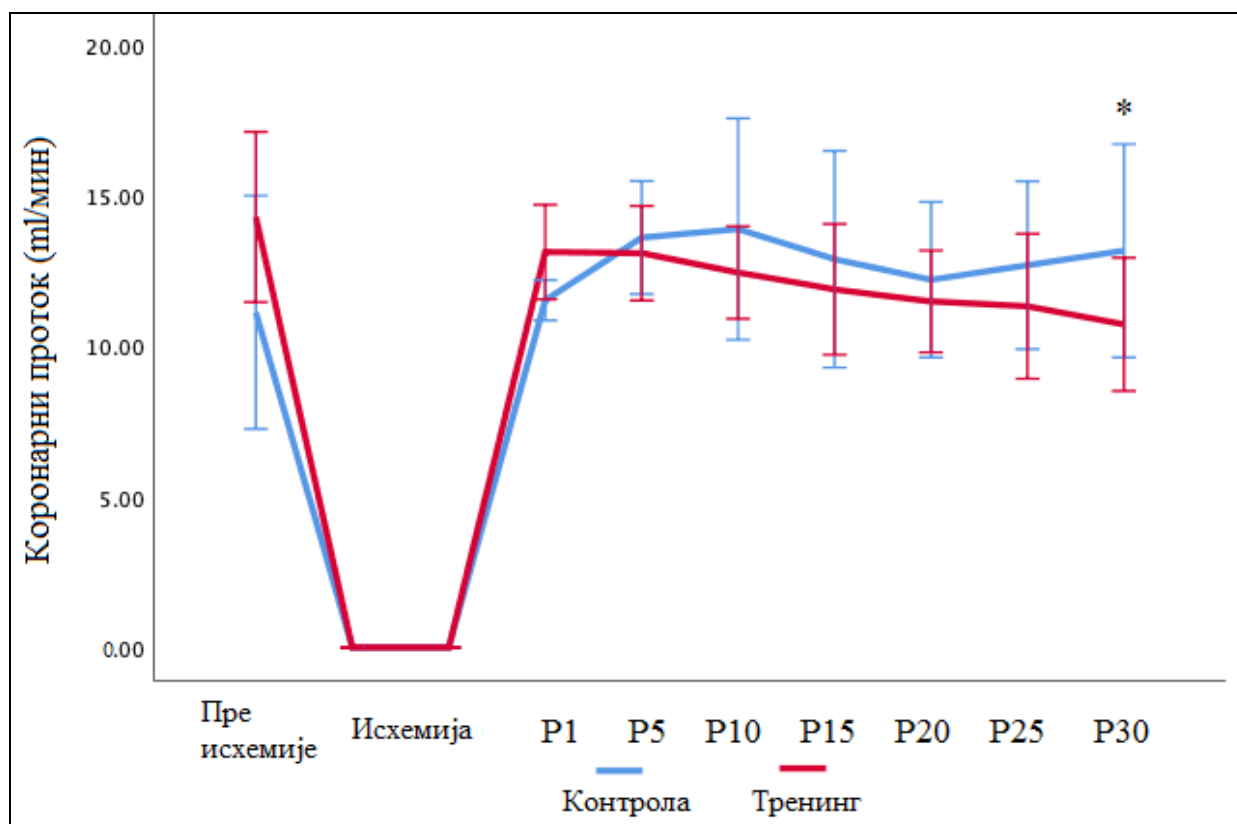
**Табела 7. Динамика промене срчане фреквенце у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>P1</b>	<b>+0.64</b>	<b>+0.79</b>	<b>-6.76</b>	<b>-10.88</b>	<b>+2.79</b>	<b>-11.86</b>	<b>+0.28</b>	<b>-2.54</b>
<b>P5</b>	<b>+6.96</b>	<b>+8.40</b>	<b>+4.19</b>	<b>-8.47</b>	<b>-8.93</b>	<b>+0.08</b>	<b>+4.61</b>	<b>-4.84</b>
<b>P10</b>	<b>+3.39</b>	<b>+0.66</b>	<b>-6.03</b>	<b>-12.96</b>	<b>+0.90</b>	<b>+0.48</b>	<b>-5.15</b>	<b>-3.98</b>
<b>P15</b>	<b>+9.73</b>	<b>-0.48</b>	<b>-12.98</b>	<b>-11.93</b>	<b>-6.92</b>	<b>-0.04</b>	<b>-5.67</b>	<b>-2.91</b>
<b>P20</b>	<b>+10.18</b>	<b>+5.38</b>	<b>-13.40</b>	<b>-12.78</b>	<b>-2.37</b>	<b>+1.04</b>	<b>-3.94</b>	<b>-0.64</b>
<b>P25</b>	<b>+14.23</b>	<b>+5.29</b>	<b>-12.74</b>	<b>-11.57</b>	<b>-3.87</b>	<b>+1.53</b>	<b>-3.34</b>	<b>-3.24</b>
<b>P30</b>	<b>+16.50</b>	<b>+9.25</b>	<b>-13.16</b>	<b>-12.48</b>	<b>+5.41</b>	<b>+2.03</b>	<b>-3.30</b>	<b>-4.15</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*

#### 4.1.6. Утицај прекондиционарања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционарања на CF и коронарну циркулацију изолованог срца пацова

Коронарни проток је био статистички значајно снижен у последњој тачки реперфузије у тренинг групи у поређењу са групом без тренинга ( $p < 0,05 = P30$  Контрола vs. Тренинг група) (Графикон бр. 21).

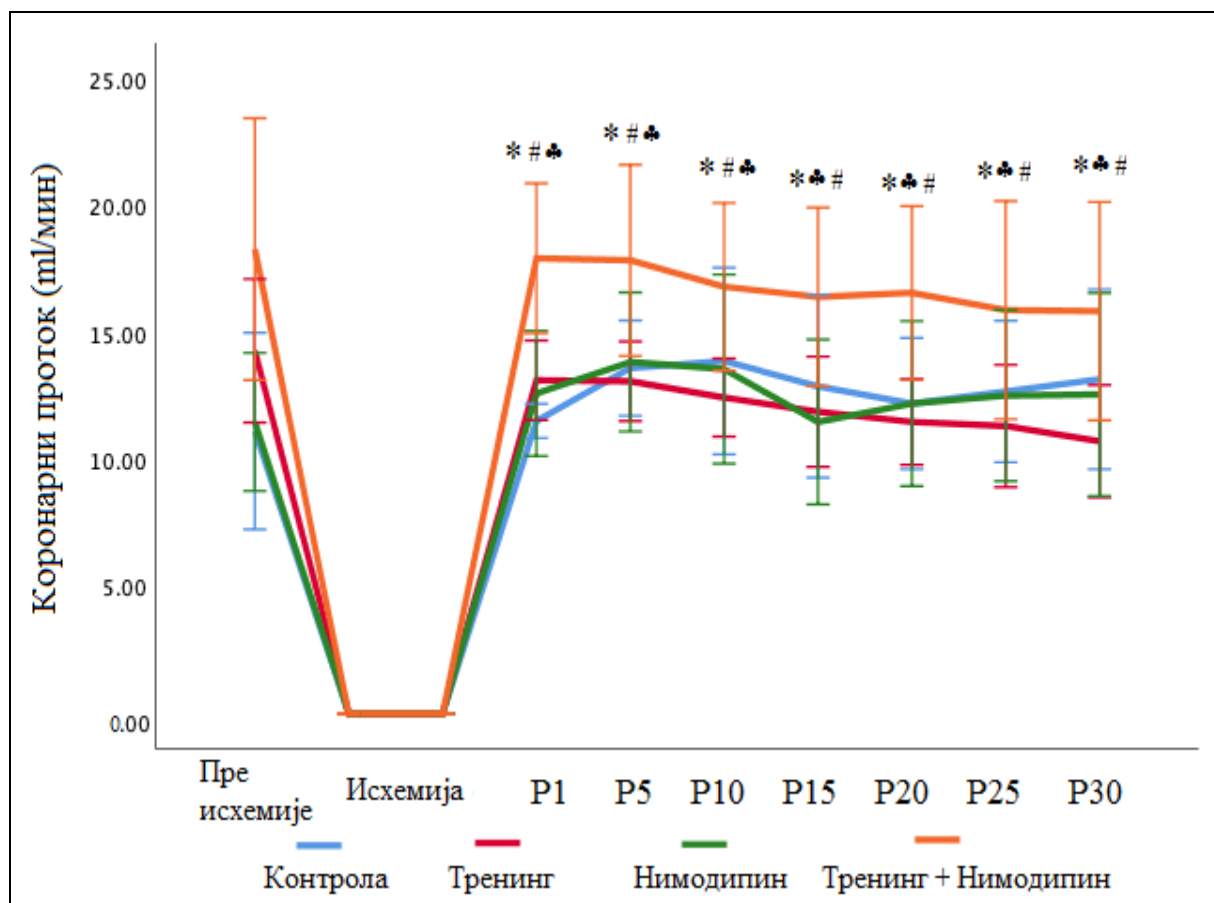


Графикон бр. 21. Утицај прекондиционарања физичким тренингом на коронарни проток (ml/min)

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена Mann-Whitney тестом.

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Комбинација нимодипина са тренингом је довела до статистички значајних повишења коронарног протока у реперфузији у односу на остале групе ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола, Тренинг група, Нимодипин група vs. Тренинг+Нимодипин група) (Графикон бр. 22).



**Графикон бр. 22. Утицај прекондиционирања миокарда нимодипином на коронарни проток (ml/min)**

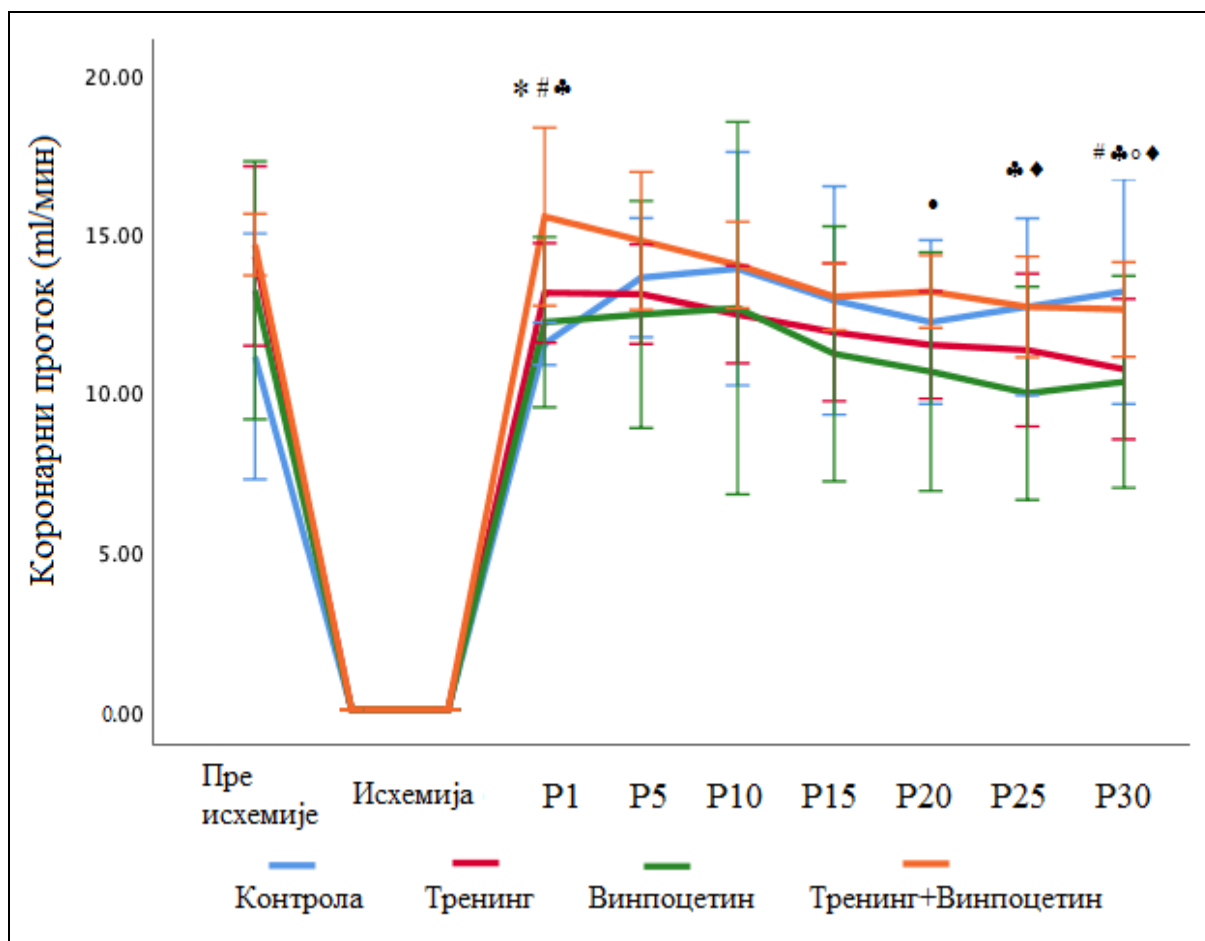
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Нимодипин група,

#  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Нимодипин група,

♣  $p < 0,05$  Нимодипин група vs. Тренинг+ Нимодипин група.

У зависности од тачке мерења, винпоцетин самостално или у комбинацији са тренингом изазвао је различите промене коронарног протока у реперфузији ( $p < 0,05 = P1$  Контрола, Тренинг група, Винпоцетин група vs. Тренинг+Винпоцетин група;  $p < 0,05 = P20$  Тренинг група vs. Винпоцетин група;  $p < 0,05 = P25$  Тренинг+ Винпоцетин група, Контрола vs. Винпоцетин група;  $p < 0,05 = P30$  Тренинг+Винпоцетин група, Контрола vs. Тренинг група, Винпоцетин група) (Графикон бр. 23).

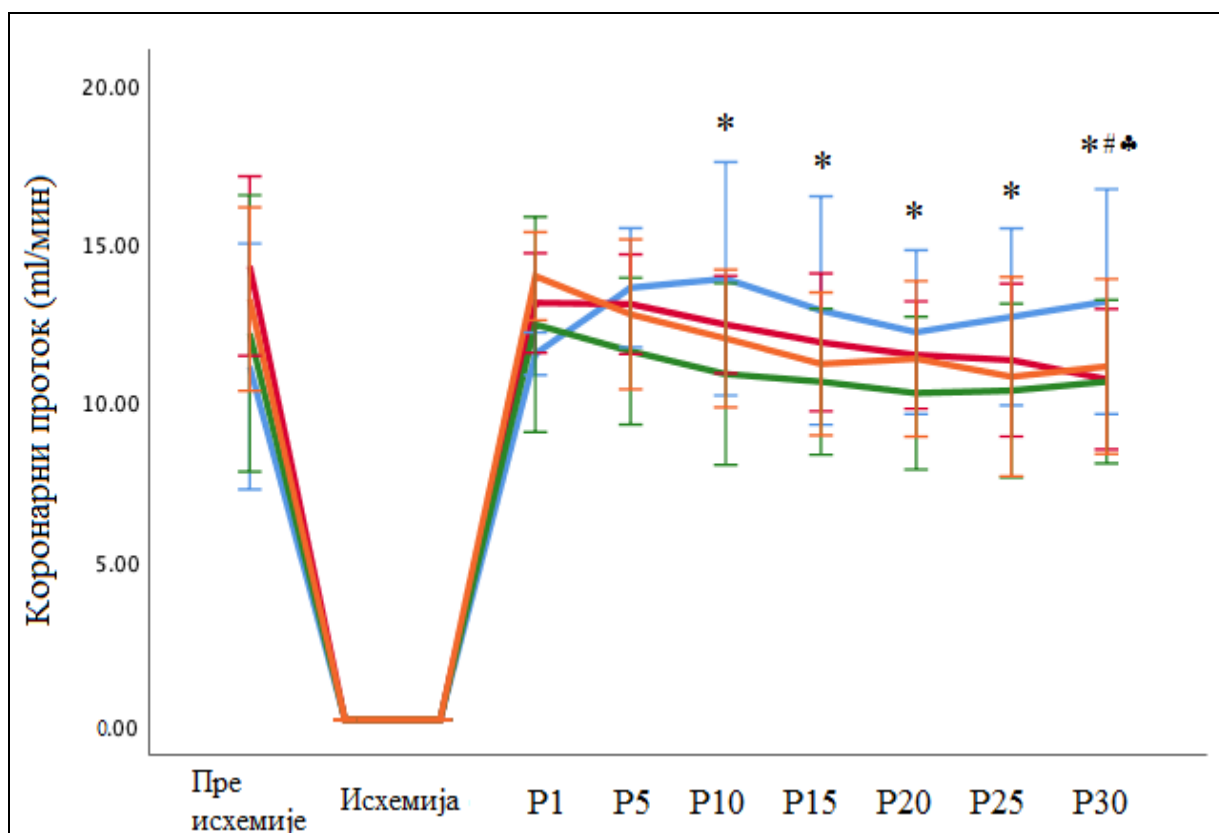


**Графикон бр. 23. Утицај прекондиционирања миокарда винпоцетином на коронарни проток (ml/min)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

- \*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+Винпоцетин група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група,
- ♣  $p < 0,05$  Винпоцетин група vs. Тренинг+Винпоцетин група,
- $p < 0,05$  Тренинг група vs. Винпоцетин група,
- ♦  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,
- °  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

У поређењу са контролном групом, самостално никардипин и у комбинацији са тренингом, довео је до статистички значајног снижења коронарног протока почев од P10 тачке мерења ( $p < 0,05 = P10-P30$  Контрола vs. Никардипин група;  $p < 0,05 = P30$  Контрола vs. Тренинг група, Тренинг+ Никардипин група) (Графикон бр 24).



**Графикон бр. 24. Утицај прекондиционарања миокарда никардипином на коронарни проток (ml/min)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Никардипин група.

Процентуалном анализом, примећена је слична динамика промене коронарног протока у групама третираним винпоцетином и никардипином. Поред тога, у

комбинацији са тренингом поменути лекови своје ефекте остварују углавном у другом делу реперфузионог периода, као и нимодипин (Табела 8).

**Табела 8. Динамика промене коронарног протока у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (R1-R30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

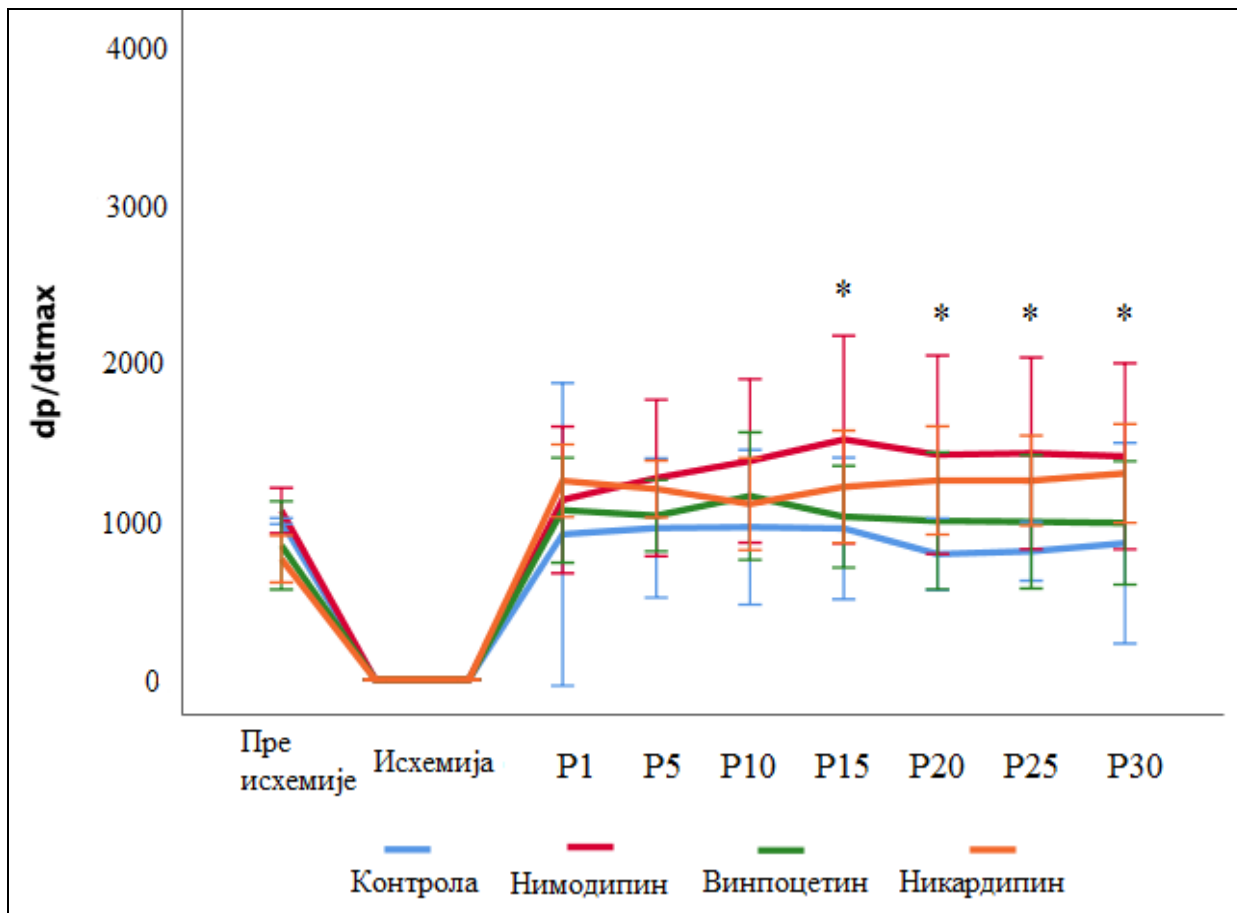
Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>R1</b>	<b>-3.60</b>	<b>+9.76</b>	<b>-7.58</b>	<b>+2.30</b>	<b>-8.12</b>	<b>-1.97</b>	<b>+6.01</b>	<b>+5.44</b>
<b>R5</b>	<b>+22.30</b>	<b>+20.56</b>	<b>-5.76</b>	<b>-4.61</b>	<b>-8.40</b>	<b>-2.41</b>	<b>+0.82</b>	<b>-3.63</b>
<b>R10</b>	<b>+24.82</b>	<b>+18.12</b>	<b>-4.24</b>	<b>-10.53</b>	<b>-12.89</b>	<b>-8.10</b>	<b>-4.37</b>	<b>-9.37</b>
<b>R15</b>	<b>+15.83</b>	<b>0.00</b>	<b>-15.15</b>	<b>-12.50</b>	<b>-16.81</b>	<b>-10.28</b>	<b>-11.20</b>	<b>-15.41</b>
<b>R20</b>	<b>+9.71</b>	<b>+6.27</b>	<b>-19.39</b>	<b>-15.46</b>	<b>-19.61</b>	<b>-9.41</b>	<b>-10.11</b>	<b>-14.20</b>
<b>R25</b>	<b>+14.03</b>	<b>+9.06</b>	<b>-24.55</b>	<b>-14.80</b>	<b>-20.73</b>	<b>-13.13</b>	<b>-13.39</b>	<b>-18.43</b>
<b>R30</b>	<b>+18.35</b>	<b>+9.41</b>	<b>-21.82</b>	<b>-12.50</b>	<b>-24.93</b>	<b>-13.35</b>	<b>-13.93</b>	<b>-16.01</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*



#### 4.2. Поређење ефеката прекондиционарања миокарда инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове на кардиодинамске параметре

Dp/dt max је била значајно виша само у Нимодипин групи у поређењу са Контролном групом ( $p < 0,05 = P15-P30$  Контрола vs. Нимодипин група) (Графикон бр. 25).

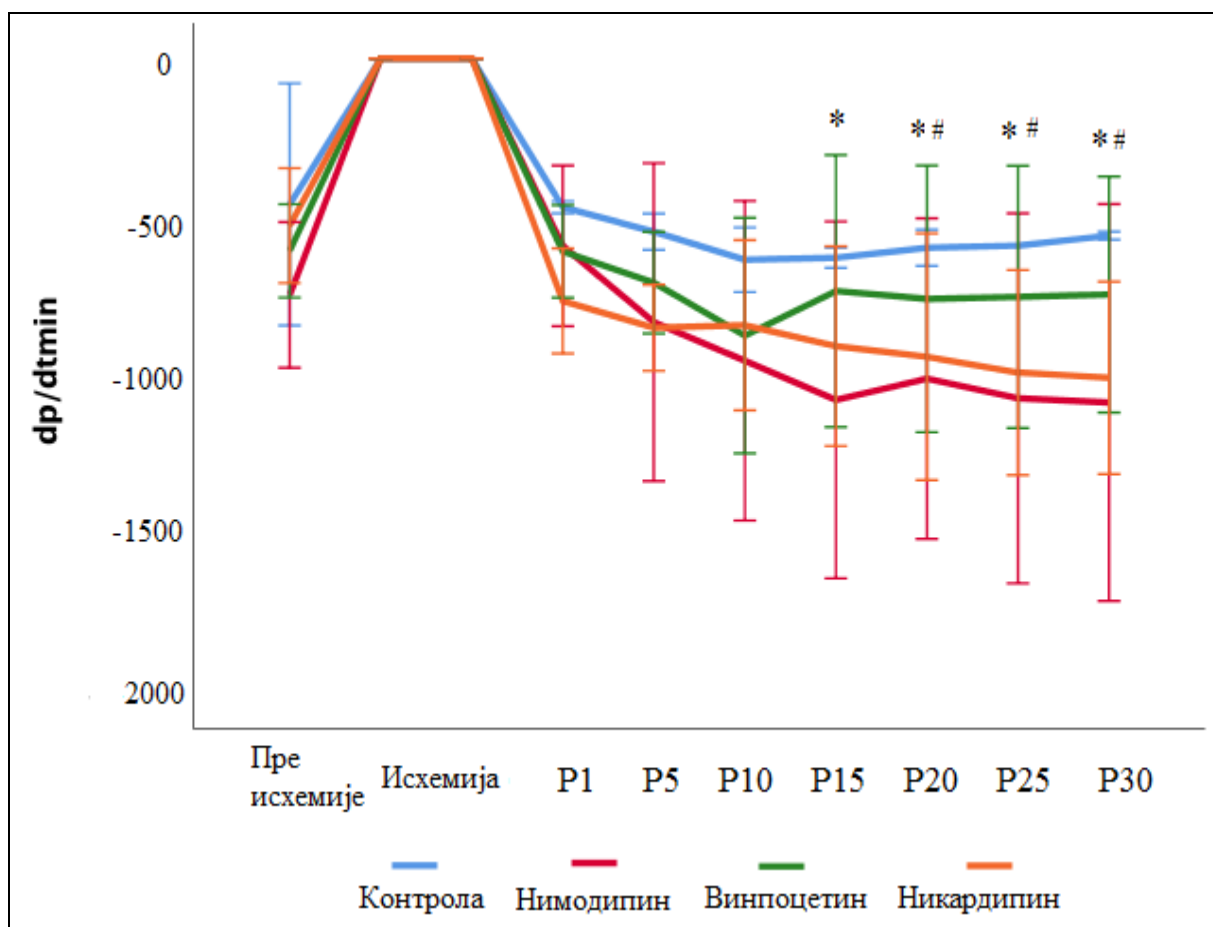


Графикон бр. 25. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на dp/dt max

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група.

$dp/dt \text{ min}$  је била значајно нижа у Нимодипин и Никардипин групи у поређењу са Контролном групом ( $p < 0,05 = P15-P30$  Контрола vs. Нимодипин група,  $p < 0,05 = P20-P30$ ; Контрола vs. Никардипин група) (Графикон бр. 26).

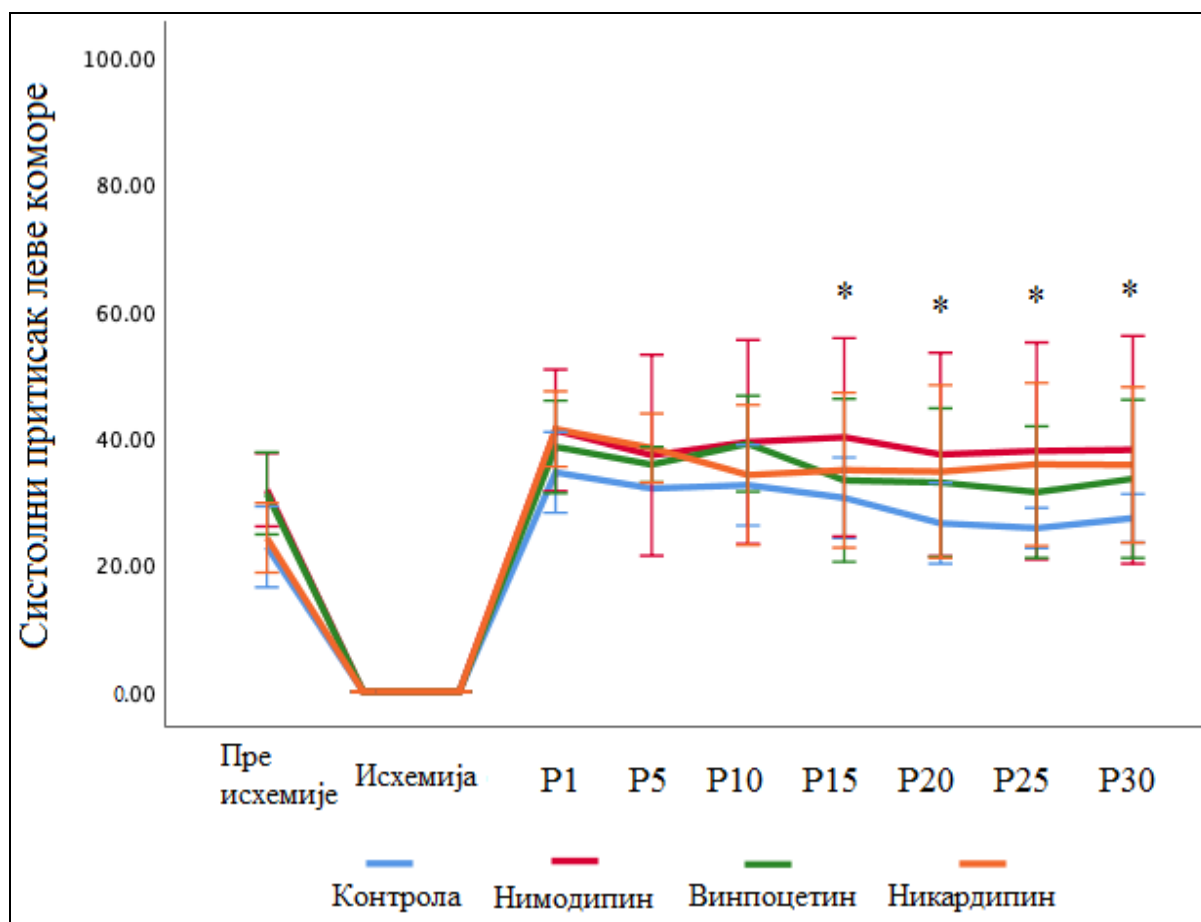


**Графикон бр. 26. Ефекти прекондиционирања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на  $dp/dt \text{ min}$**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група,  
 #  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група.

Систолни притисак у левој комори је био статистички значајно повишен у Нимодипин групи у поређењу са Контролном групом ( $p < 0,05 = P15-P30$  Контрола vs. Нимодипин група) (Графикон бр. 27).

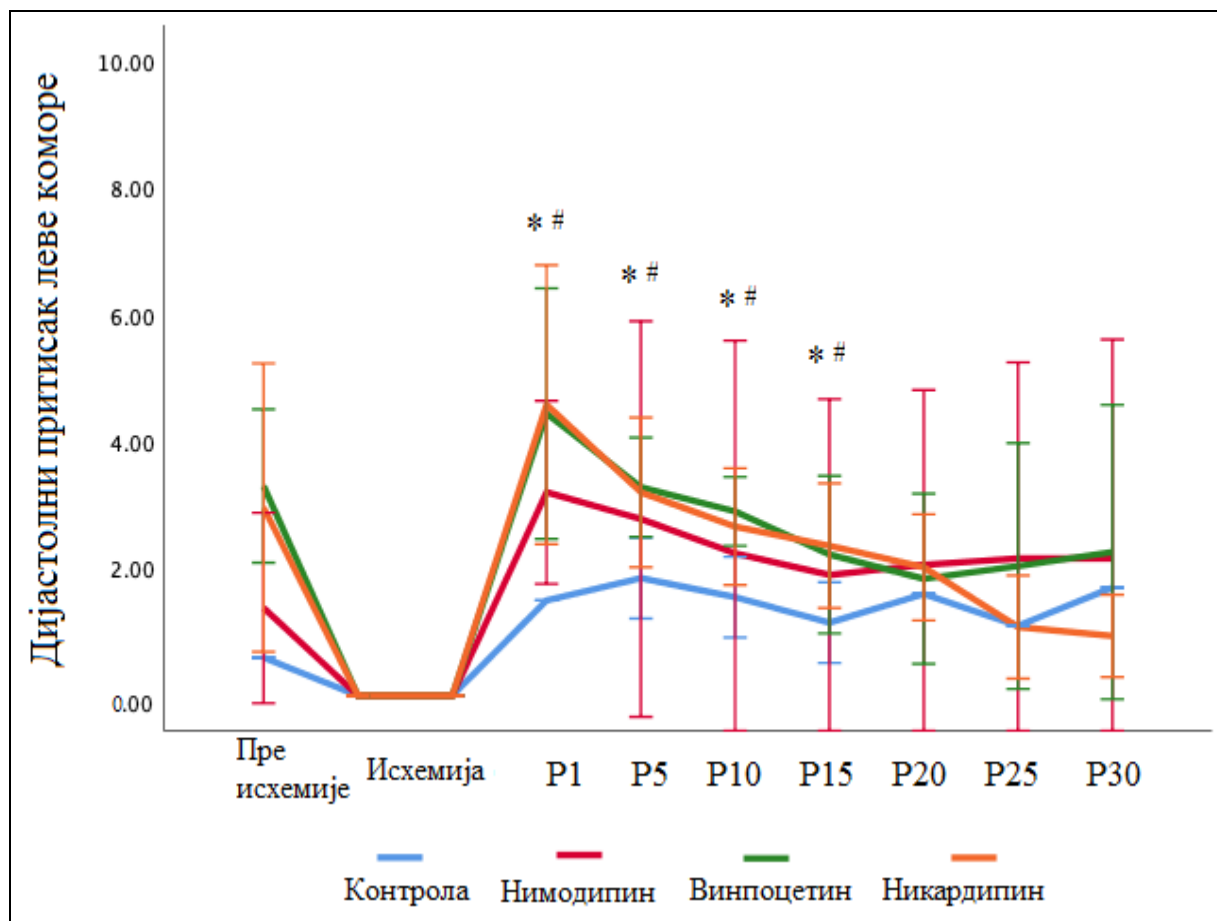


**Графикон бр. 27. Ефекти прекодиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на систолни притисак леве коморе**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група.

Дијастолни притисак у левој комори је био статистички значајно повишен у Никардипин и Винпоцетин групи у поређењу са Контролном групом ( $p < 0,05 = P1-P15$  Контрола vs. Никардипин група, Винпоцетин група) (Графикон бр. 28).

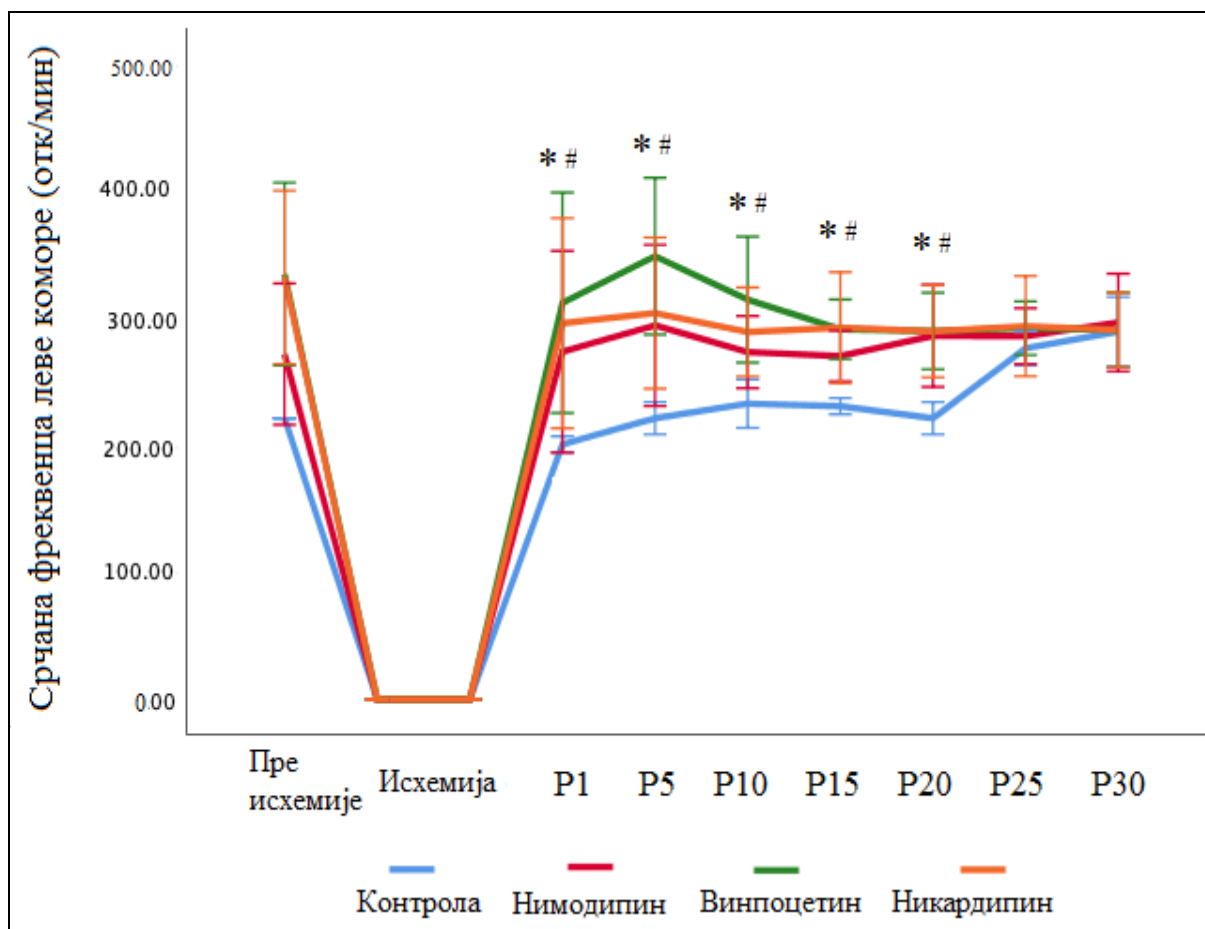


**Графикон бр. 28. Ефекти преконачионирања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на дијастолни притисак леве коморе**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група,  
 #  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група.

HR статистички значајно је била повећана у Никардипин и Винпоцетин групи у поређењу са Контролном групом у одређеним тачкама реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P20$  Контрола vs. Винпоцетин група, Никардипин група) (Графикон бр. 29).



**Графикон бр. 29. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на фреквенцу срца**

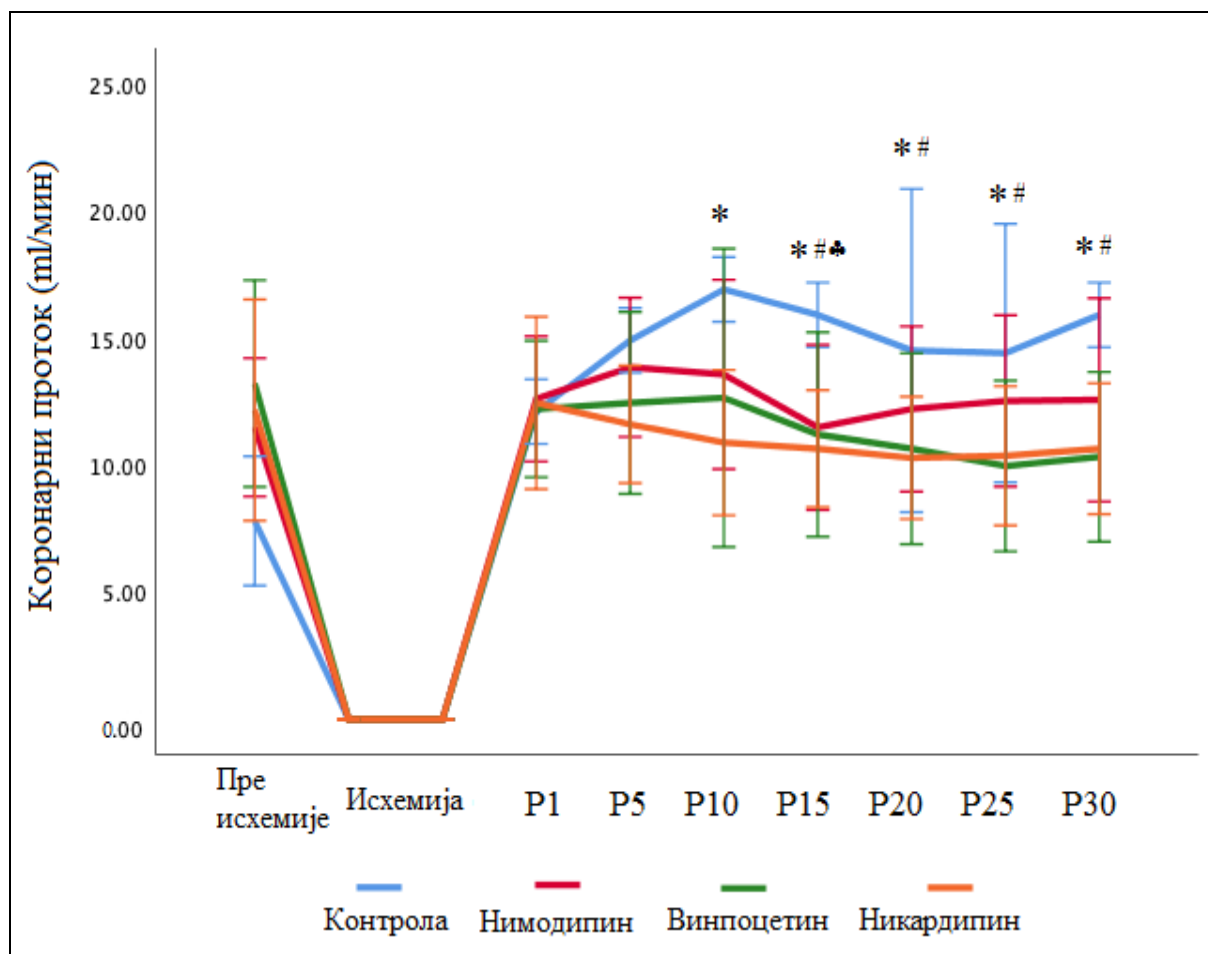
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група.

Коронарни проток је био статистички значајно нижи у Нимодипин, Никардипин и Винпоцетин групи у поређењу са Контролном групом у одређеним тачкама реперфузије

( $p < 0,05 = P10-P30$  Контрола vs. Никардипин група;  $p < 0,05 = P15-P30$  Контрола vs. Винпоцетин група;  $p < 0,05 = P15$  Контрола vs. Нимодипин група) (Графикон бр. 29).



**Графикон бр. 30. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на коронарни проток**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

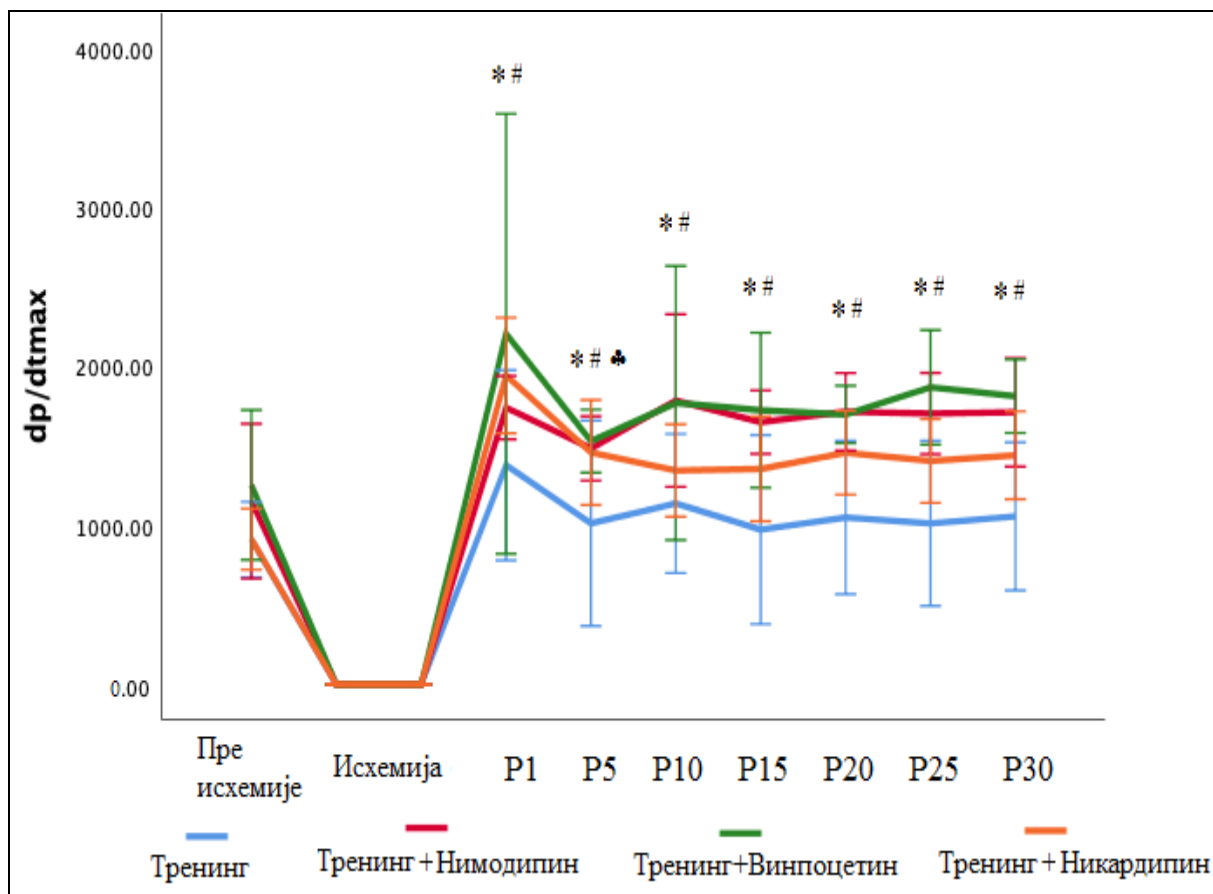
\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група,

**4.3. Поређење ефеката прекондиционарања миокарда инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у комбинацији са физичким тренингом у односу на контролне услове на кардиодинамске параметре**

Dp/dt max код тренираних пацова је значајно различита услед примене свих инхибитора фосфодиестеразе 1 али у различитим тачкама мерења у реперфузији ( $p < 0,05 = P1-P30$  Тренинг vs. Тренинг+Винпоцетин, Тренинг+Никардипин;  $p < 0,05 = P5$  Тренинг vs. Тренинг+Нимодипин) (Графикон бр. 31).



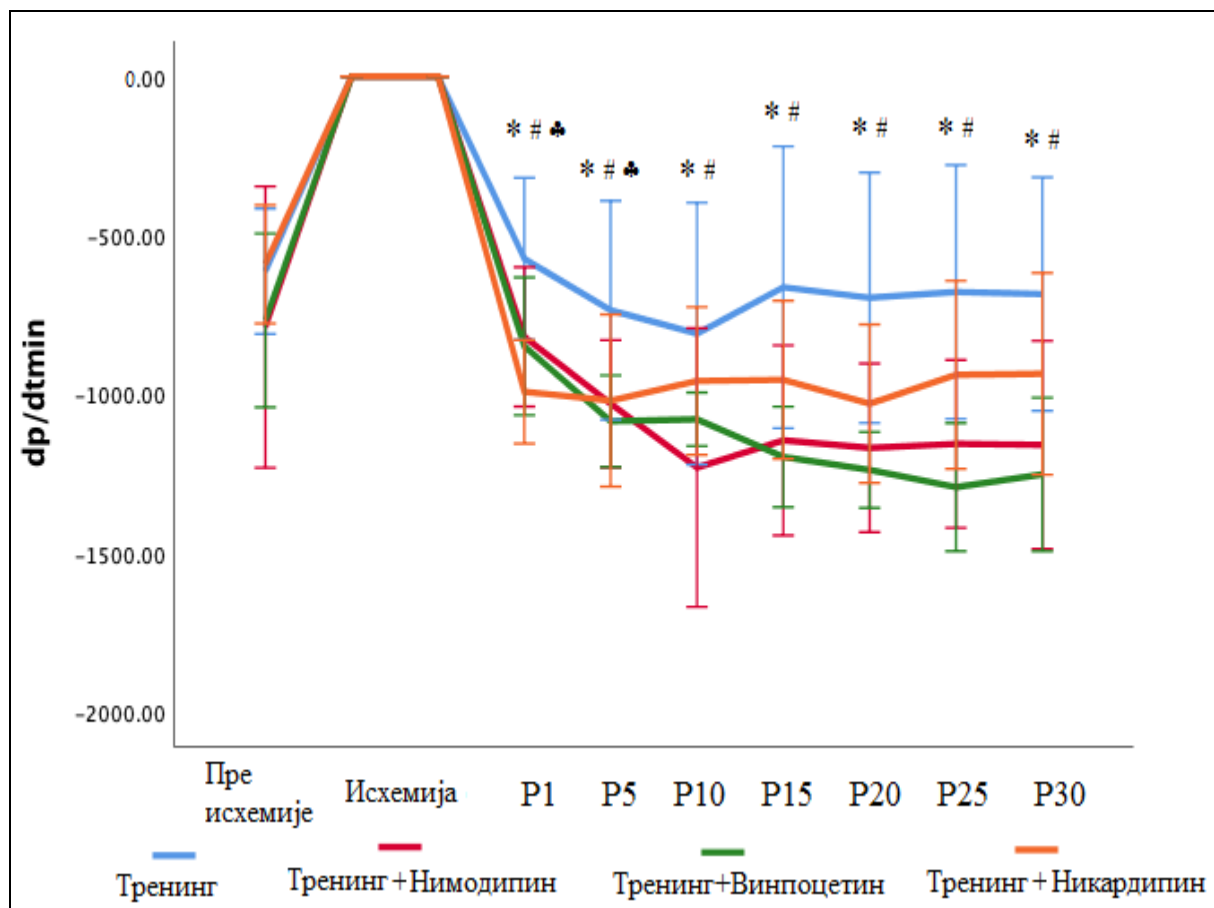
**Графикон бр. 31. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на dp/dt max**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

- \*  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група.

Dp/dt min код тренираних пацова је била статистички значајно промењена услед примене свих инхибитора фосфодиестеразе 1 али у различитим тачкама мерења у

реперфузији ( $p < 0,05 = P1-P30$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+Нимодипин група;  $p < 0,05 = P1, P5$  Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група). Винпоцетин у комбинацији са физичким тренингом се издваја као третман који је најснажније снизио вредности овог параметра при крају реперфузионог периода (Графикон бр. 32).



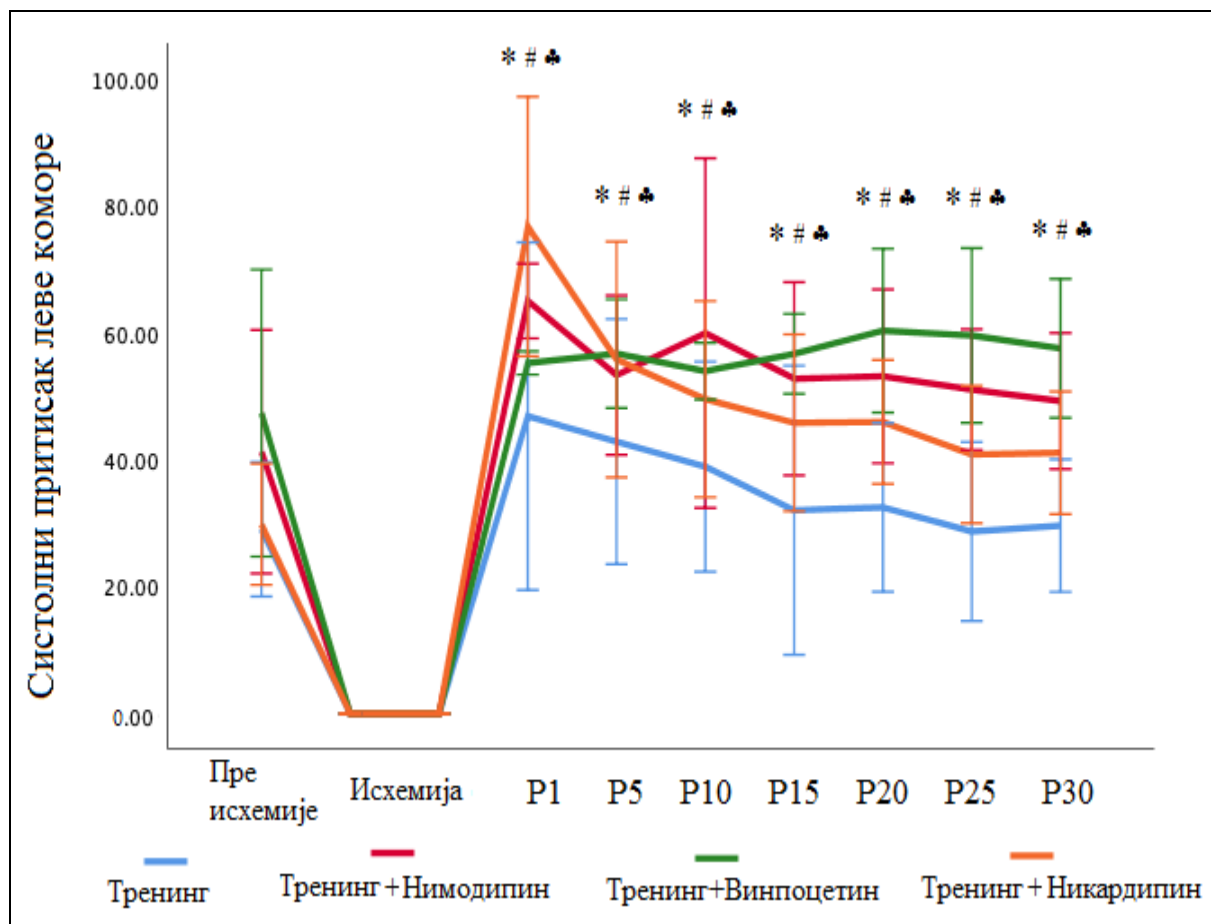
**Графикон бр. 32. Ефекти преконачионарања различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на минималну стопу раста притиска у левој комори**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

- \*  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група.



Систолни притисак леве коморе код тренираних пацова је био статистички значајно промењен услед примене свих инхибитора фосфодиестеразе 1 у свим тачкама мерења у реперфузији ( $p < 0,05 = P1-P30$  Тренинг vs. Тренинг+Винпоцетин, Тренинг+Нимодипин, Тренинг+Никардипин) и то у смислу повећања систолног притиска (Графикон бр. 33).



**Графикон бр. 33. Ефекти преконачионарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на систолни притисак у левој комори**

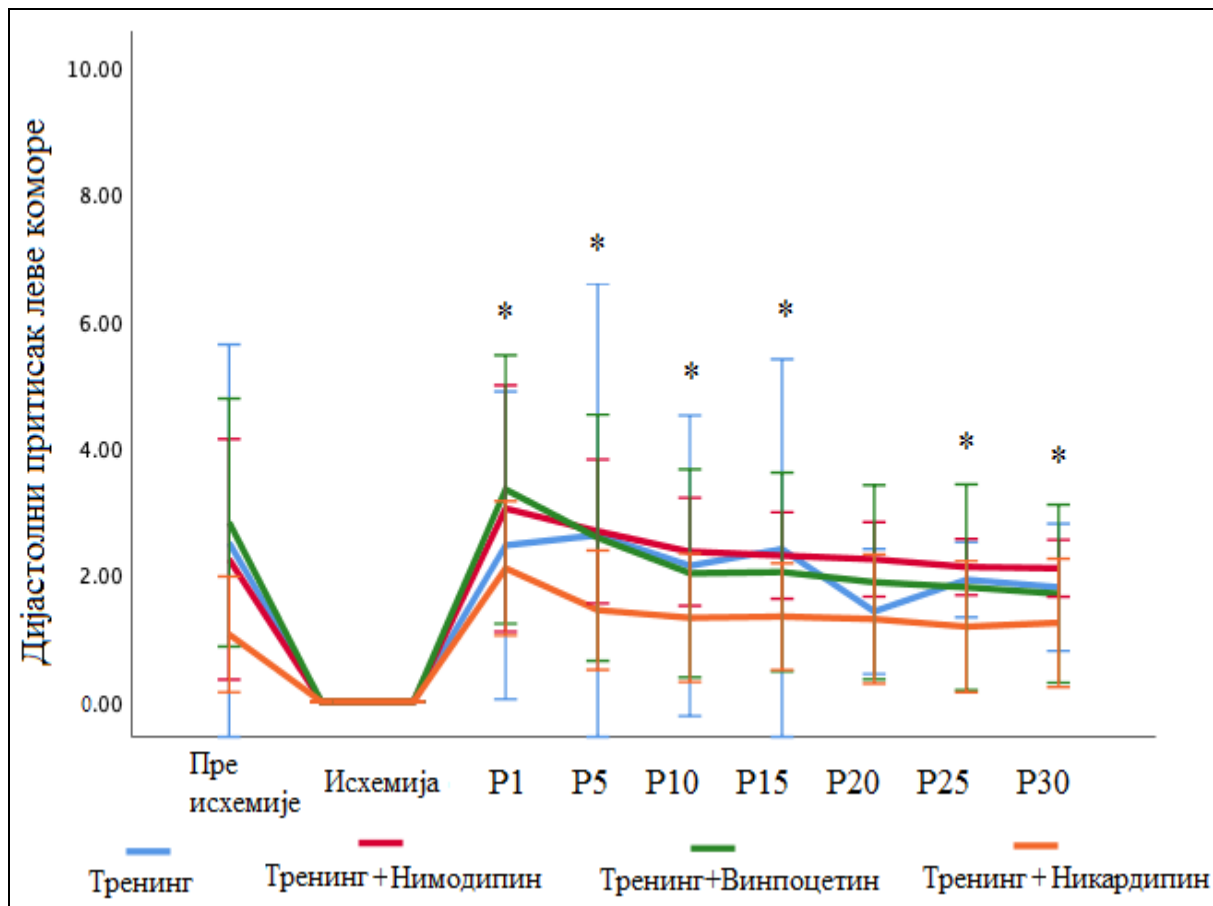
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група,

#  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група,

♣  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група.

Дијастолни притисак леве коморе код тренираних пацова је статистички значајно снижен у групи животиња које су биле прекондициониране никардипином и тренингом у односу на групу која је била повргнута само тренингу у реперфузији ( $p < 0,05 = P1-P15, P25, P30$  Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група) (Графикон бр. 34).

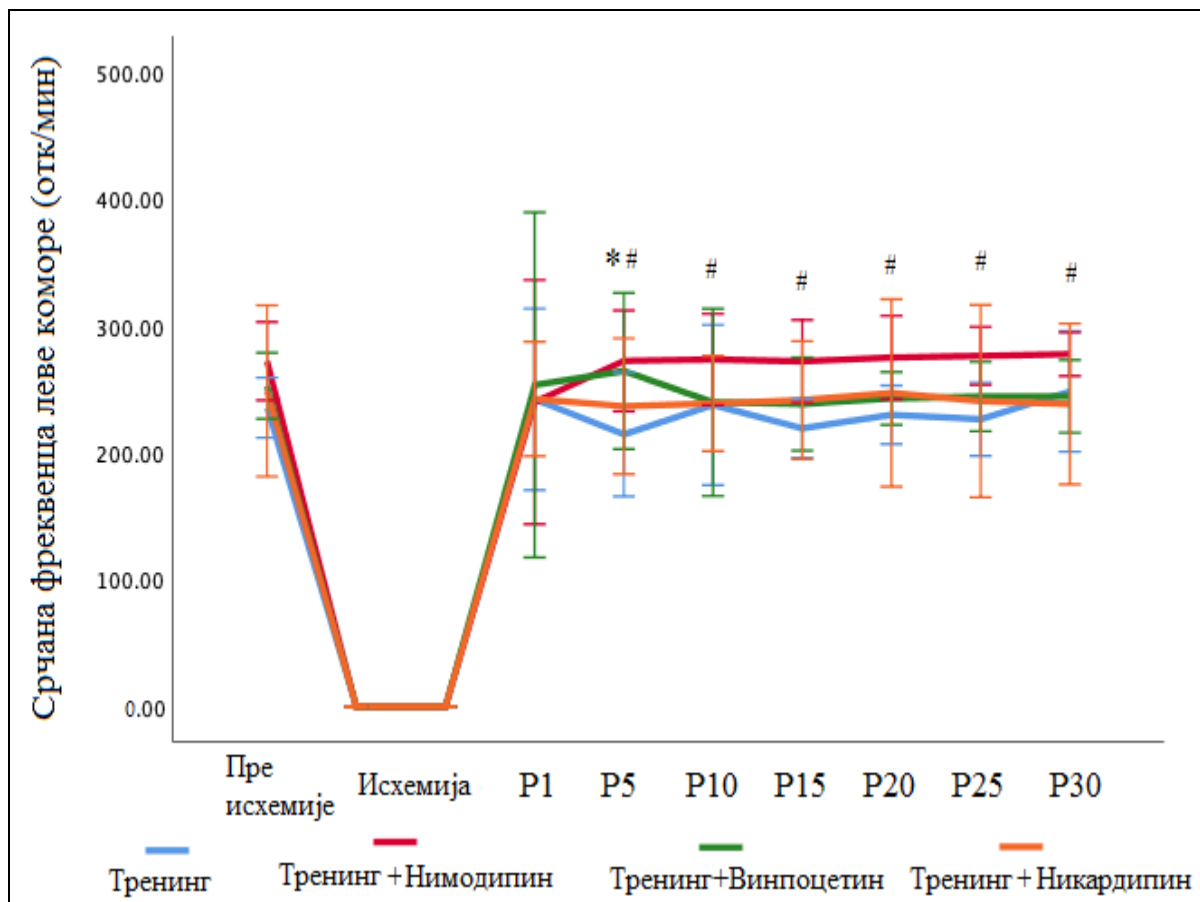


**Графикон бр. 34. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на дијастолни притисак у левој комори**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Никардипин група.

Срчана фреквенца код тренираних пацова је била статистички значајно виша у Нимодипин групи у поређењу са групом која је само тренирала и повишена у петом минути реперфузије у Винпоцетин и Никардипин групи ( $p < 0,05 = P5$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+Нимодипин група;  $p < 0,05 = P10-P30$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група) (Графикон бр. 35).



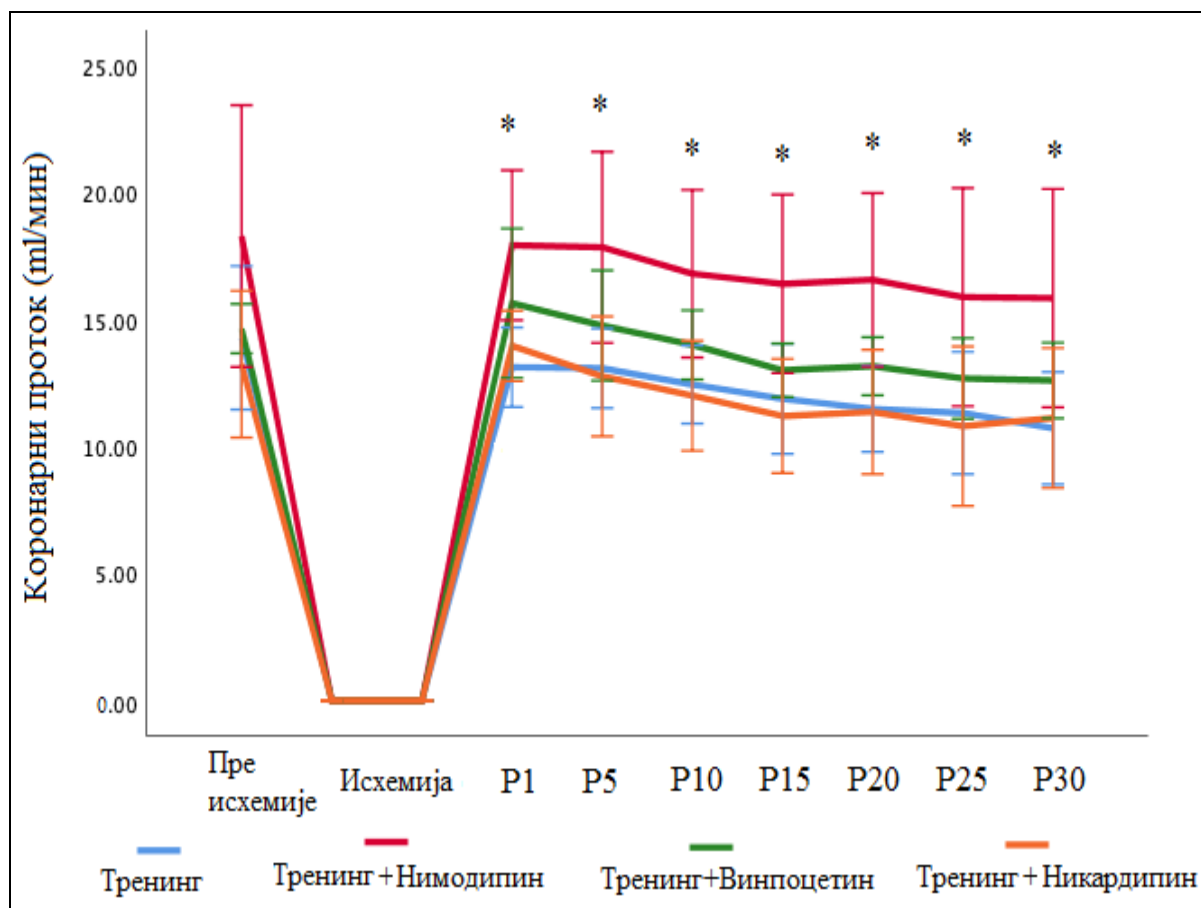
**Графикон бр. 35. Ефекти прекондиционирања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на фреквенцу срца**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група,

# $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група.

Коронарни проток код тренираних пацова је био статистички значајно виши у Нимодипин групи у поређењу са групом која је само тренирала током целог периода реперфузије. Поређењем осталих група са Контролном групом је утврђено да нема статистички значајних разлика ( $p < 0,05 = P1-P30$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група) (Графикон бр. 36).



**Графикон бр. 36. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на коронарни проток**

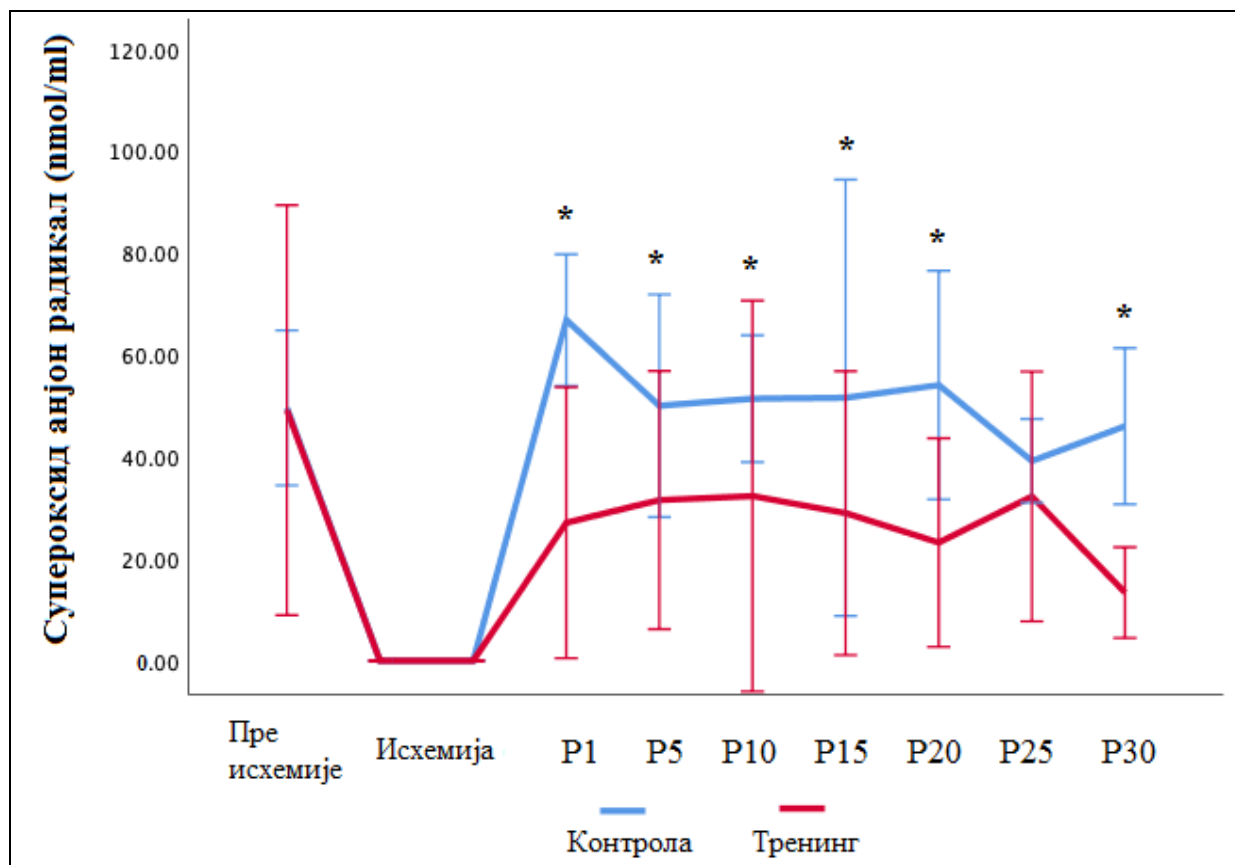
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група.

#### 4.4. Маркери оксидационог стреса у коронарном перфузату

##### 4.4.1. Утицај прекондиционарања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционарања на концентрацију O<sub>2</sub>-

Вредности супероксид анјон радикала су биле статистички значајно ниже у групи која је тренирала у поређењу са контролном групом у скоро свим тачкама реперфузионог периода ( $p < 0,05 = P1-P20, P30$  Контрола vs. Тренинг) (Графикон бр. 37).

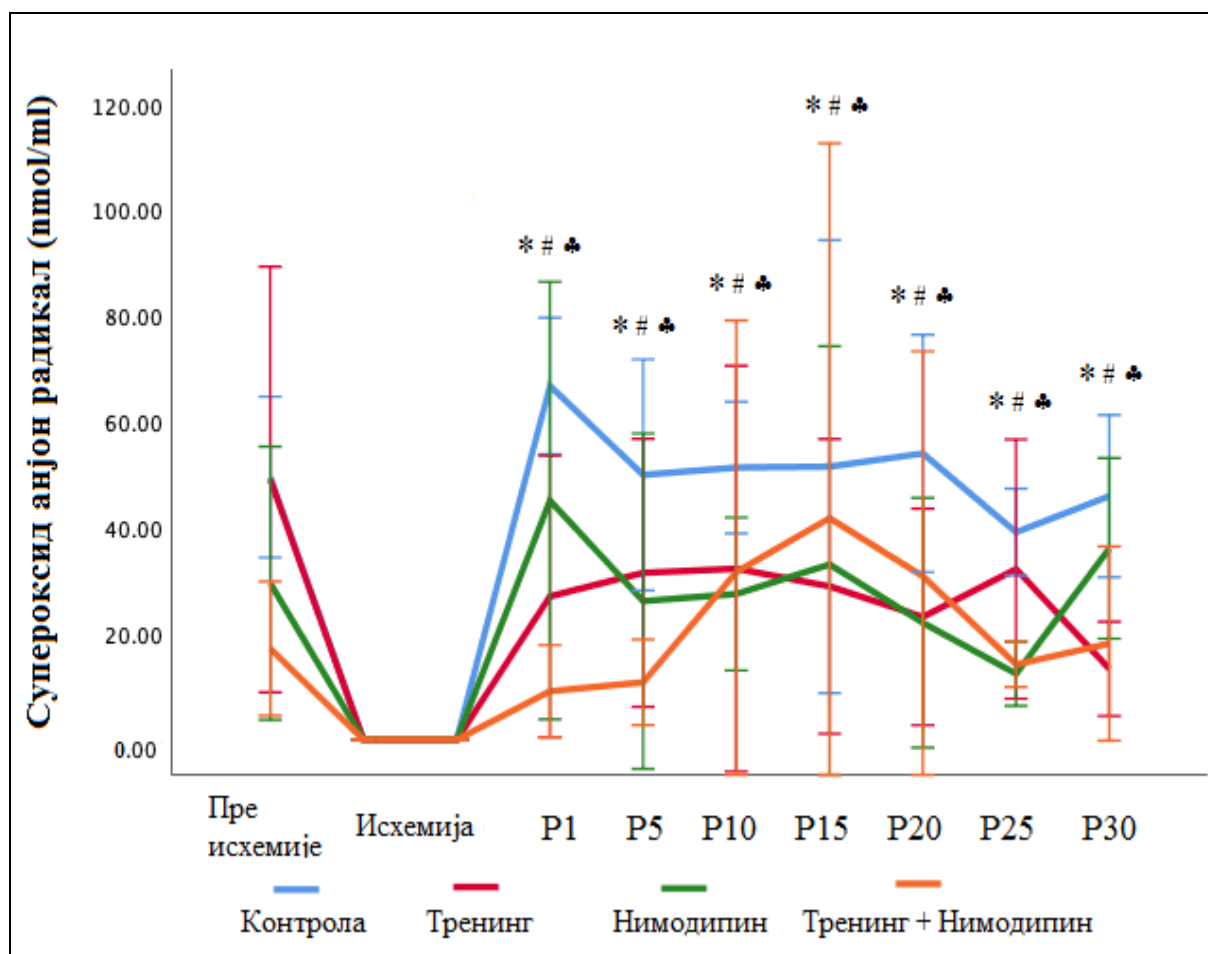


**Графикон бр. 37. Утицај прекондиционарања миокарда физичким тренингом на вредности супероксид анјон радикала (nmol/ml)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена Mann-Whitney тестом.

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Концентрација овог биомаркера биле су статистички значајно ниже у групама које су биле поврнуте нимодипину са или без физичког тренинга у поређењу са Контролном групом у свим тачкама реперфузионог периода ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг група, Тренинг+Нимодипин група, Нимодипин група) (Графикон бр. 38).



**Графикон бр. 38. Утицај прекондиционарања миокарда нимодипином на вредности супероксид анјон радикала (nmol/ml)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

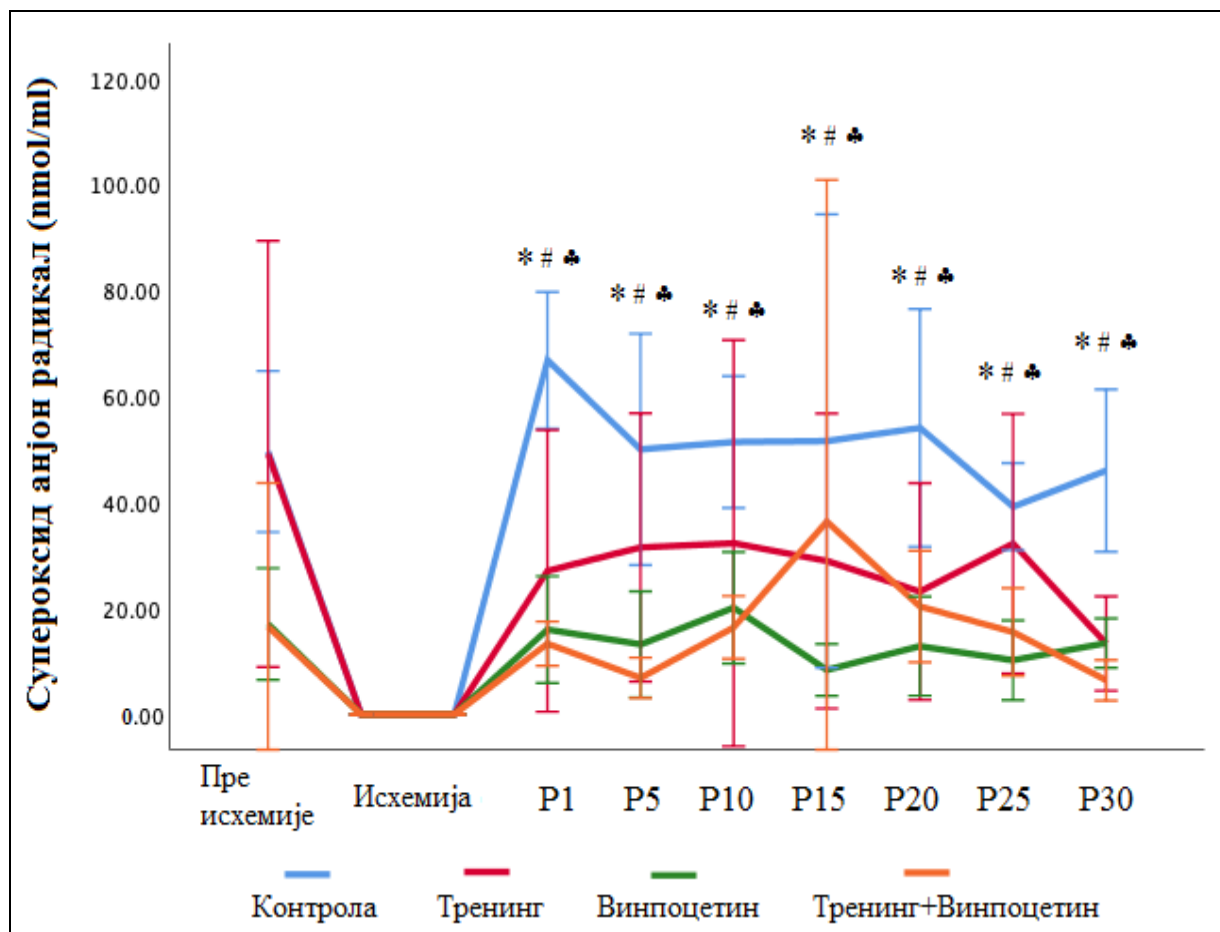
\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Нимодипин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група.

Концентрације  $O_2^-$  биле су статистички значајно ниже у групама које су биле поврнуте винпоцетину са или без физичког тренинга у поређењу са Контролном групом

у свим тачкама реперфузионог периода ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг група, Тренинг+Винпоцетин група, Винпоцетин група) (Графикон бр. 39).



**Графикон бр. 39. Утицај прекондиционирања миокарда винпоцетином на вредности супероксид анјон радикала (nmol/ml)**

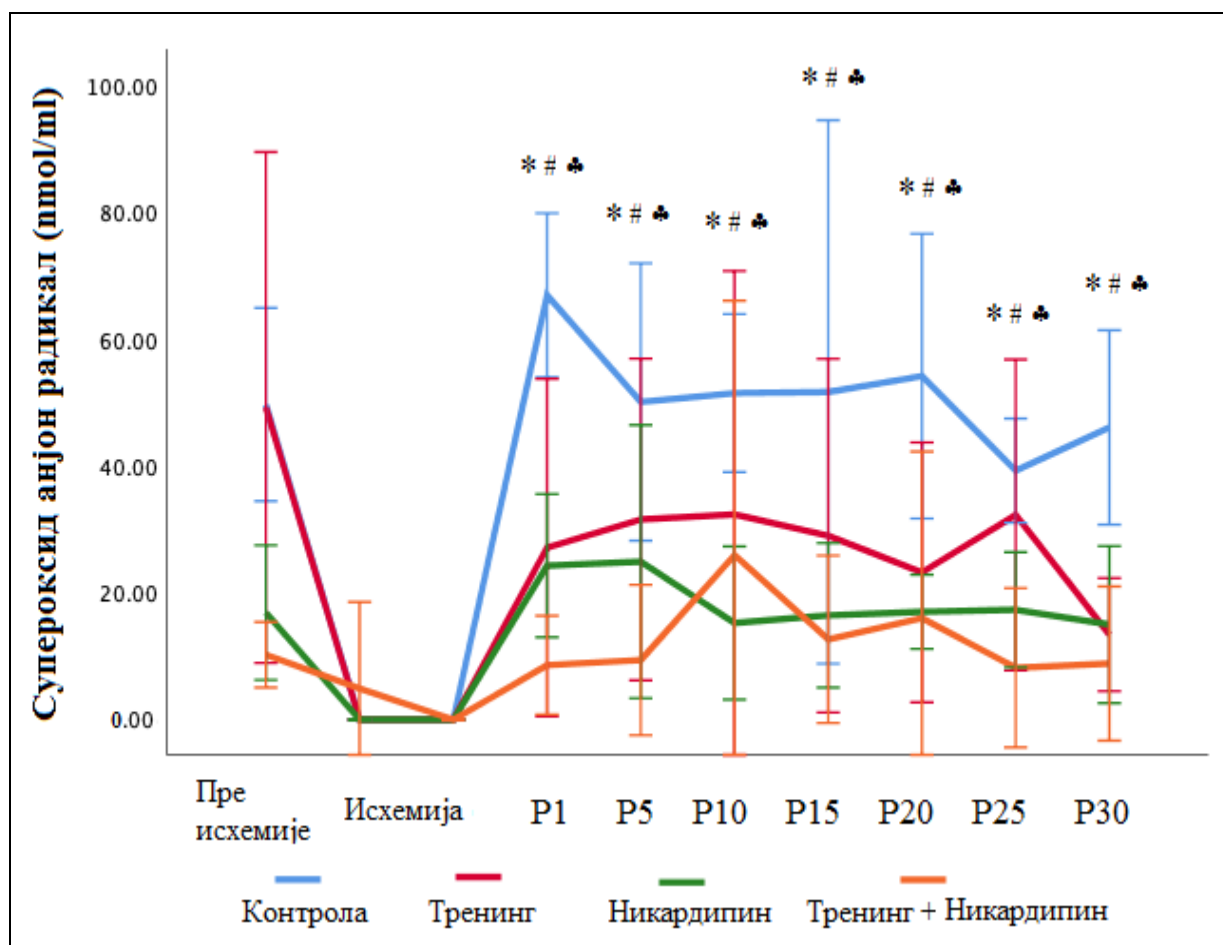
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група.

Вредности супероксид анјон радикала су биле статистички значајно ниже у групама које су биле поврнуте никардипину са или без физичког тренинга у поређењу са Контролном групом у свим тачкама реперфузионог периода ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг, Тренинг+Никардипин, Никардипин) (Графикон бр. 40).



**Графикон бр. 40. Утицај прекондиционарања миокарда никардипином на вредности супероксид анјон радикала (nmol/ml)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Никардипин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група.



У поређењу са нивоима супероксид анјон радикала пре исхемијског периода, у свакој групи која није била повргнута фармаколошком прекондиционирању примећен је значајан пораст овог маркера у периоду реперфузије, док је у групама које су фармаколошки прекондициониране, приметан пад нивоа супероксид анјон радикала. (Табела 9).

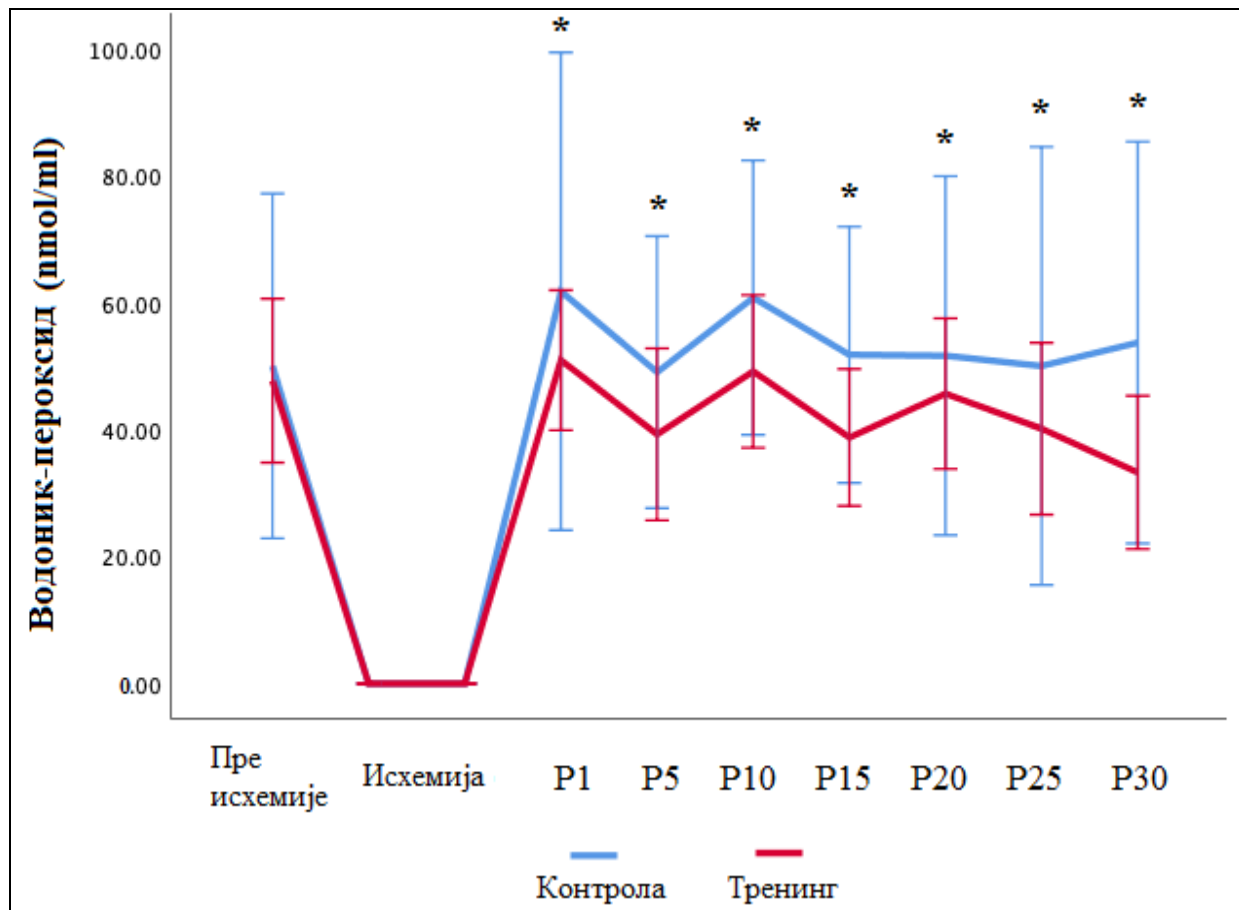
**Табела 9. Динамика промене супероксид анјон радикала у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>P1</b>	<b>+34.71</b>	<b>+52.85</b>	<b>-6.26</b>	<b>+43.90</b>	<b>-44.88</b>	<b>-46.85</b>	<b>-19.33</b>	<b>-15.98</b>
<b>P5</b>	<b>+0.82</b>	<b>-11.46</b>	<b>-22.56</b>	<b>+47.65</b>	<b>-35.87</b>	<b>-37.06</b>	<b>-58.35</b>	<b>-8.15</b>
<b>P10</b>	<b>+3.63</b>	<b>-6.86</b>	<b>+17.92</b>	<b>-9.69</b>	<b>-34.26</b>	<b>+84.07</b>	<b>-0.80</b>	<b>+153.69</b>
<b>P15</b>	<b>+3.98</b>	<b>+12.00</b>	<b>-50.74</b>	<b>-2.51</b>	<b>-41.07</b>	<b>+143.04</b>	<b>+119.84</b>	<b>+23.87</b>
<b>P20</b>	<b>+9.02</b>	<b>-25.25</b>	<b>-24.56</b>	<b>+0.77</b>	<b>-52.82</b>	<b>+79.34</b>	<b>+23.00</b>	<b>+56.41</b>
<b>P25</b>	<b>-20.97</b>	<b>-57.89</b>	<b>-40.07</b>	<b>+2.65</b>	<b>-34.42</b>	<b>-17.29</b>	<b>-6.04</b>	<b>-20.01</b>
<b>P30</b>	<b>-7.26</b>	<b>+22.25</b>	<b>-21.08</b>	<b>-11.11</b>	<b>-72.77</b>	<b>+5.51</b>	<b>-61.08</b>	<b>-13.55</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*

#### 4.4.2. Утицај прекондиционарања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционарања на концентрацију H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Вредности водоник-пероксида су биле статистички значајно ниже у групама које су биле повргнуте тренингу у поређењу са Контролном групом у свим тачкама реперфузионог периода ( $p < 0,05 = P1-P30$ ) (Графикон бр. 41).

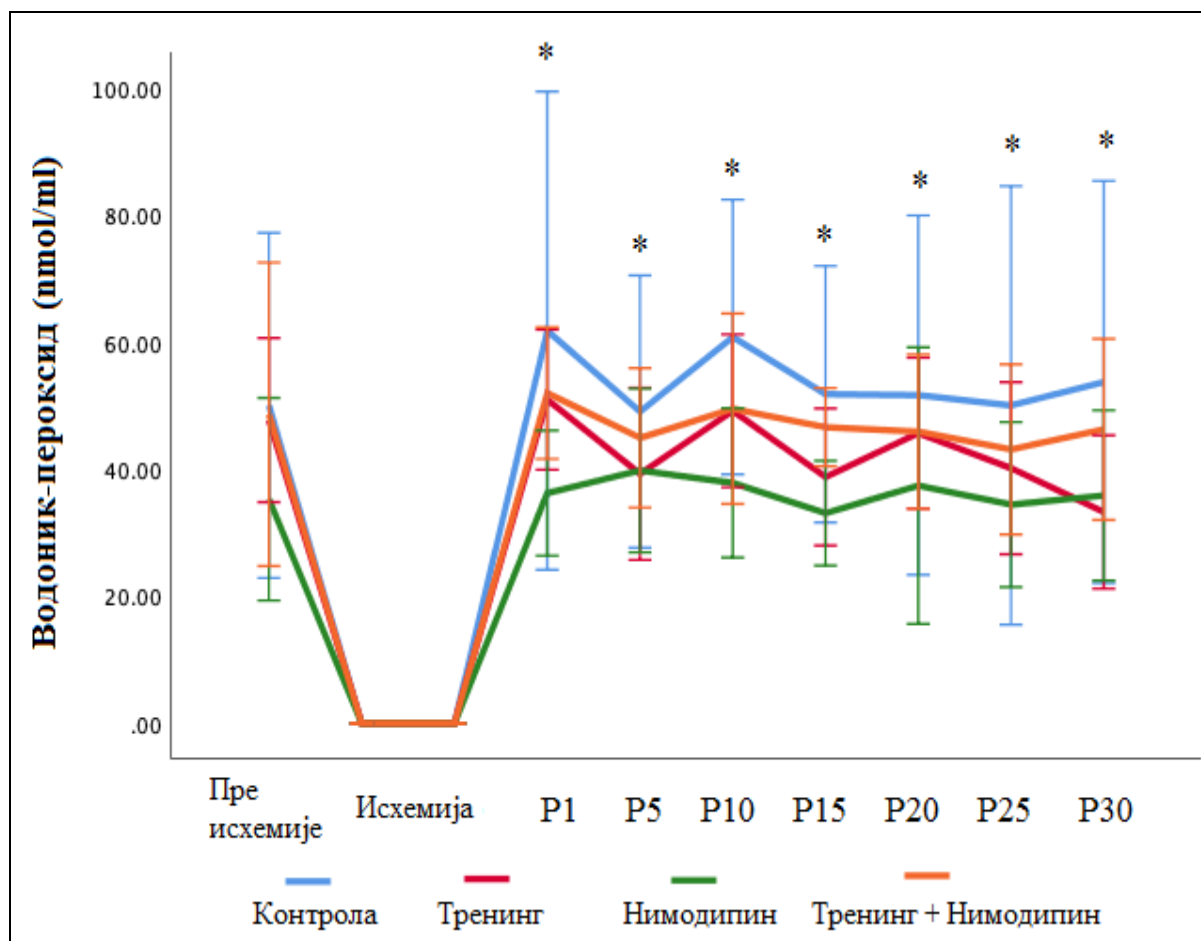


Графикон бр. 41. Утицај прекондиционарања миокарда физичким тренингом на вредности водоник-пероксида (nmol/ml)

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена Mann-Whitney тестом.

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Вредности водоник-пероксида су биле статистички значајно ниже у Нимодипин групи у поређењу са Контролном групом у свим тачкама реперфузионог периода ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Нимодипин група) (Графикон бр. 42).

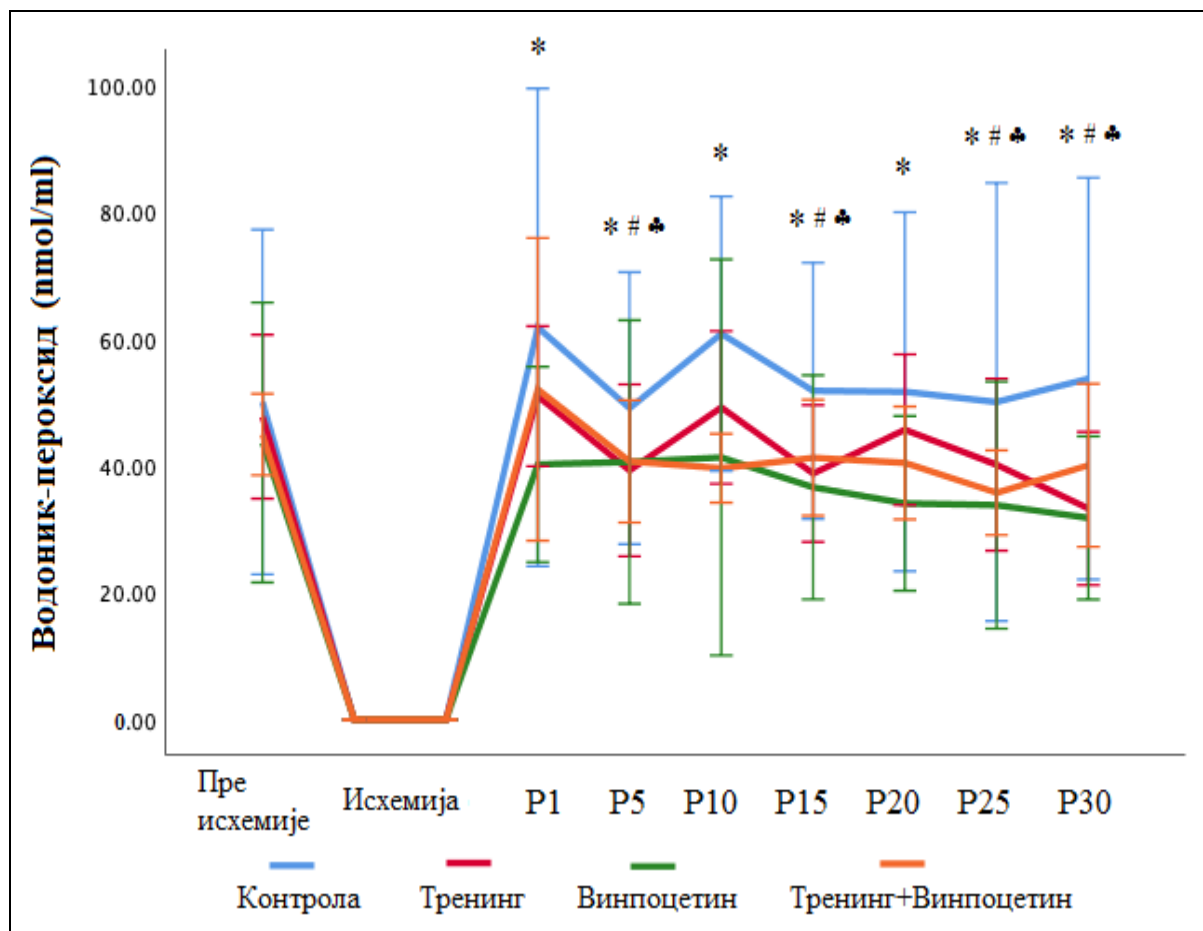


**Графикон бр. 42. Утицај прекондиционирања миокарда нимодипином на вредности водоник-пероксида (nmol/ml)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група.

Вредности водоник-пероксида су биле статистички значајно ниже у Винпоцетин групи у поређењу са Контролном групом у свим тачкама реперфузионог периода, као и у осталим групама које су прекондициониране винпоцетином али само у појединим моментима реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Винпоцетин,  $p < 0,05 = P5, P15, P25, P30$  Контрола vs. Тренинг, Тренинг+ Винпоцетин) (Графикон бр. 43).



**Графикон бр. 43. Утицај прекондиционирања миокарда винпоцетином на вредности водоник-пероксида (nmol/ml)**

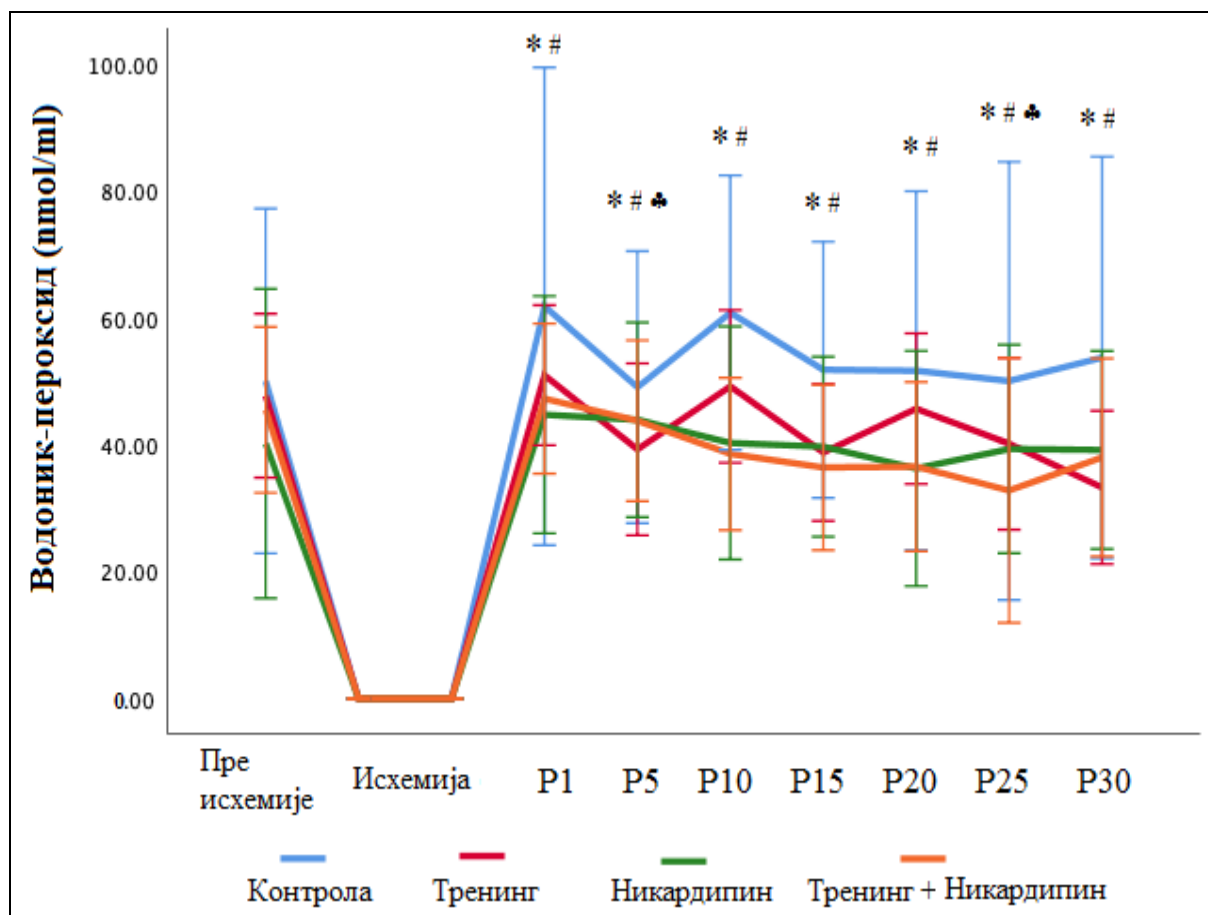
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+Винпоцетин група.

Вредности водоник-пероксида су биле статистички значајно ниже у групама које су прекондициониране никардипином, у поређењу са Контролном групом у свим тачкама реперфузионог периода, као и у осталим групама које су прекондициониране или леком или тренингом, али само у појединим моментима реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Никардипин група, Тренинг + Никардипин група;  $p < 0,05 = P5, P25$  Контрола vs. Тренинг група) (Графикон бр. 44).



**Графикон бр. 44. Утицај прекондиционарања миокарда никардипином на вредности водоник-пероксида (nmol/ml)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Никардипин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Динамика водоник-пероксида унутар сваке групе одвојено је слична динамици супероксид анјон радикала. Овај део резултата указује да примена инхибитора фосфодиестеразе типа 1 у комбинацији са тренингом значајно смањују нивое прооксидационих маркера (Табела 10).

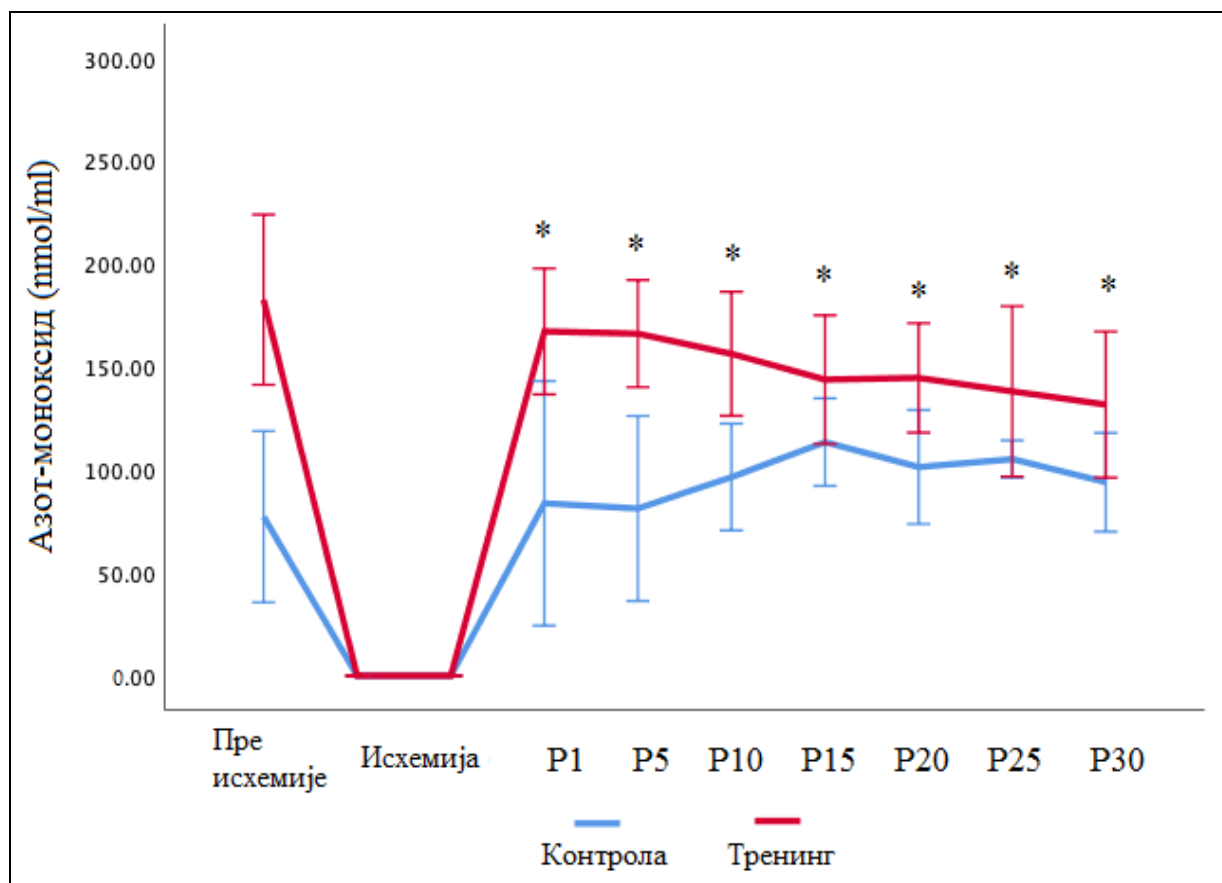
**Табела 10. Динамика промене водоник пероксида у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>R1</b>	<b>+23.50</b>	<b>+2.75</b>	<b>-8.07</b>	<b>+14.39</b>	<b>+30.95</b>	<b>+4.45</b>	<b>+28.74</b>	<b>+4.73</b>
<b>R5</b>	<b>-1.95</b>	<b>+12.82</b>	<b>-6.31</b>	<b>+10.57</b>	<b>+0.66</b>	<b>-4.98</b>	<b>-3.10</b>	<b>+0.48</b>
<b>R10</b>	<b>+21.50</b>	<b>+7.29</b>	<b>-7.01</b>	<b>+5.42</b>	<b>+18.32</b>	<b>-3.51</b>	<b>-10.31</b>	<b>-12.06</b>
<b>R15</b>	<b>+3.53</b>	<b>-6.21</b>	<b>-16.33</b>	<b>+2.61</b>	<b>+14.37</b>	<b>-8.78</b>	<b>-8.39</b>	<b>-16.53</b>
<b>R20</b>	<b>+3.23</b>	<b>+6.09</b>	<b>-21.08</b>	<b>-5.15</b>	<b>+11.96</b>	<b>-3.35</b>	<b>-9.19</b>	<b>-12.42</b>
<b>R25</b>	<b>0.00</b>	<b>-2.40</b>	<b>-22.21</b>	<b>+6.27</b>	<b>+7.18</b>	<b>-9.20</b>	<b>-16.77</b>	<b>-24.39</b>
<b>R30</b>	<b>+7.36</b>	<b>+1.68</b>	<b>-26.17</b>	<b>-1.17</b>	<b>14.08</b>	<b>-8.26</b>	<b>-12.11</b>	<b>-8.03</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*

#### 4.4.3. Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на концентрацију азот-моноксида у коронарном перфузату изолованог срца пацова

Ниво азот-моноксида у форми нитрита је био статистички значајно повишен у групи која је прекондиционирана физичким тренингом у поређењу са седентарним животињама ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг група) (Графикон бр. 45).

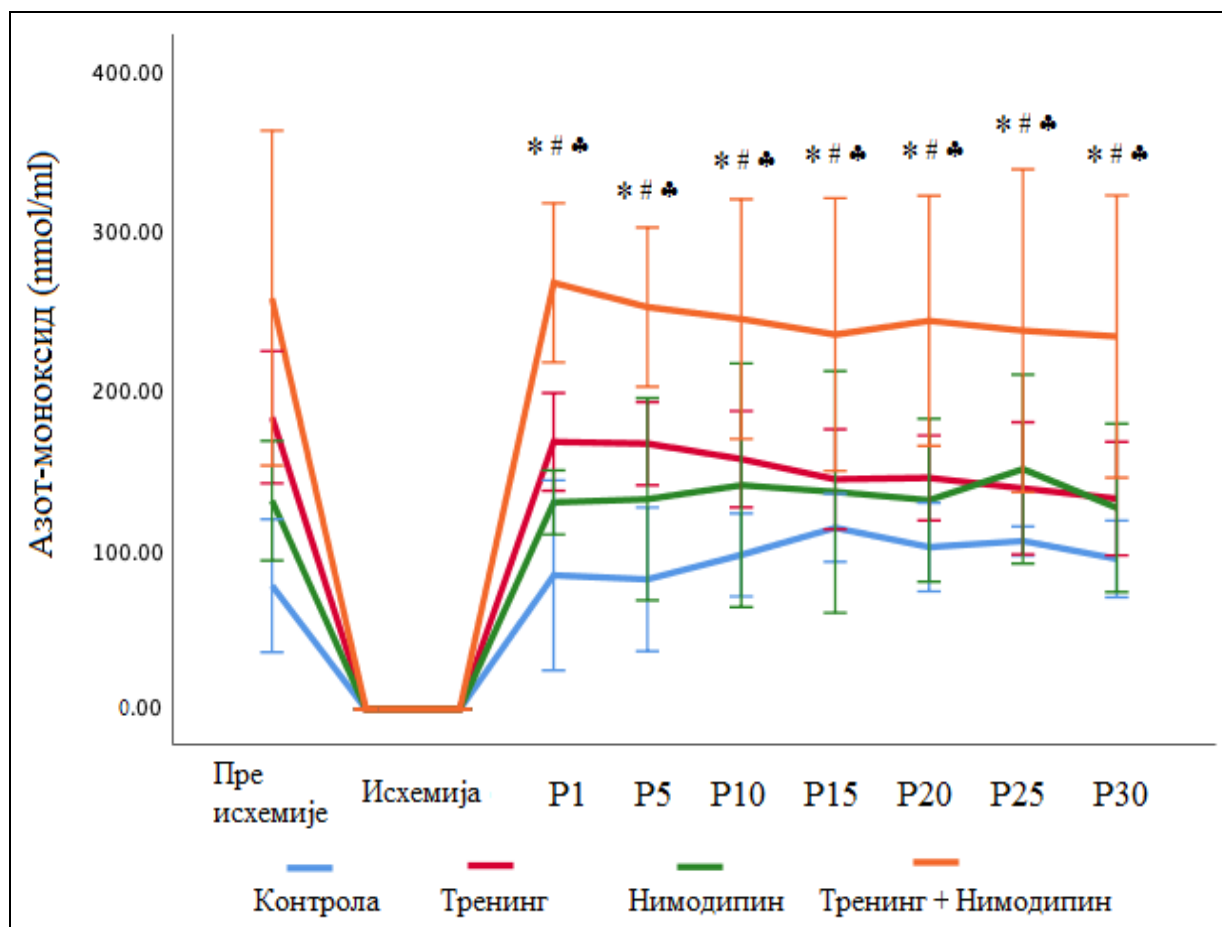


Графикон бр. 45. Утицај прекондиционирања миокарда физичким тренингом на вредности азот-моноксида (nmol/ml)

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена Mann-Whitney тестом.

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Ниво азот-монооксида у форми нитрита је био статистички значајно повишен у свим групама у поређењу са седентарним животињама ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг група, Нимодипин група, Тренинг+Нимодипин група) (Графикон бр. 46).



**Графикон бр. 46. Утицај прекондиционирања миокарда нимодипином на вредности азот-монооксида (nmol/ml)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

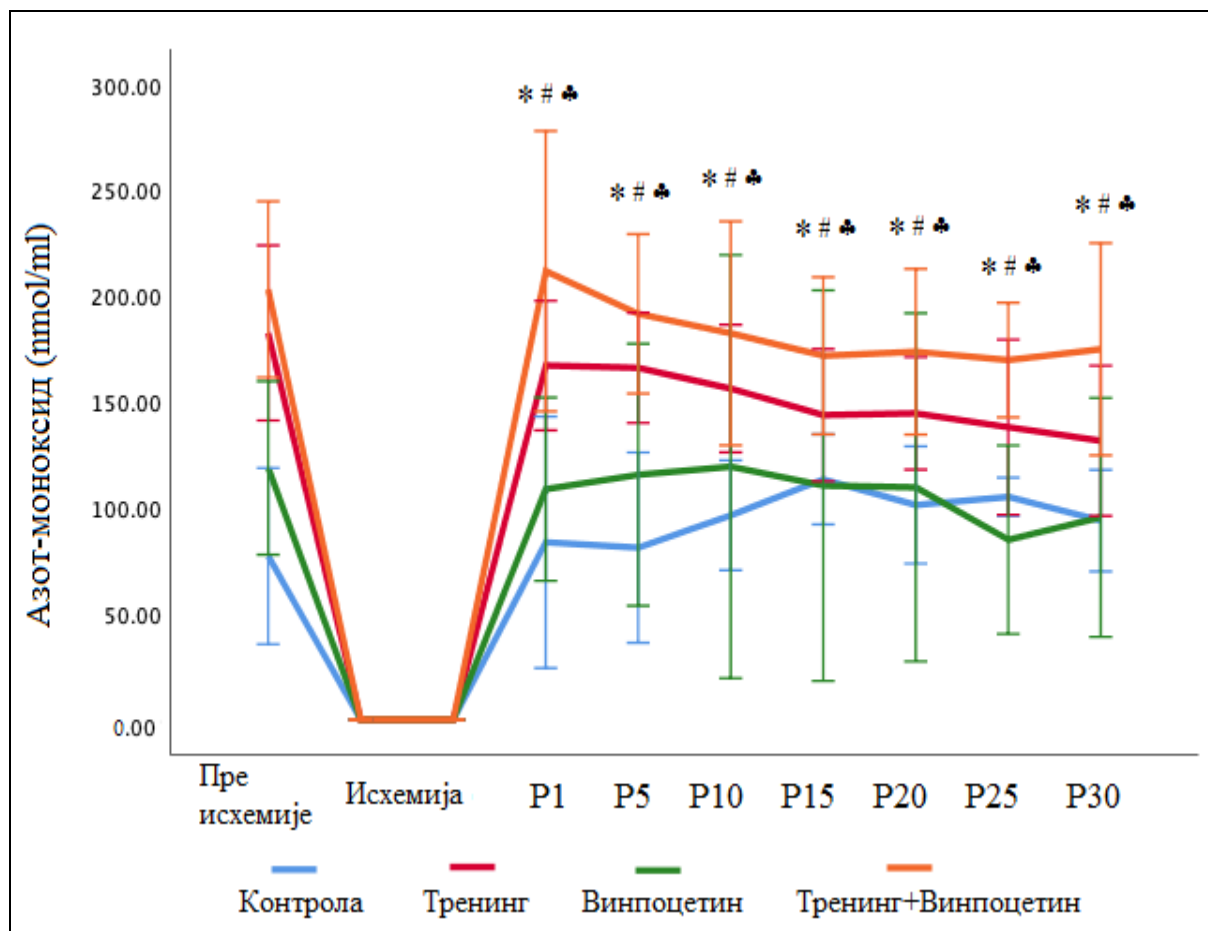
\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Нимодипин група.

Ниво азот-монооксида у форми нитрита је био статистички значајно повишен у свим групама у поређењу са седентарним животињама ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг група, Винпоцетин група, Тренинг+Винпоцетин група) (Графикон бр. 47).





**Графикон бр. 47. Утицај прекондиционирања миокарда винпоцетином на вредности азот-моноксида (nmol/ml)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

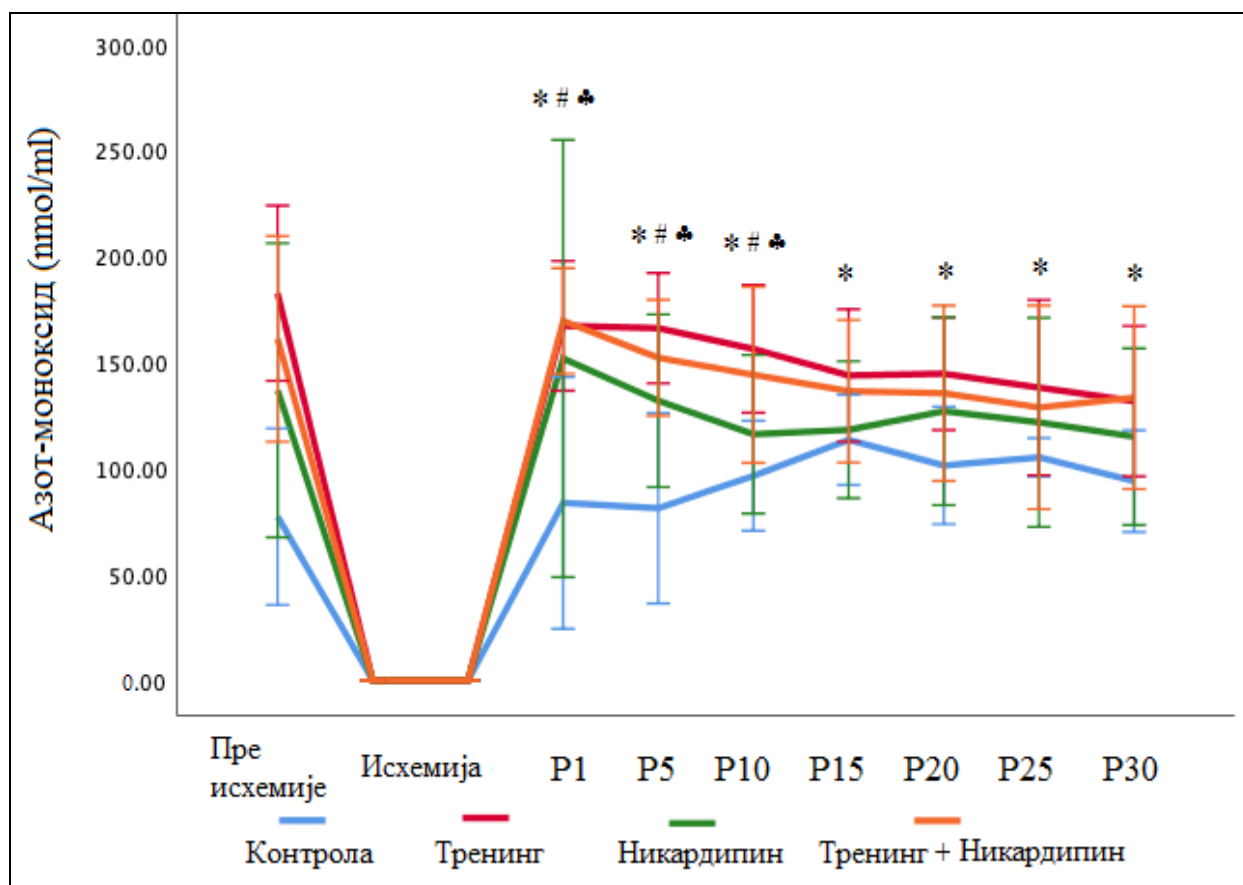
\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+Винпоцетин група.

Ниво азот-моноксида у форми нитрита је био статистички значајно повишен само у почетним минутима реперфузије и то у групама прекондиционираним самостално никардипином или у комбинацији са физичким тренингом у поређењу са Контролном групом ( $p < 0,05 = P1-P10$  Контрола vs. Тренинг група, Никардипин група,

Тренинг+Никардипин група;  $p < 0,05 = P15-P30$  Контрола vs. Тренинг група) (Графикон бр. 48).



**Графикон бр. 48. Утицај прекондиционарања миокарда никардипином на вредности азот-моноксида (nmol/ml)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. vs. Никардипин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. vs. Тренинг+ Никардипин група..

У односу на динамику концентрације нитрита у контролној групи, у осталим групама дошло је до повишења нивоа овог маркера у периоду реперфузије у односу на почетне вредности пре исхемије. Поређењем група које су прекондициониране тренингом са групама које су прекондициониране тренингом и фармаколошким агенсом, приметне су ниже вредности азот-моноксида у групама без фармаколошког прекондиционарања (Табела 11).

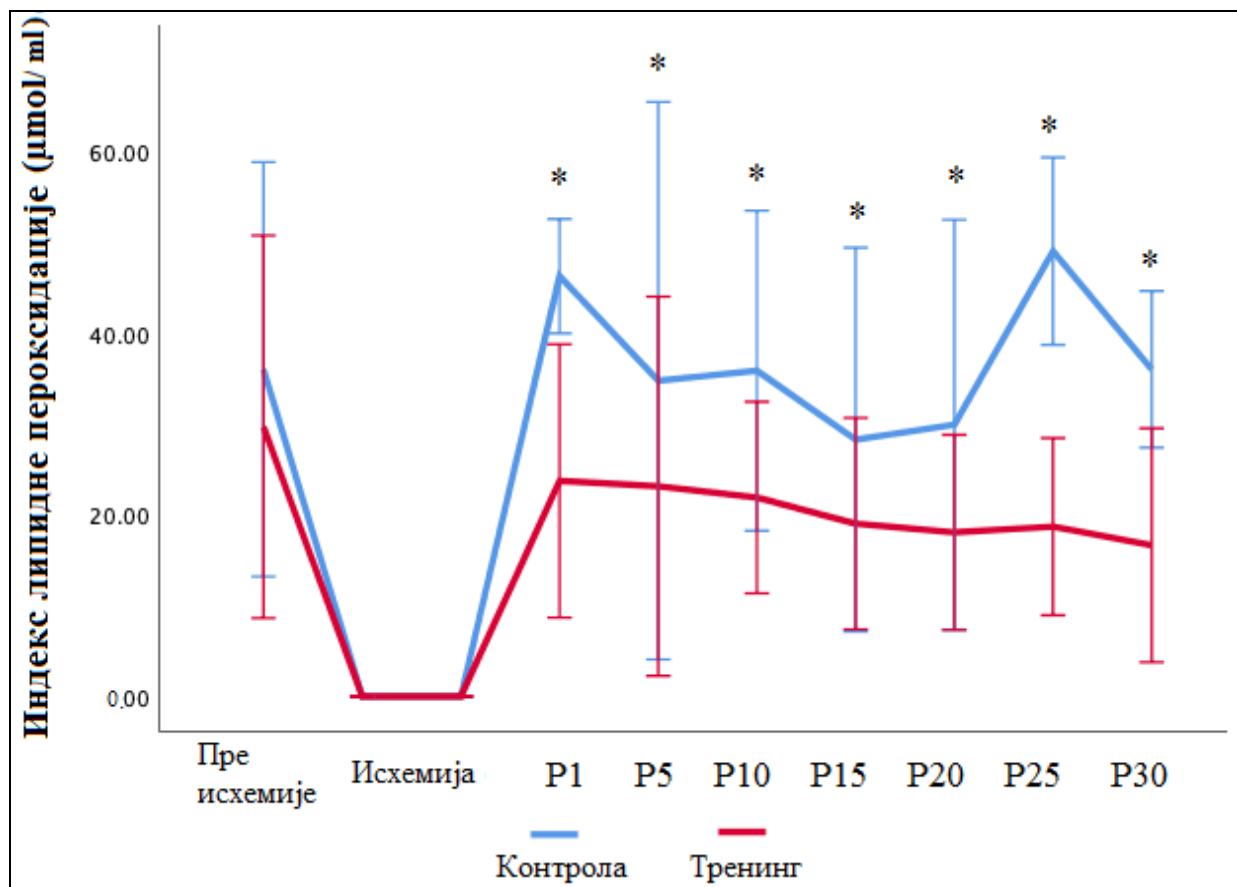
**Табела 11. Динамика промене азот монооксида у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>R1</b>	<b>+8.41</b>	<b>-0.84</b>	<b>-2.54</b>	<b>+5.46</b>	<b>-7.04</b>	<b>+0.46</b>	<b>+6.62</b>	<b>+4.03</b>
<b>R5</b>	<b>+5.18</b>	<b>+0.68</b>	<b>+0.85</b>	<b>-7.49</b>	<b>-6.95</b>	<b>-3.91</b>	<b>-4.45</b>	<b>-4.36</b>
<b>R10</b>	<b>+24.92</b>	<b>+7.37</b>	<b>+0.06</b>	<b>-15.65</b>	<b>-12.97</b>	<b>-6.16</b>	<b>-8.22</b>	<b>-9.13</b>
<b>R15</b>	<b>+46.88</b>	<b>+4.19</b>	<b>-4.99</b>	<b>-13.25</b>	<b>-18.20</b>	<b>-9.18</b>	<b>-18.85</b>	<b>-14.76</b>
<b>R20</b>	<b>+31.24</b>	<b>+0.21</b>	<b>-7.93</b>	<b>-10.11</b>	<b>-19.28</b>	<b>-7.02</b>	<b>-13.98</b>	<b>-12.12</b>
<b>R25</b>	<b>+36.21</b>	<b>+15.16</b>	<b>-22.28</b>	<b>-10.10</b>	<b>-21.57</b>	<b>-9.37</b>	<b>-14.17</b>	<b>-16.68</b>
<b>R30</b>	<b>+21.68</b>	<b>-3.46</b>	<b>-19.40</b>	<b>-18.13</b>	<b>-24.93</b>	<b>-12.00</b>	<b>-16.50</b>	<b>-13.58</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*

#### **4.4.4. Утицај прекондиционирања миокарда тренингом и фармаколошког прекондиционирања на концентрацију TBARS-а**

Вредности индекса липидне пероксидације мереног као TBARS су статистички значајно промењене у Тренинг групи и то и смислу снижавања ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг) (Графикон бр. 49).

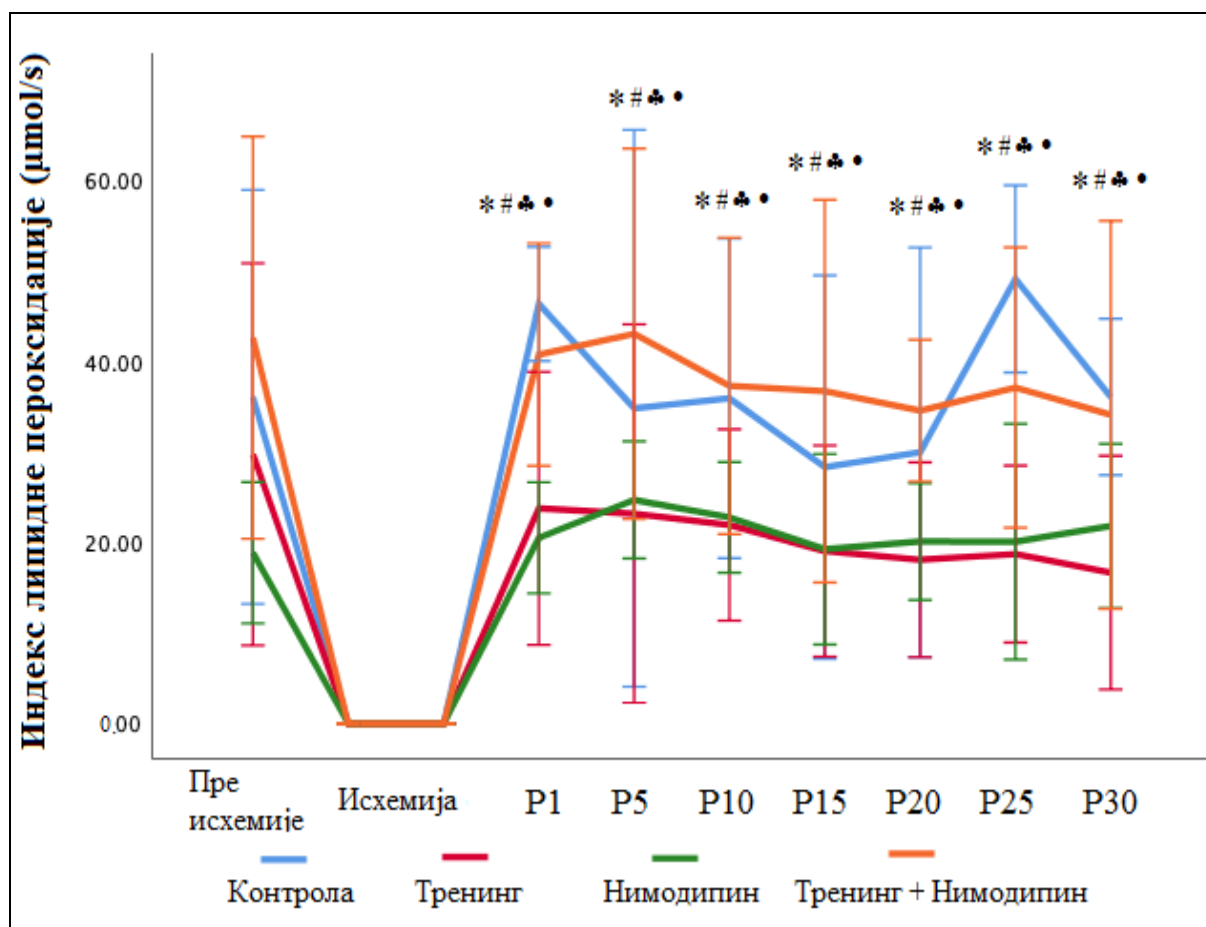


**Графикон бр. 49. Утицај прекондиционарања миокарда физичким тренингом на вредности индекса липидне пероксидације мерен као TBARS (µmol/s)**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је Mann-Whitney тестом

\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група.

Вредности индекса липидне пероксидације мереног као TBARS су статистички значајно промењене у Нимодипин групи и Тренинг групи и то и смислу снижавања у поређењу са остале две групе ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола, Тренинг+Нимодипин група vs. Тренинг група, Нимодипин група) (Графикон бр. 50).

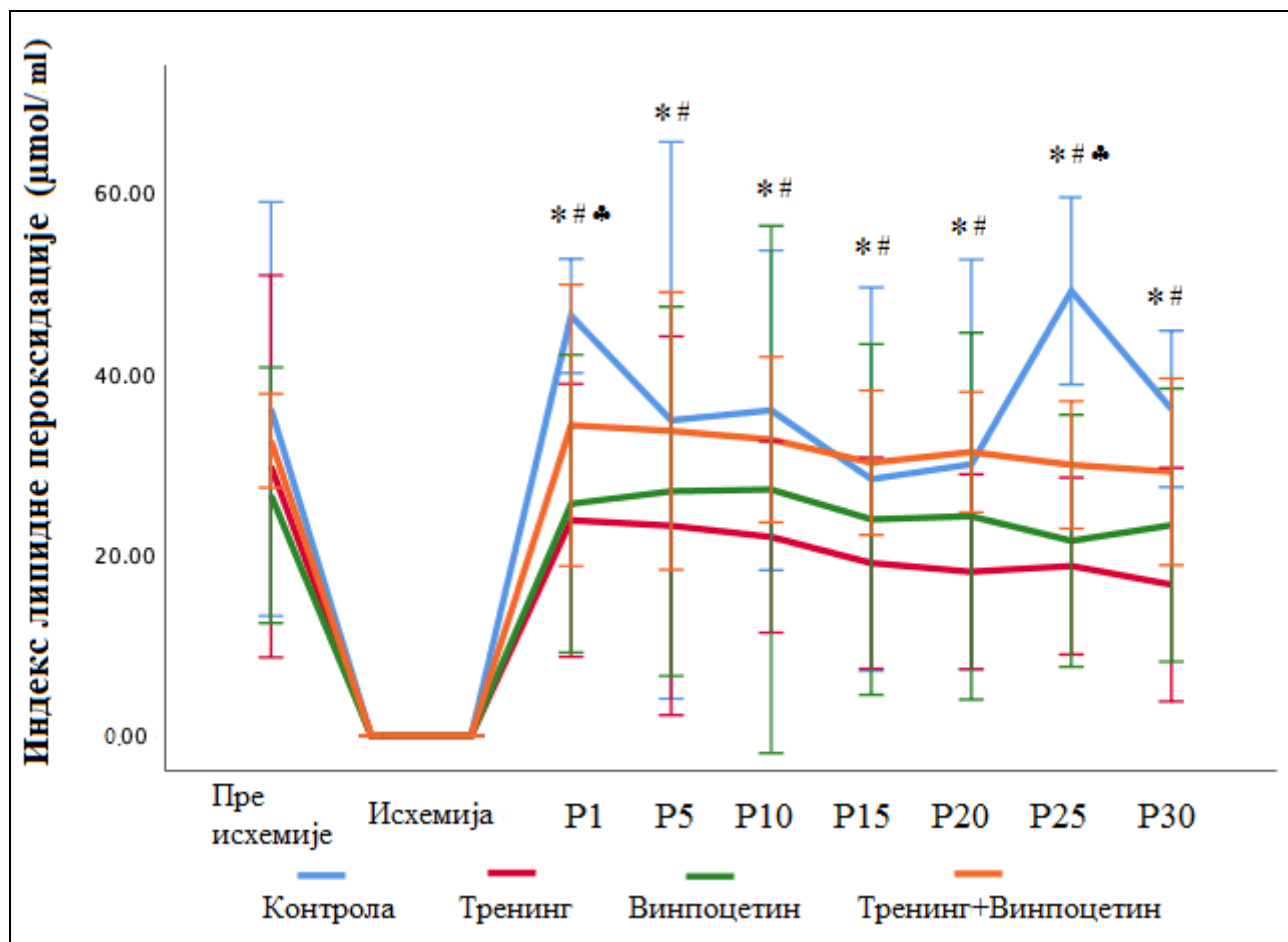


**Графикон бр. 50. Утицај прекондиционирања миокарда нимодипином на вредности индекса липидне пероксидације мерен као TBARS ( $\mu\text{mol/s}$ )**

Прикази резултати у виду  $X \pm \text{SEM}$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

- \*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,
- #  $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Тренинг група,
- $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Нимодипин група.

Вредности индекса липидне пероксидације мереног као TBARS биле су статистички значајно снижене у Винпоцетин групи и Тренинг групи у поређењу са остале две групе у свим тачкама реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг група, Винпоцетин група,  $p < 0,05 = P1, P25$  Контрола vs. Тренинг+Винпоцетин група) (Графикон бр. 51).



**Графикон бр. 51. Утицај прекондиционирања миокарда винпоцетином на вредности индекса липидне пероксидације мерен као TBARS ( $\mu\text{mol/s}$ )**

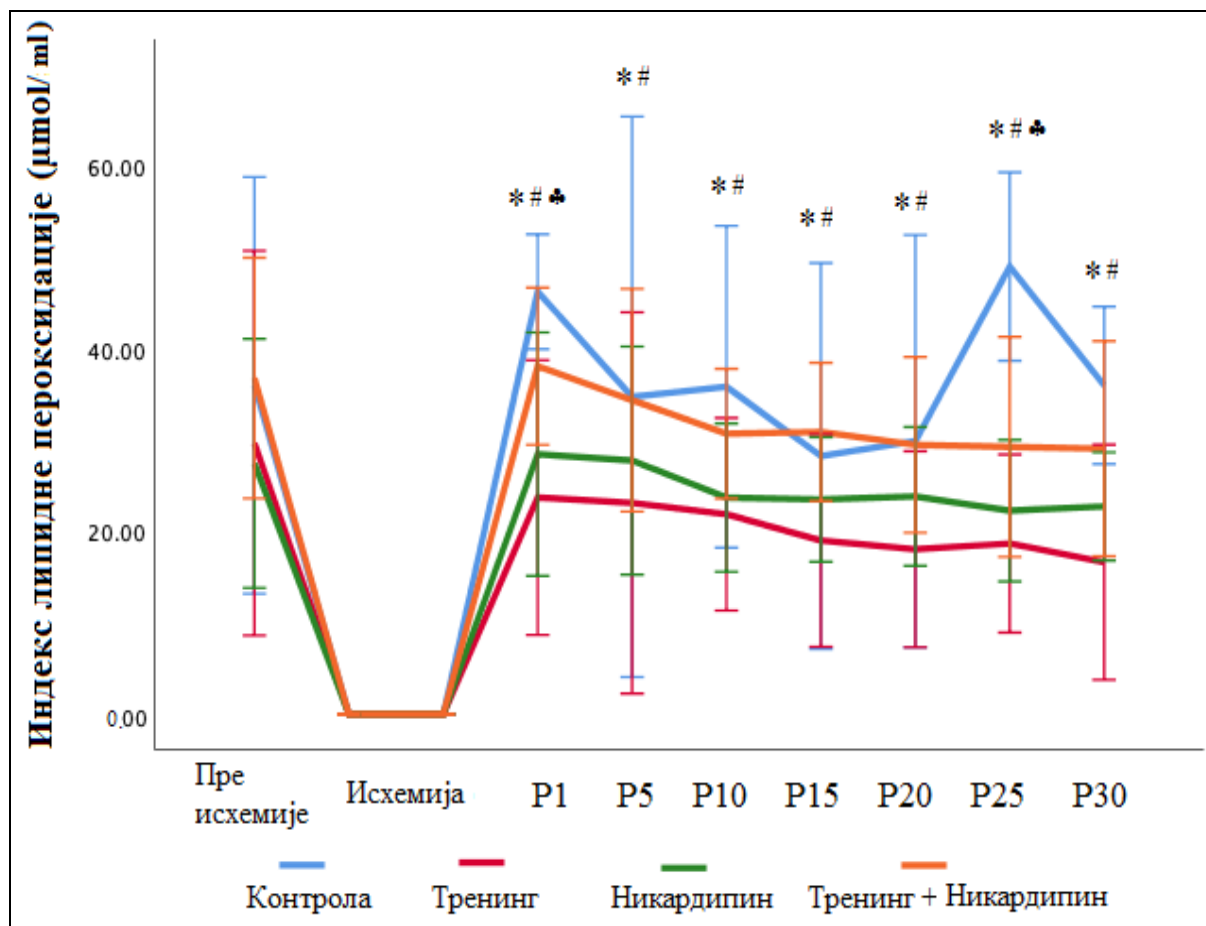
Прикази резултати у виду  $X \pm \text{SEM}$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+Винпоцетин група.

Вредности индекса липидне пероксидације мереног као TBARS биле су статистички значајно снижене у Никардипин групи и Тренинг групи у поређењу са контролном групом у свим тачкама реперфузије, као и у Тренинг+Никардипини групи у појединим тачкама реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Тренинг група, Никардипин група;  $p < 0,05 = P1, P25$  Контрола vs. Тренинг+Никардипин група) (Графикон бр. 52).



**Графикон бр. 52. Утицај прекондиционирања миокарда никардипином на вредности индекса липидне пероксидације мерен као TBARS ( $\mu\text{mol/s}$ )**

Прикази резултати у виду  $X \pm \text{SEM}$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Тренинг+ Никардипин група.

Динамика промене индекса липидне пероксидације у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра је интересантна. Никардипин самостално другачије делује на вредности овог маркера него у комбинацији са тренингом, односно самостално повећава а у комбинованој примени снижава концентрацију TBARS. Остали испитивани инхибитори, такође у комбинацији са тренингом делују више антиоксидационо, али у мањој мери од никардипина (Табела 12).

**Табела 12. Динамика промене индекса липидне пероксидације у свим групама појединачно у различитим моментима реперфузије (P1-P30) у односу на почетне вредности овог параметра (пре исхемије)**

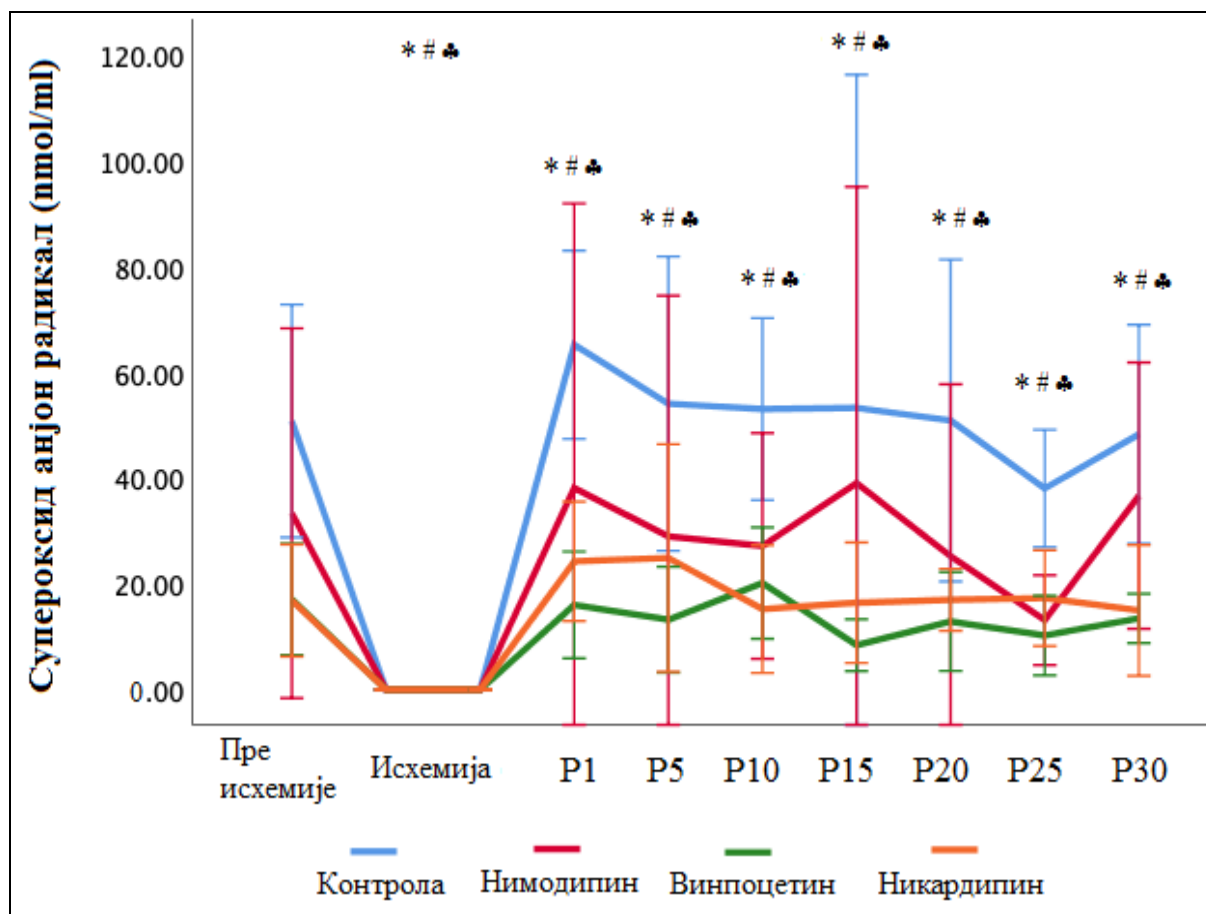
Тачка мерења	Група							
	Контролна група (%)	Нимодипин (%)	Винпоцетин (%)	Никардипин (%)	Тренинг (%)	Тренинг+ Нимодипин (%)	Тренинг+ Винпоцетин (%)	Тренинг+ Никардипин (%)
<b>P1</b>	<b>+28.47</b>	<b>+8.73</b>	<b>-6.14</b>	<b>+38.86</b>	<b>-13.72</b>	<b>-7.40</b>	<b>+9.58</b>	<b>+3.13</b>
<b>P5</b>	<b>-3.47</b>	<b>+30.93</b>	<b>-1.94</b>	<b>+30.36</b>	<b>-16.46</b>	<b>-5.09</b>	<b>+1.89</b>	<b>-6.13</b>
<b>P10</b>	<b>-0.43</b>	<b>+20.68</b>	<b>-4.25</b>	<b>+15.85</b>	<b>-22.00</b>	<b>-14.92</b>	<b>+0.68</b>	<b>-12.52</b>
<b>P15</b>	<b>-21.47</b>	<b>+2.04</b>	<b>-12.92</b>	<b>+13.82</b>	<b>-27.23</b>	<b>-16.48</b>	<b>-0.93</b>	<b>-13.73</b>
<b>P20</b>	<b>-16.92</b>	<b>+6.57</b>	<b>-13.19</b>	<b>+16.33</b>	<b>-27.90</b>	<b>-18.69</b>	<b>-8.51</b>	<b>-15.42</b>
<b>P25</b>	<b>+36.11</b>	<b>+6.45</b>	<b>-22.18</b>	<b>+8.69</b>	<b>-31.92</b>	<b>-15.48</b>	<b>-11.49</b>	<b>-16.58</b>
<b>P30</b>	<b>0.00</b>	<b>+15.61</b>	<b>-16.54</b>	<b>+10.61</b>	<b>-38.20</b>	<b>-21.56</b>	<b>-14.54</b>	<b>-16.63</b>

*Резултати су приказани као процентуална вредност (%) опоравка у фази реперфузије*



#### 4.4.5. Поређење ефеката прекондиционарања миокарда инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове на маркере оксидационог стреса у ефлуенту

Нивои супероксид анјон радикала су били статистички значајно снижени под утицајем сва три тестирана инхибитора PDE1 код нетренираних пацова ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Нимодипин група, Винпоцетин група, Никардипин група) (Графикон бр. 53).



Графикон бр. 53. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на ниво супероксид анјон радикала

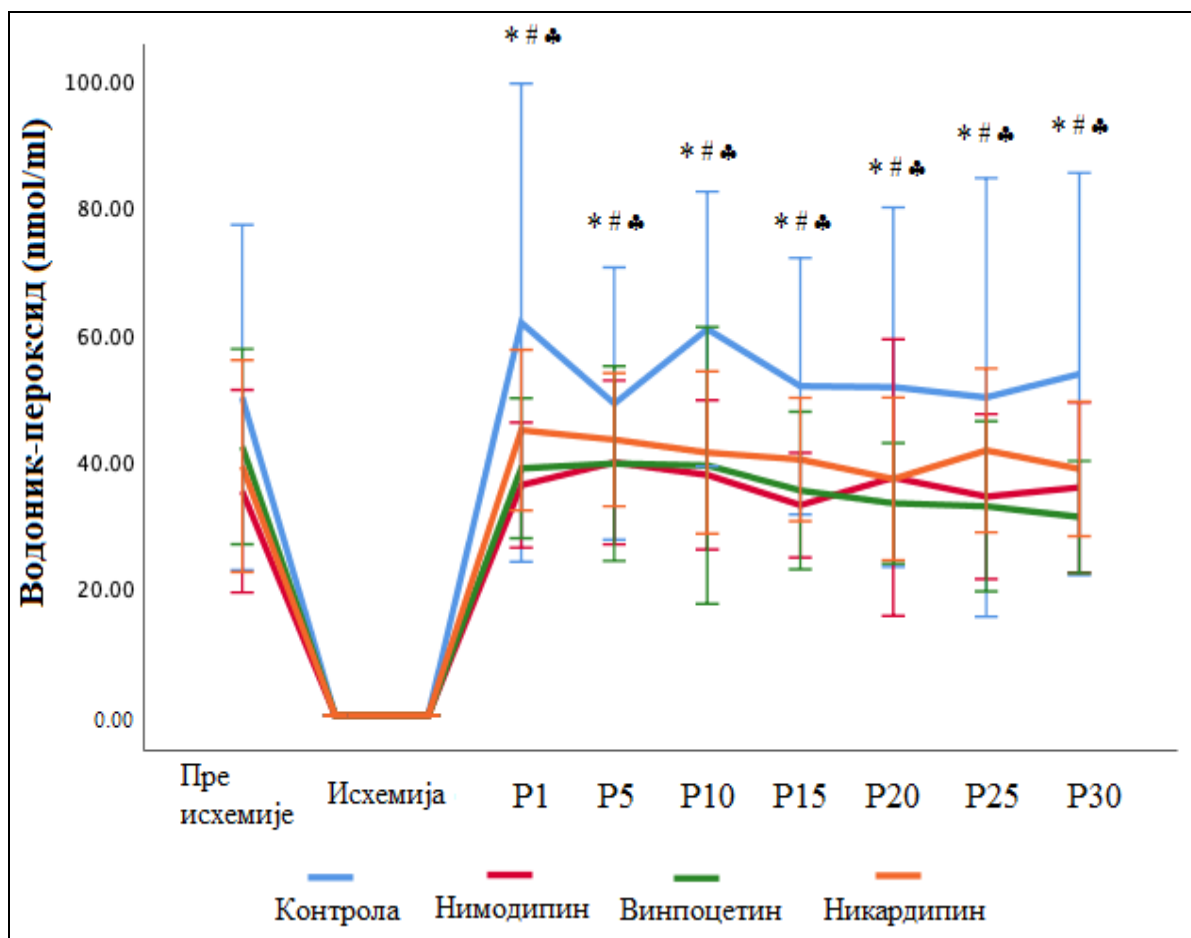
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група.

Нивои водоник-пероксида су били статистички значајно снижени под утицајем сва три тестирана инхибиора PDE1 код нетренираних пацова ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Нимодипин група, Винпоцетин група, Никардипин група) (Графикон бр. 54).



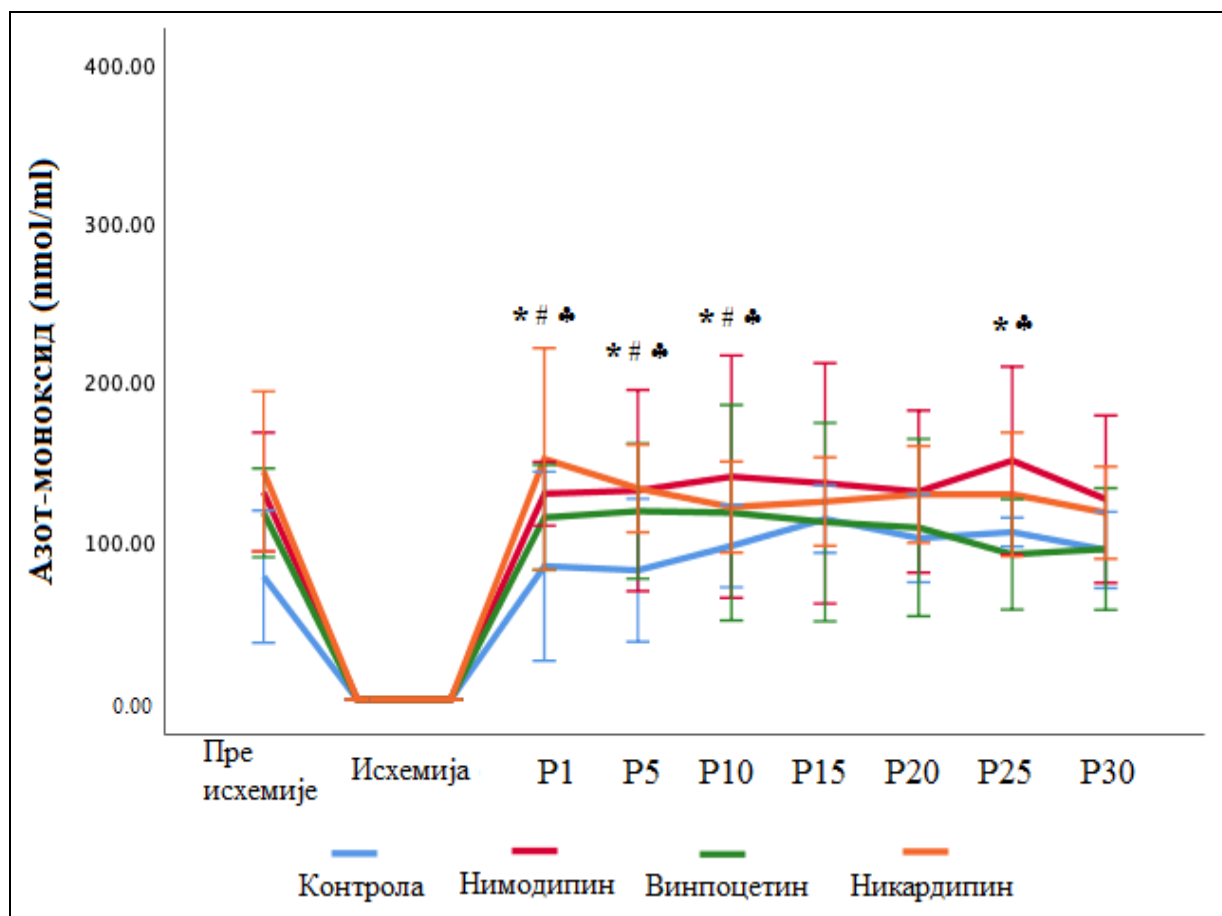
**Графикон бр. 54. Ефекти преконачионарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на ниво водоник-пероксида**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

- \*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група,
- #  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,
- ♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група.

Нивои азот-моноксида су били статистички значајно повишени под утицајем сва три тестирана инхибитора PDE1 код нетренираних пацова у почетку реперфузије, а

касније само под утицајем нимодипина и никардипина ( $p < 0,05 = P1-P10$  Контрола vs. Нимодипин група, Винпоцетин група, Никардипин група;  $p < 0,05 = P25$  Контрола vs. Нимодипин група, Никардипин група) (Графикон бр. 55).



**Графикон бр. 55. Ефекти прекондиционирања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на ниво азот-моноксида**

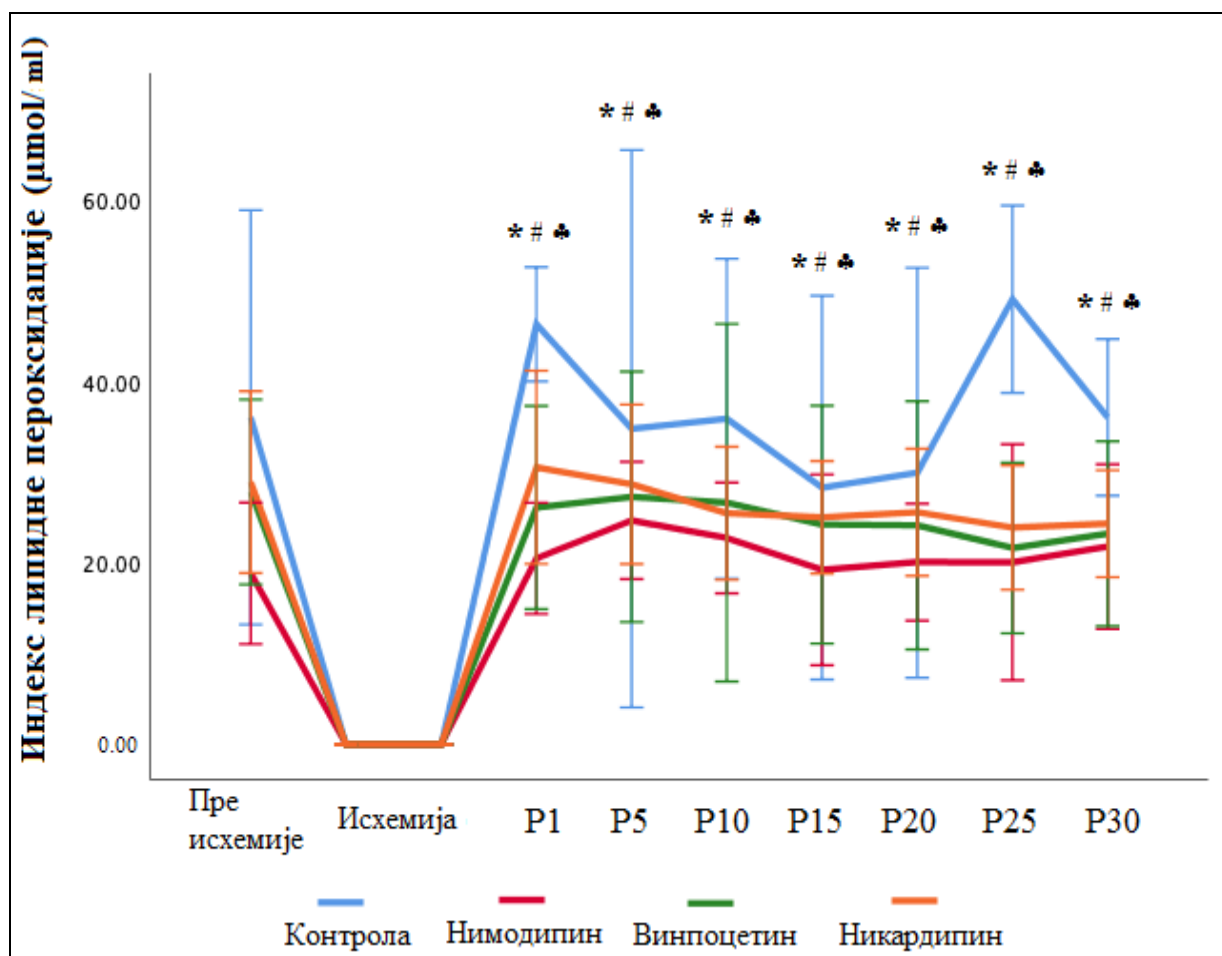
Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група.

Нивои индекса липидне пероксидације су били статистички значајно снижени под утицајем сва три тестирана инхибитора PDE1 код нетренираних пацова током реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P30$  Контрола vs. Нимодипин група, Винпоцетин група, Никардипин група) (Графикон бр. 56).



**Графикон бр. 56. Ефекти прекондиционирања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних пацова на ниво индекса липидне пероксидације**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

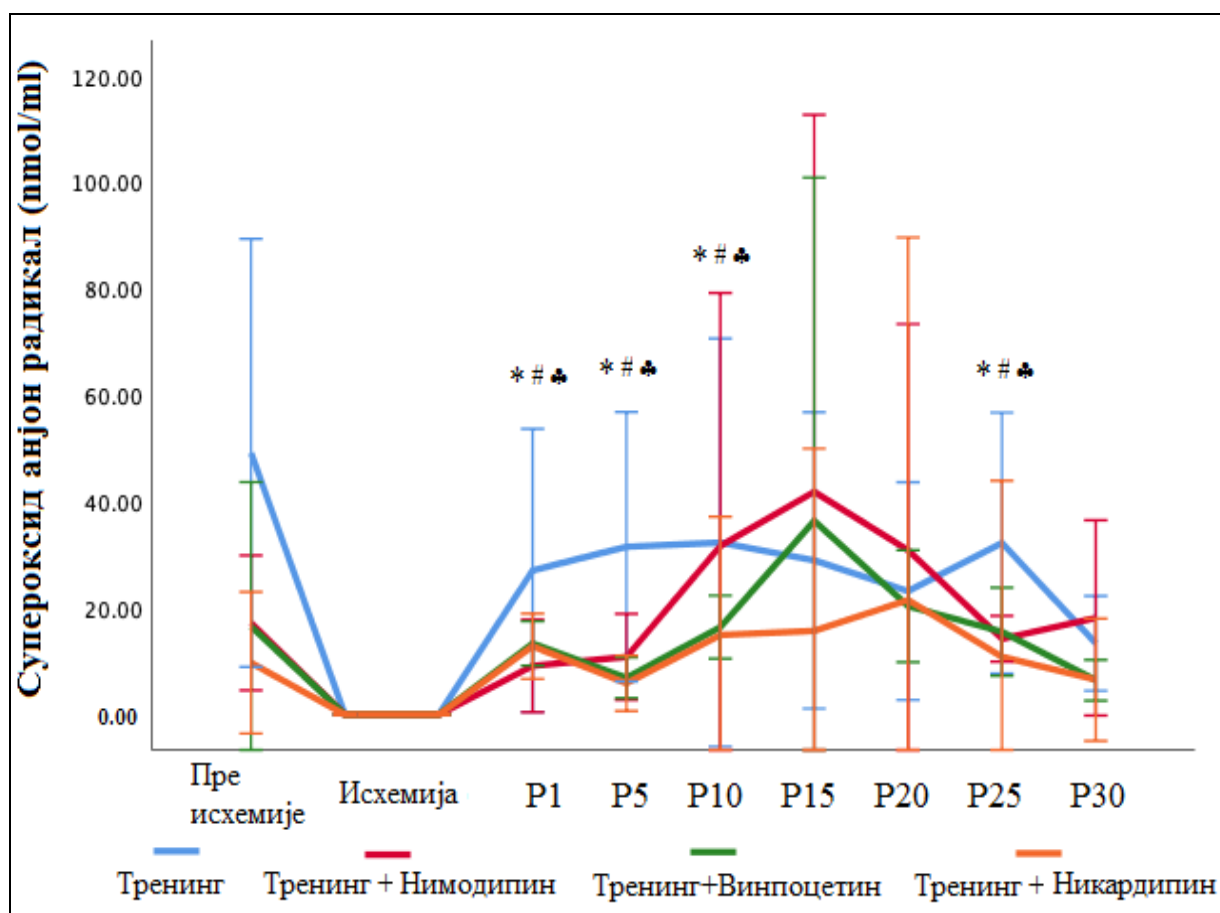
\* $p < 0,05$  Контролна група vs. Нимодипин група,

#  $p < 0,05$  Контролна група vs. Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Контролна група vs. Никардипин група.

#### 4.4.6. Поређење ефеката прекондиционарања миокарда инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у комбинацији са физичким тренингом у односу на контролне услове на маркере оксидационог стреса у ефлуенту

Код тренираних пацова, нивои супероксид анјон радикала су били статистички значајно нижи под утицајем сва три тестирана инхибитора PDE1 у појединим тачкама реперфузије ( $p < 0,05 = P1-P10$ , P25 Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група, Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+Никардипин група) (Графикон бр. 57).

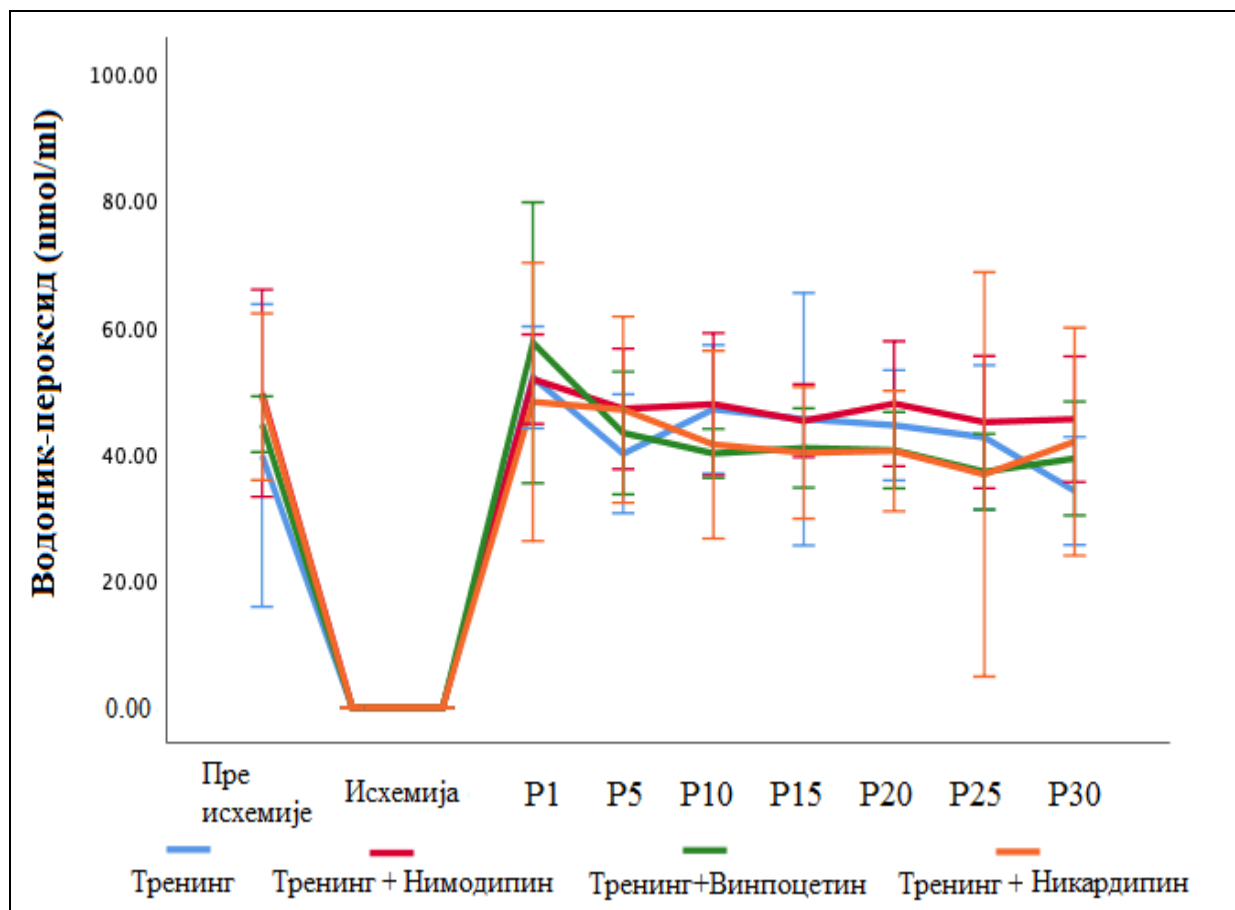


Графикон бр. 57. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на ниво супероксид анјон радикала

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

- \*  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Нимодипин група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Никардипин група.

Код тренираних пацова, нивои водоник-пероксида нису се статистички значајно мењали под утицајем ниједног од три тестирана инхибитора PDE1 у свим тачкама реперфузије у поређењу са контролном Тренинг групом ( $p > 0,05 = P1-P30$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група, Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+Никардипин група) (Графикон бр. 58).

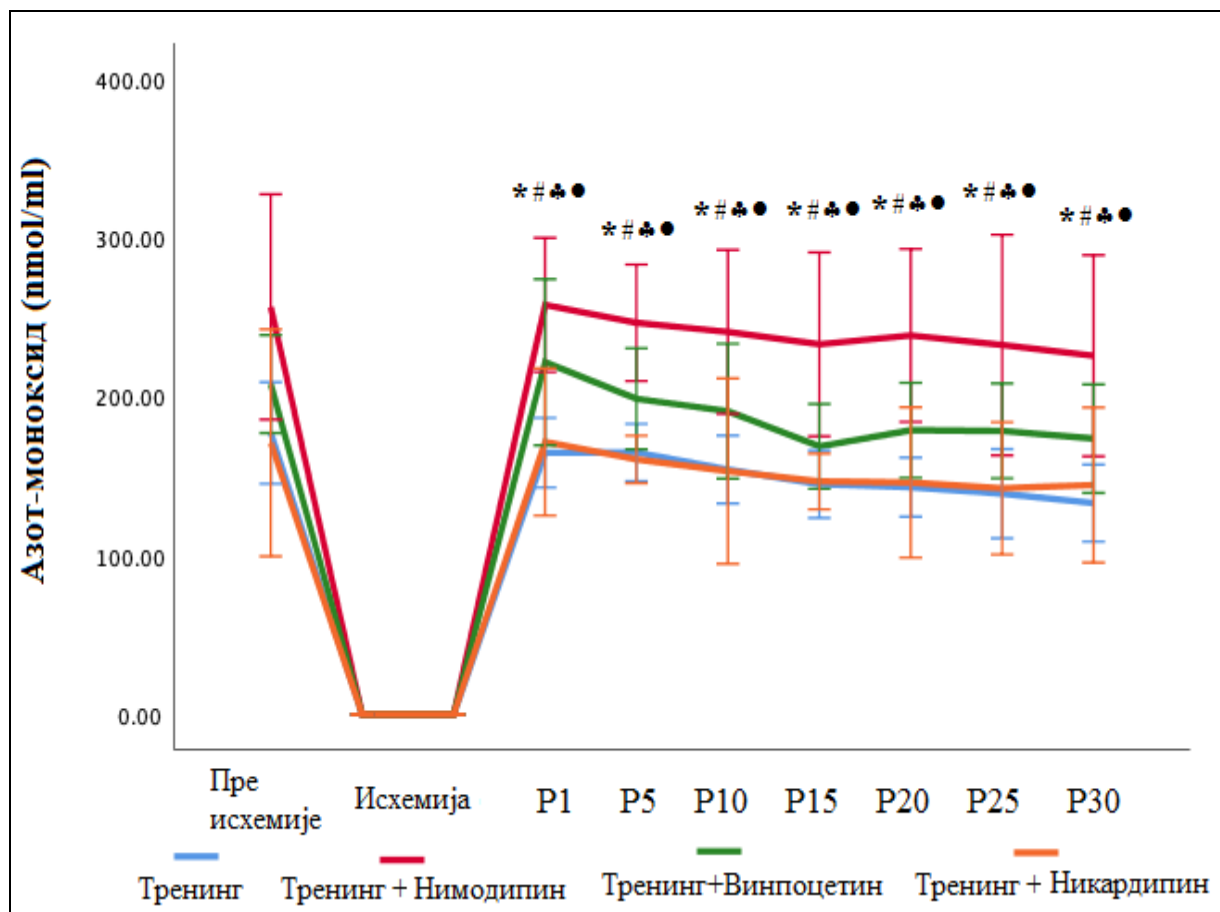


**Графикон бр. 58. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на нивое водоник-пероксида**

*Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).*

Код тренираних пацова, нивои азот-монооксида су били статистички значајно виши под утицајем нимодипина и винпоцетина у свим тачкама реперфузије у поређењу

са контролном Тренинг и Тренинг+Никардипин групом ( $p < 0,05 = P1-P30$  Тренинг група, Тренинг+Никардипин група vs. Тренинг+Нимодипин група, Тренинг+Винпоцетин група) (Графикон бр. 59).

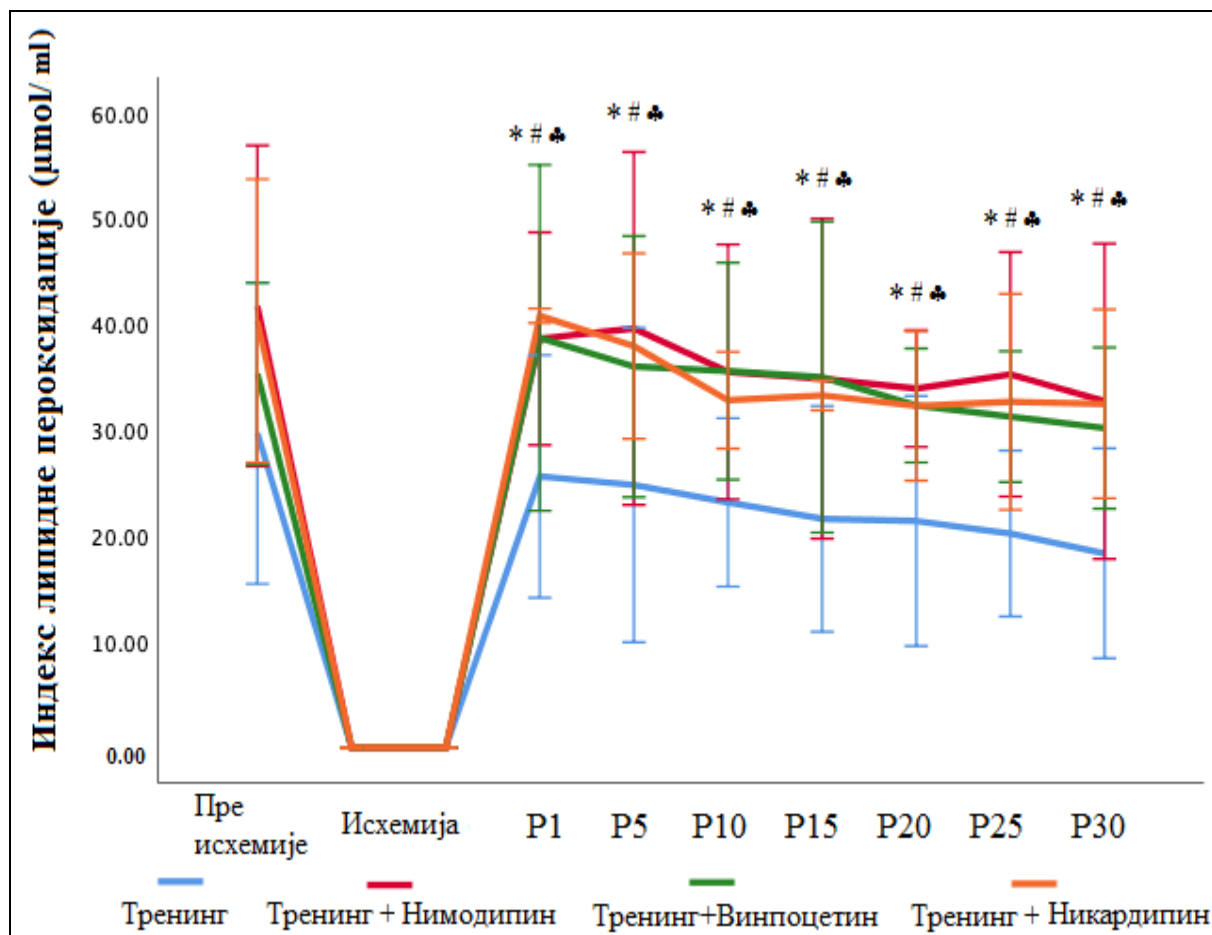


**Графикон бр. 59. Ефекти преко кондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на нивое азот-моноксида**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

- \*  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Нимодипин група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+Винпоцетин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг+ Никардипин група vs. Тренинг+ Нимодипин група,
- $p < 0,05$  Тренинг+ Никардипин група vs. Тренинг+Винпоцетин група.

Код тренираних пацова, нивои индекса липидне пероксидације су били статистички значајно виши под утицајем сва три тестирана фармаколошка агенса код тренираних пацова ( $p < 0,05 = P1-P30$  Тренинг група vs. Тренинг+Нимодипин група, Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+Никардипин група) (Графикон бр. 60).



**Графикон бр. 60. Ефекти преконачионарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код тренираних пацова на ниво индекса липидне пероксидације**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc).

\*  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Нимодипин група,

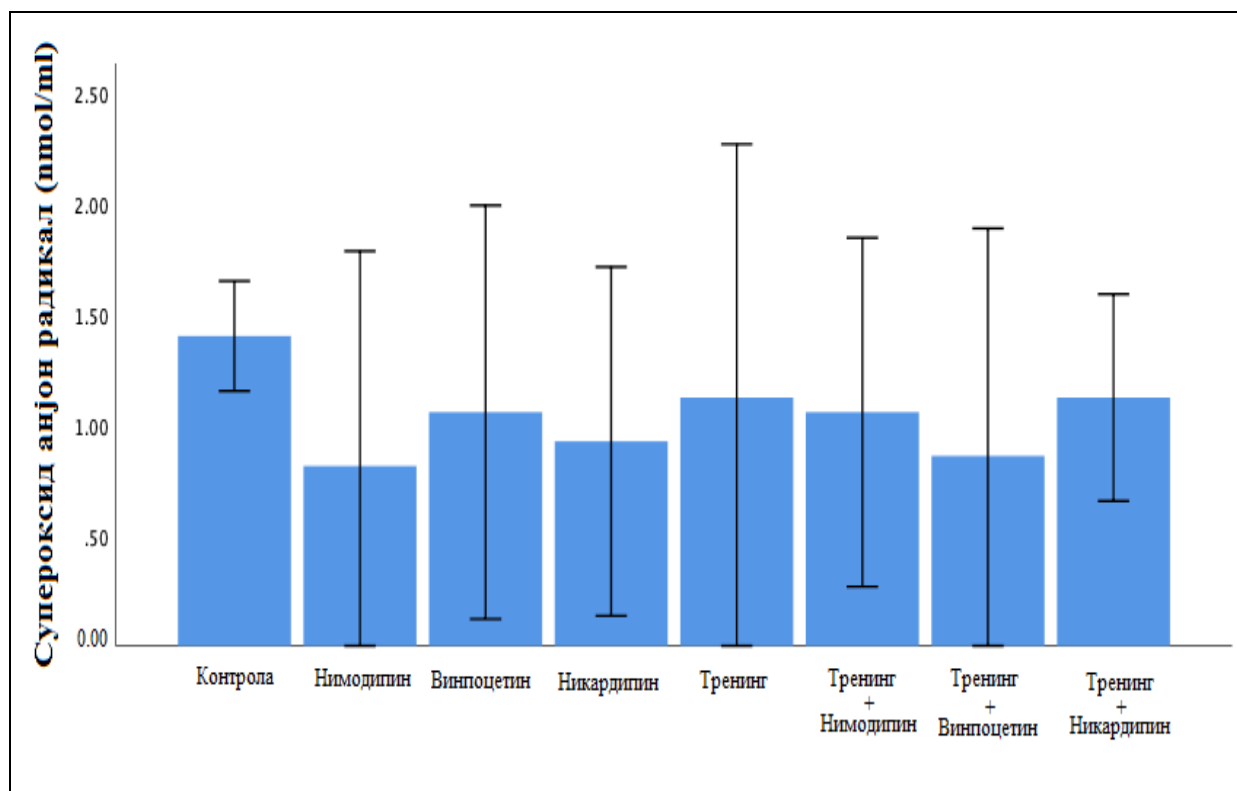
#  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Винпоцетин група,

♣  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Тренинг+ Никардипин група.



**4.5. Утицај прекондиционарања миокарда тренингом и различитим инхибиторима фосфодиестеразе (PDE1) на вредности маркера оксидационог стреса у крви пацова**

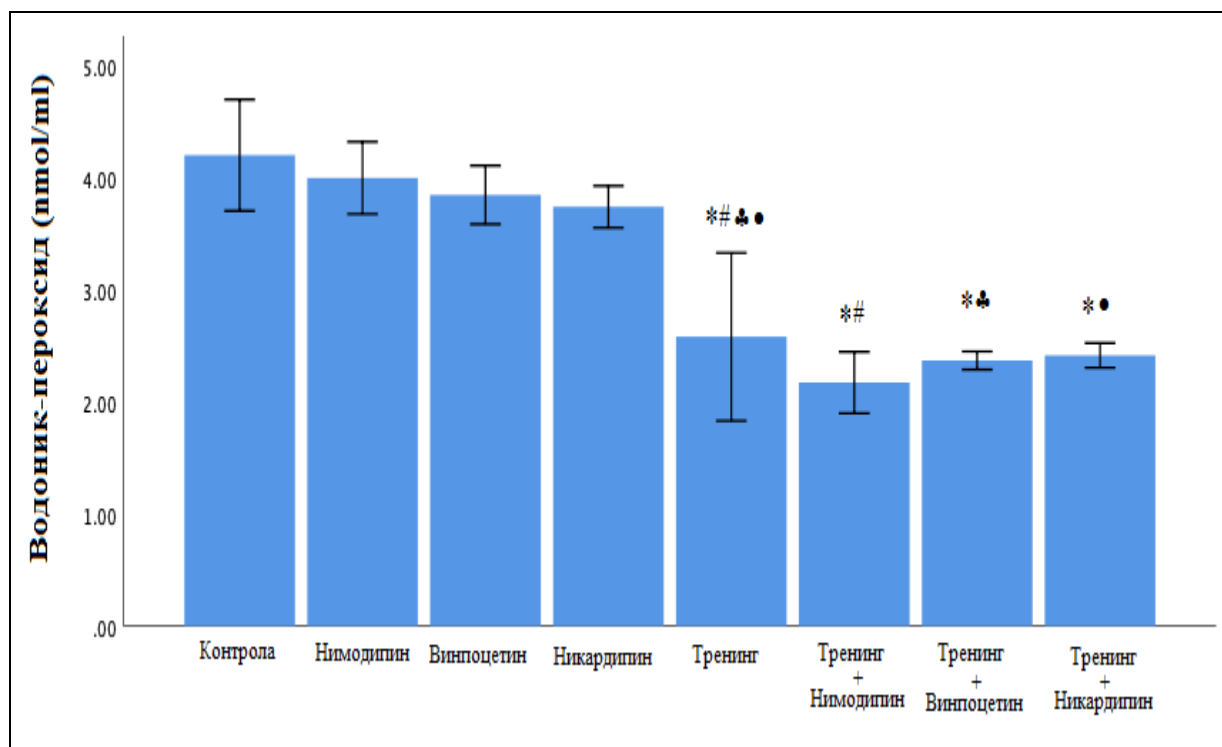
Поређењем група које су биле под различитим третманима уочено је да вредности супероксид анјон радикала нису биле статистички значајно различите у групама (Графикон бр. 61, Табела 13).



**Графикон бр. 61. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних и тренираних пацова на концентрацију супероксид анјон радикала**

*Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc). Статистички праг је утврђен на 0,05.*

Поређењем вредности водоник-пероксида између различитих група уочава се да су те вредности биле статистички значајно различите, и то у Тренинг групи, Тренинг+Нимодипин групи, Тренинг+Винпоцетин групи и Тренинг+Никардипин групи у поређењу са Контролном групом (Графикон бр. 62, Табела 13)

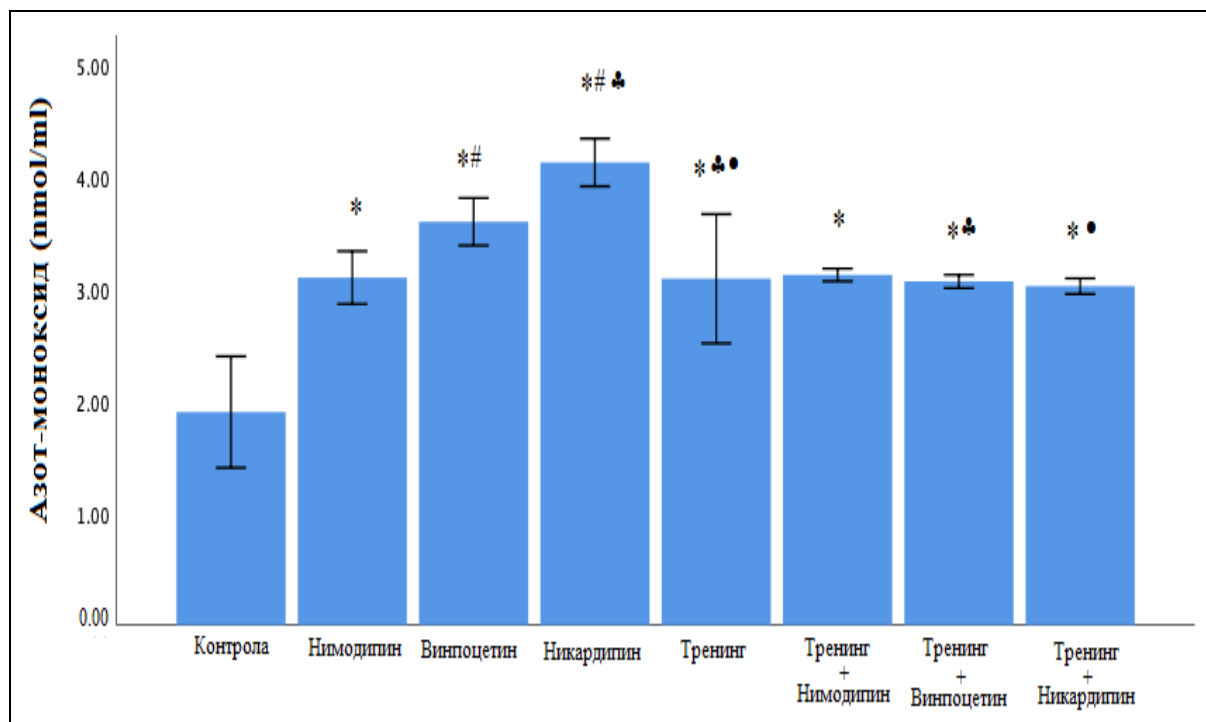


**Графикон бр. 62. Ефекти преконачионарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних и тренираних пацова на концентрацију водоник-пероксида**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc). Статистички праг је утврђен на 0,05.

- \*  $p < 0,05$  Тренинг група, Тренинг+ Нимодипин група, Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+ Никардипин група vs. Контролна група
- #  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Нимодипин група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Нимодипин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Винпоцетин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг+Винпоцетин група vs. Винпоцетин група,
- $p < 0,05$  Тренинг група vs. Никардипин група,
- $p < 0,05$  Тренинг+ Никардипин група vs. Никардипин група,

Поређењем група које су биле под различитим третманима уочено је да су вредности азот-монооксида биле статистички значајно различите у групама, и то у свим групама у поређењу са контролном групом (Графикон бр. 63, Табела 13).

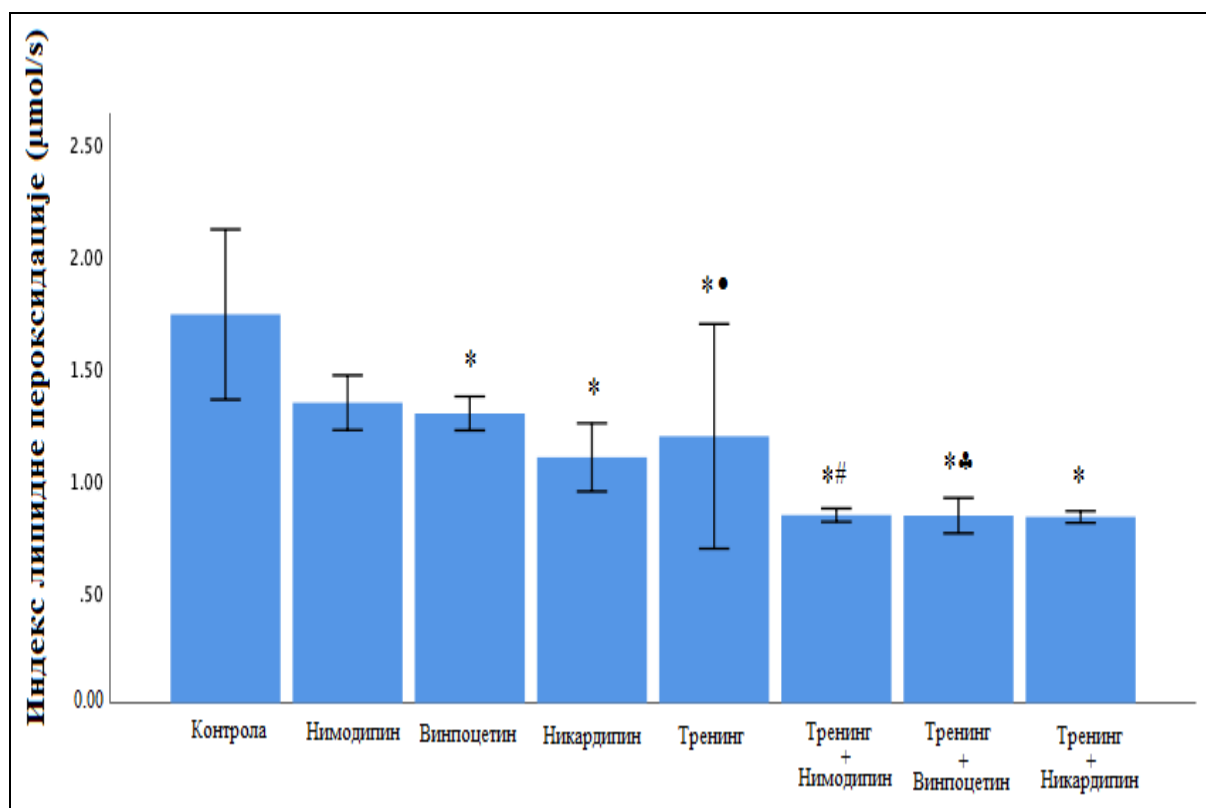


**Графикон бр. 63. Ефекти преко кондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних и тренираних пацова на биорасположивост азот-монооксида**

Прикази резултати у виду  $X \pm \text{СЕМ}$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc). Статистички праг је утврђен на 0,05.

- \*  $p < 0,05$  Нимодипин група, Винпоцетин група, Никардипин група, Тренинг група, Тренинг+Нимодипин група, Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+Никардипин група vs. Контролна група
- #  $p < 0,05$  Винпоцетин група vs. Нимодипин група,
- #  $p < 0,05$  Никардипин група vs. Нимодипин група,
- \*  $p < 0,05$  Никардипин група vs. Винпоцетин група,
- \*  $p < 0,05$  Тренинг група vs. Винпоцетин група,
- \*  $p < 0,05$  Тренинг+Винпоцетин група vs. Винпоцетин група,
- $p < 0,05$  Тренинг група vs. Никардипин група,
- $p < 0,05$  Тренинг+Никардипин група vs. Никардипин група,

Поређењем група, вредности индекса липидне пероксидације су биле статистички значајно различите у групама, и то у Никардипин, Винпоцетин, Тренинг, Тренинг+Нимодипин, Тренинг+Винпоцетин и Тренинг+Никардипин групи у поређењу са Контролном групом (Графикон бр. 64, Табела 13).



**Графикон бр. 64. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних и тренираних пацова на концентрацију индекса липидне пероксидације**

Прикази резултати у виду  $X \pm \text{СЕМ}$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc). Статистички праг је утврђен на 0,05.

- \*  $p < 0,05$  Винпоцетин група, Никардипин група, Тренинг група, Тренинг+ Нимодипин група, Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+ Никардипин група vs. Контролна група
- #  $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Нимодипин група,
- ♣  $p < 0,05$  Тренинг+Винпоцетин група vs. Винпоцетин група,
- $p < 0,05$  Тренинг група vs. Никардипин група,
- $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Нимодипин група,

Међусобним поређењем свих група за сваки параметар одвојено, у Табели 13. су наведене статистичке значајности за свако поређење посебно.

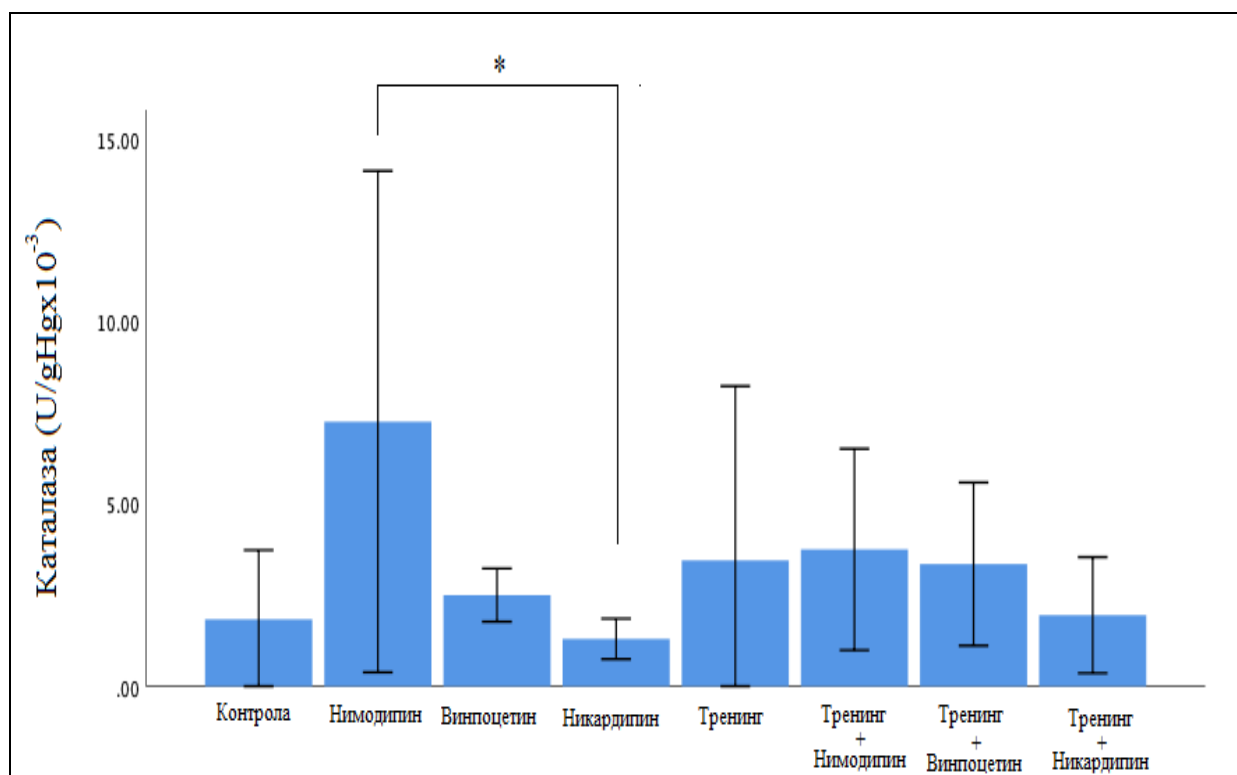
**Табела 13. Статистичке значајности добијене међусобним поређењем вредности супероксид анјон радикала, водоник пероксида, азот монооксида и индекса липидне пероксидације у свим групама**

Група		$O_2^-$	$H_2O_2$	NO	TBARS
Контрола	Нимодипин	0.943	1.000	0.000	0.075

	Винпоцетин	0.997	1.000	0.000	0.022
	Никардипин	0.976	1.000	0.000	0.000
	Тренинг	0.999	0.039	0.000	0.003
	Тренинг+ Нимодипин	0.997	0.002	0.000	0.000
	Тренинг+ Винпоцетин	0.953	0.009	0.000	0.000
	Тренинг+ Никардипин	0.999	0.013	0.000	0.000
Нимодипин	Контрола	0.943	1.000	0.000	0.075
	Винпоцетин	0.999	1.000	0.026	1.000
	Никардипин	1.000	0.994	0.000	0.395
	Тренинг	0.997	0.004	1.000	0.877
	Тренинг+ Нимодипин	0.999	0.000	1.000	0.002
	Тренинг+ Винпоцетин	1.000	0.001	1.000	0.002
	Тренинг+ Никардипин	0.997	0.001	0.999	0.002
Винпоцетин	Контрола	0.997	1.000	0.000	0.022
	Нимодипин	0.999	1.000	0.026	1.000
	Никардипин	1.000	1.000	0.009	0.591
	Тренинг	1.000	0.008	0.013	0.976
	Тренинг+ Нимодипин	1.000	0.000	0.023	0.004
	Тренинг+ Винпоцетин	1.000	0.001	0.008	0.004
	Тренинг+ Никардипин	1.000	0.002	0.003	0.003
Никардипин	Контрола	0.976	1.000	0.000	0.000
	Нимодипин	1.000	0.994	0.000	0.395
	Винпоцетин	1.000	1.000	0.009	0.591
	Тренинг	1.000	0.018	0.000	0.985
	Тренинг+ Нимодипин	1.000	0.001	0.000	0.261
	Тренинг+ Винпоцетин	1.000	0.003	0.000	0.253
	Тренинг+ Никардипин	1.000	0.005	0.000	0.229
Тренинг	Контрола	0.999	0.039	0.000	0.003
	Нимодипин	0.997	0.004	1.000	0.877
	Винпоцетин	1.000	0.008	0.013	0.976
	Никардипин	1.000	0.018	0.000	0.985
	Тренинг+ Нимодипин	1.000	0.891	1.000	0.043
	Тренинг+ Винпоцетин	0.998	0.997	1.000	0.041
	Тренинг+ Никардипин	1.000	0.999	1.000	0.036
Тренинг+ Нимодипин	Контрола	0.997	0.002	0.000	0.000
	Нимодипин	0.999	0.000	1.000	0.002
	Винпоцетин	1.000	0.000	0.023	0.004
	Никардипин	1.000	0.001	0.000	0.261
	Тренинг	1.000	0.891	1.000	0.043
	Тренинг+ Винпоцетин	1.000	0.998	1.000	1.000
	Тренинг+ Никардипин	1.000	0.993	0.994	1.000
Тренинг+ Винпоцетин	Контрола	0.953	0.009	0.000	0.000
	Нимодипин	1.000	0.001	1.000	0.002
	Винпоцетин	1.000	0.001	0.008	0.004
	Никардипин	1.000	0.003	0.000	0.253
	Тренинг	0.998	0.997	1.000	0.041
	Тренинг+ Нимодипин	1.000	0.998	1.000	1.000
	Тренинг+ Никардипин	0.998	1.000	1.000	1.000
Тренинг+ Никардипин	Контрола	0.999	0.013	0.000	0.000
	Нимодипин	0.997	0.001	0.999	0.002
	Винпоцетин	1.000	0.002	0.003	0.003
	Никардипин	1.000	0.005	0.000	0.229
	Тренинг	1.000	0.999	1.000	0.036
	Тренинг+ Нимодипин	1.000	0.993	0.994	1.000
	Тренинг+ Винпоцетин	0.998	1.000	1.000	1.000

**Утицај прекондиционарања миокарда тренингом и различитим инхибиторима фосфодиестеразе (PDE1) на вредности одабраних параметара система антиоксидационе заштите**

Поређењем експерименталних група применом одговарајуће статистичке анализе, утврђена је значајна разлика у активности ензима каталазе између Никардипин и Нимодипин групе (Графикон бр. 65, Табела 14).

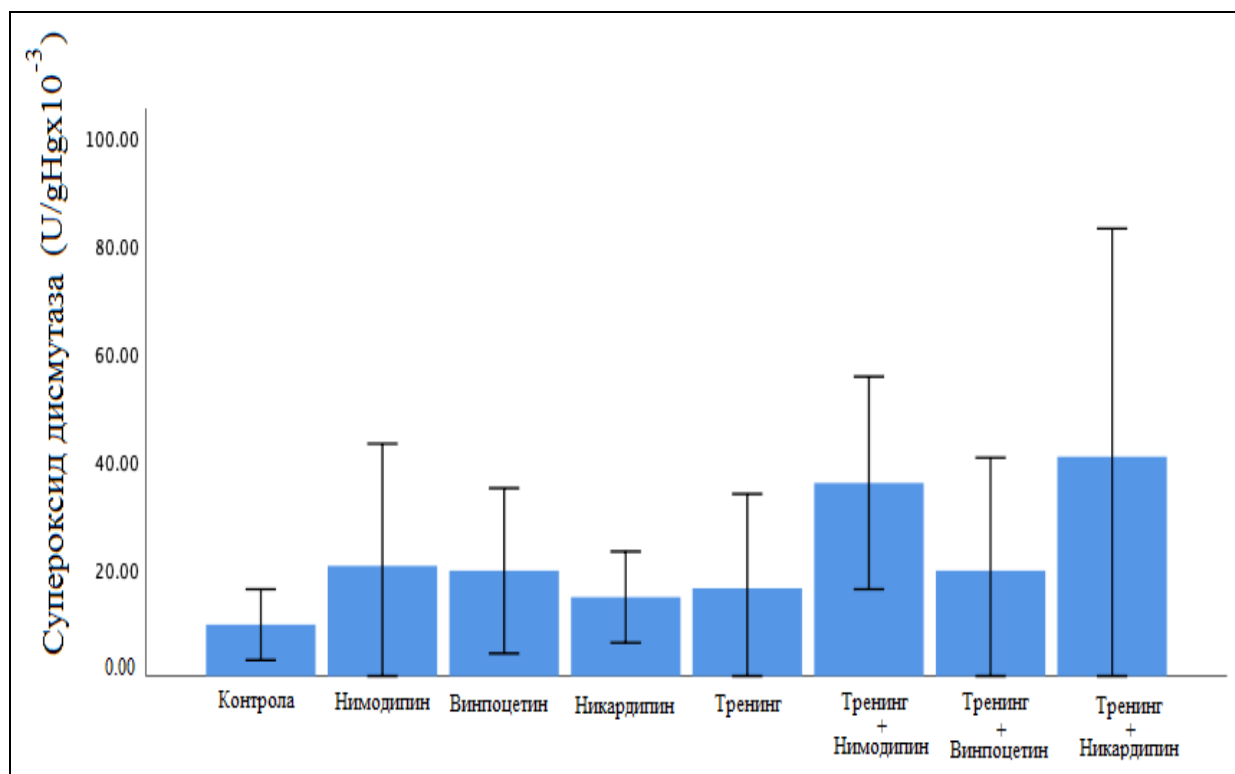


**Графикон бр. 65. Ефекти прекондиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних и тренираних пацова на активност ензима каталазе**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc). Статистички праг је утврђен на 0,05.

\* $p < 0,05$  Нимодипин vs. Никардипин група

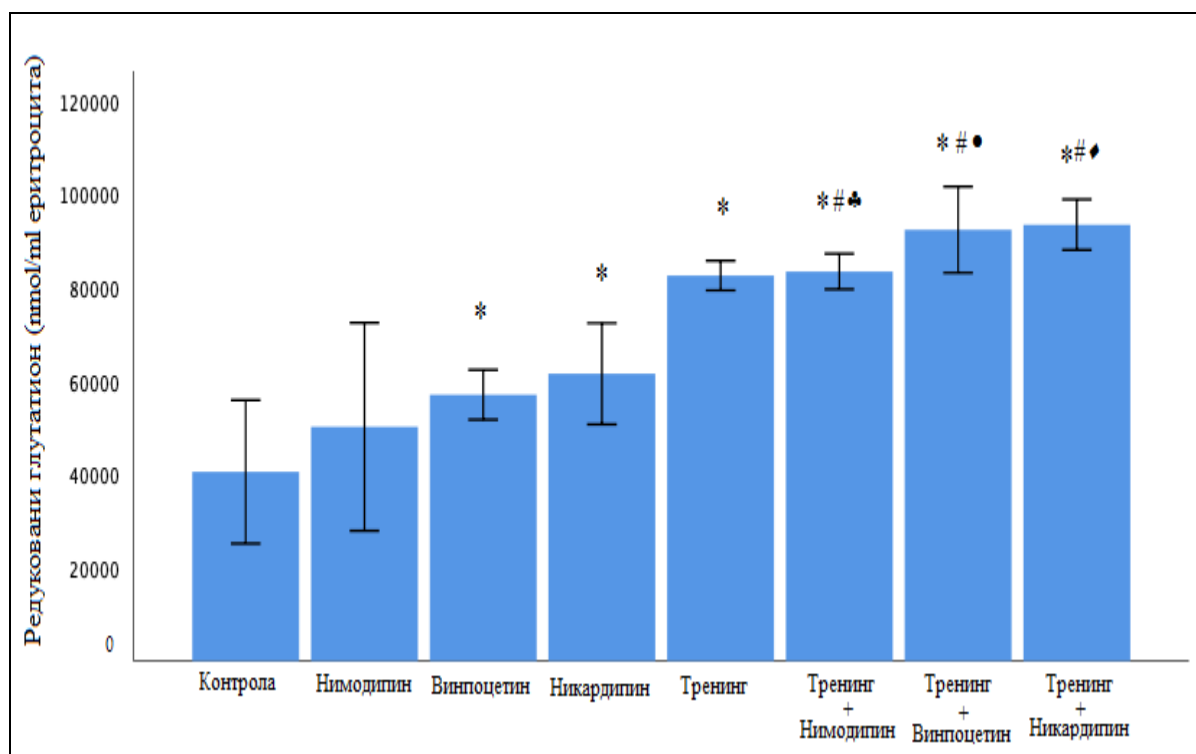
Међусобним поређењем експерименталних група применом одговарајуће статистичке анализе, није утврђена статистички значајна разлика у активности ензима супероксид дисмутазе (Графикон бр. 66, Табела 14).



**Графикон бр. 66. Ефекти прекодиционарања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних и тренираних пацова на активност ензима супероксид дисмутазе**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc). Статистички праг је утврђен на 0,05.

Поређењем експерименталних група, утврђена је статистички значајна разлика у концентрацији редукованог глутатиона између Никардипин, Винпоцетин, Тренинг, Тренинг+Никардипин, Тренинг+Винпоцетин, Тренинг+ Нимодипин група са Контролном групом. Сви примењени третмани су значајно повећавали концентрацију редукованог глутатиона (Графикон бр. 67, Табела 14).



**Графикон бр. 67. Ефекти прекондиционирања миокарда различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у односу на контролне услове код седентарних и тренираних пацова на концентрацију редукованог глутатиона**

Прикази резултати у виду  $X \pm SEM$ . Статистичка анализа спроведена је АНОВА тестом (Tukey HSD post hoc). Статистички праг је утврђен на 0,05.

- \*  $p < 0,05$  Винпоцетин група, Никардипин група, Тренинг група, Тренинг+ Нимодипин група, Тренинг+Винпоцетин група, Тренинг+ Никардипин група vs. Контролна група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Тренинг група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг+ Винпоцетин група vs. Тренинг група,
- #  $p < 0,05$  Тренинг+ Никардипин група vs. Тренинг група,
- $p < 0,05$  Тренинг+ Нимодипин група vs. Нимодипин група,
- $p < 0,05$  Тренинг+ Винпоцетин група vs. Винпоцетин група,
- ♦  $p < 0,05$  Тренинг+ Никардипин група vs. Никардипин група.

У Табели 14 су приказани резултати статистичке анализе са статистичким значајностима након међусобног поређења свих група применом ANOVA теста (Tukey post hoc) и нивоа значајности  $p < 0,05$ .



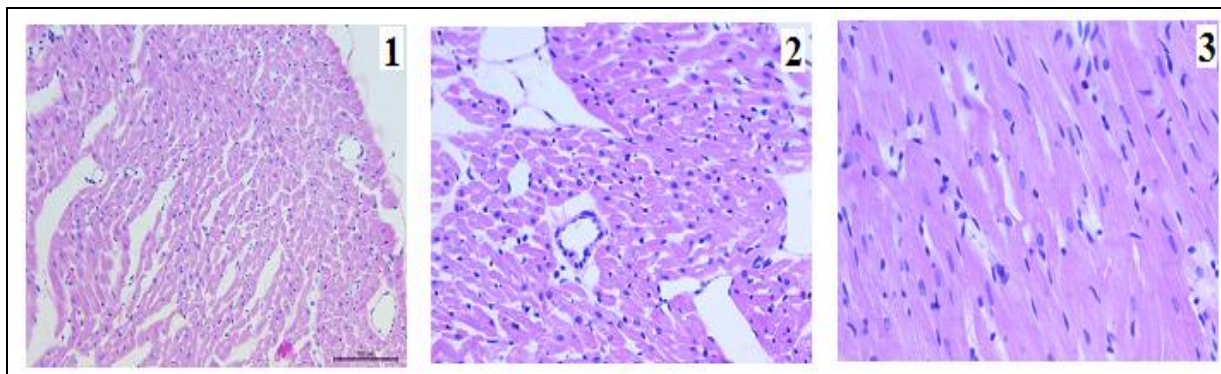
**Табела 14. Статистичке значајности добијене међусобним поређењем вредности каталазе, супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона у свим групама**

Група		CAT	СОД	GSH
Контрола	Нимодипин	0.081	0.991	0.614
	Винпоцетин	1.000	0.993	0.051
	Никардипин	1.000	1.000	0.006
	Тренинг	0.978	0.999	0.000
	Тренинг+ Нимодипин	0.946	0.472	0.000
	Тренинг+ Винпоцетин	0.985	0.993	0.000
	Тренинг+ Никардипин	1.000	0.268	0.000
Нимодипин	Контрола	0.081	0.991	0.614
	Винпоцетин	0.082	1.000	0.818
	Никардипин	0.014	1.000	0.264
	Тренинг	0.265	1.000	0.000
	Тренинг+ Нимодипин	0.360	0.892	0.000
	Тренинг+ Винпоцетин	0.237	1.000	0.000
	Тренинг+ Никардипин	0.037	0.679	0.000
Винпоцетин	Контрола	1.000	0.993	0.051
	Нимодипин	0.082	1.000	0.818
	Никардипин	0.991	1.000	0.967
	Тренинг	0.998	1.000	0.000
	Тренинг+ Нимодипин	0.988	0.821	0.000
	Тренинг+ Винпоцетин	0.999	1.000	0.000
	Тренинг+ Никардипин	1.000	0.562	0.000
Никардипин	Контрола	1.000	1.000	0.006
	Нимодипин	0.014	1.000	0.264
	Винпоцетин	0.991	1.000	0.967
	Тренинг	0.822	1.000	0.001
	Тренинг+ Нимодипин	0.710	0.562	0.001
	Тренинг+ Винпоцетин	0.854	1.000	0.000
	Тренинг+ Никардипин	1.000	0.308	0.000
Тренинг	Контрола	0.978	0.999	0.000
	Нимодипин	0.265	1.000	0.000
	Винпоцетин	0.998	1.000	0.000
	Никардипин	0.822	1.000	0.001
	Тренинг+ Нимодипин	1.000	0.654	1.000
	Тренинг+ Винпоцетин	1.000	1.000	0.365
	Тренинг+ Никардипин	0.968	0.385	0.246
Тренинг+ Нимодипин	Контрола	0.946	0.472	0.000
	Нимодипин	0.360	0.892	0.000
	Винпоцетин	0.988	0.821	0.000
	Никардипин	0.710	0.562	0.001
	Тренинг	1.000	0.654	1.000
	Тренинг+ Винпоцетин	1.000	0.821	0.479
	Тренинг+ Никардипин	0.919	1.000	0.339
Тренинг+ Винпоцетин	Контрола	0.985	0.993	0.000
	Нимодипин	0.237	1.000	0.000
	Винпоцетин	0.999	1.000	0.000
	Никардипин	0.854	1.000	0.000
	Тренинг	1.000	1.000	0.365
	Тренинг+ Нимодипин	1.000	0.821	0.479
	Тренинг+ Никардипин	0.978	0.562	1.000
Тренинг+ Никардипин	Контрола	1.000	0.268	0.000
	Нимодипин	0.037	0.679	0.000
	Винпоцетин	1.000	0.562	0.000
	Никардипин	1.000	0.308	0.000
	Тренинг	0.968	0.385	0.246
	Тренинг+ Нимодипин	0.919	1.000	0.339
	Тренинг+ Винпоцетин	0.978	0.562	1.000

#### 4.6. Морфометријске промене мишићног ткива срца и скелетног мишића

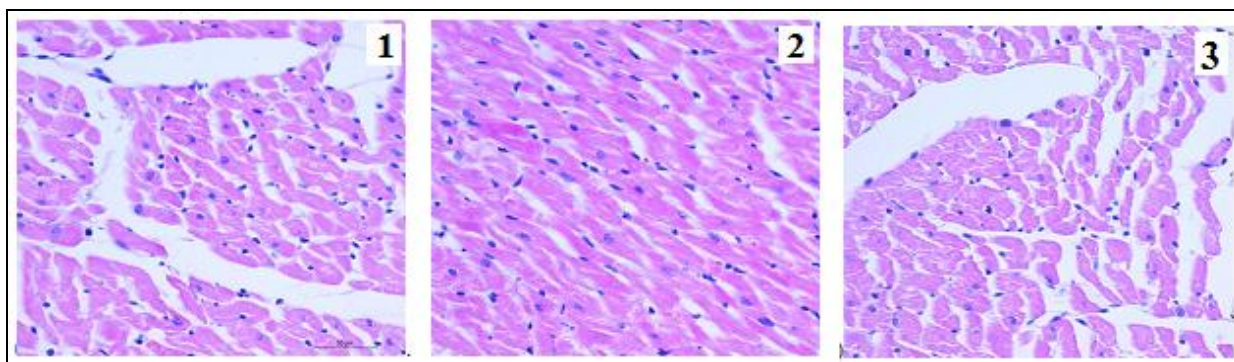
##### 4.6.1. Хистолошка анализа ткива леве коморе срца пацова

Према јасно дефинисаним критеријумима патохистолошке анализе, срчано ткиво леве коморе у контролној групи пацова било је регуларног распореда мишићних влакана и изгледа једара са фокално уочљивом стријацијом.



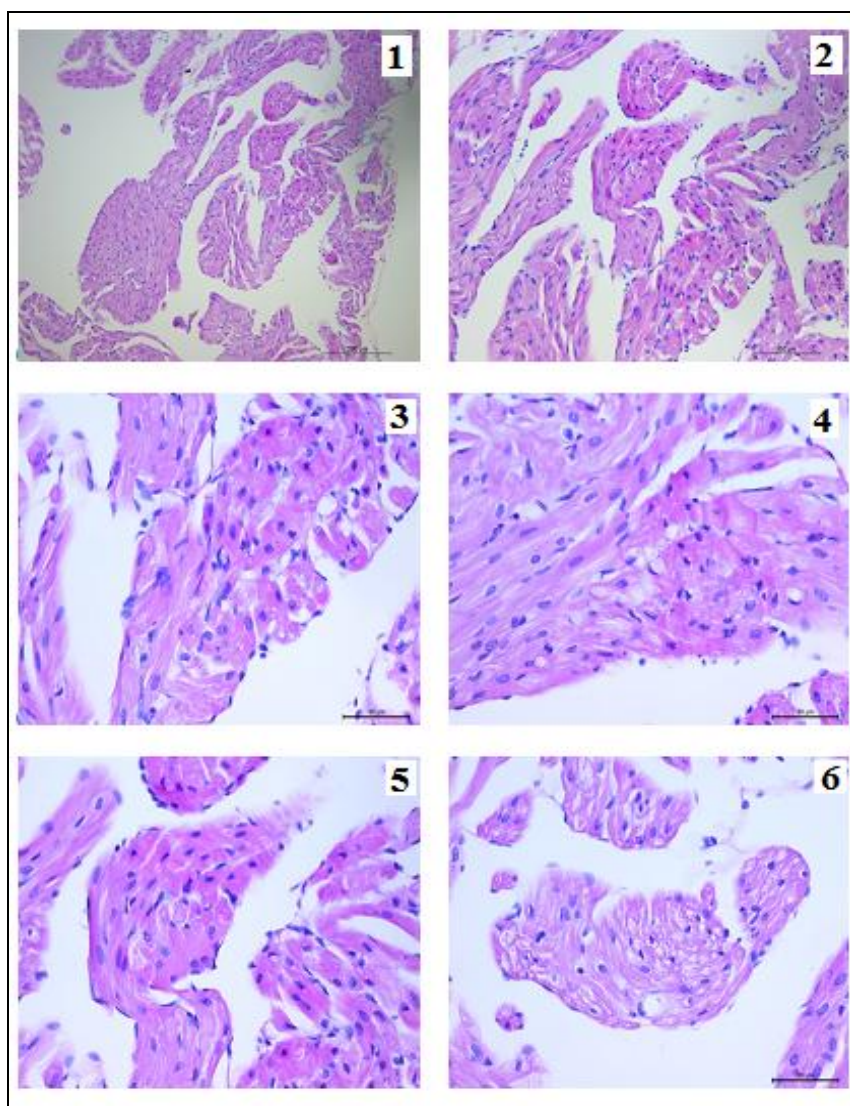
Слика 7. Репрезентативни исечци ткива леве коморе срца пацова након Н&Е бојења у контролној групи. Увећања 1) 10; 2) 20; 3) 40;

У групи животиња које су биле изложене физичком тренингу, уочени су почетни знаци хипертрофије као и повећан волумен појединих ћелија и једара.



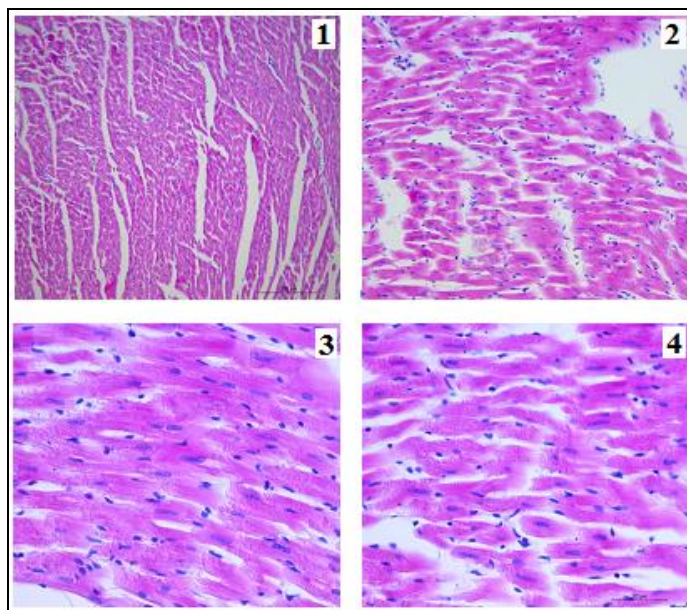
Слика 8. Репрезентативни исечци ткива леве коморе срца пацова након Н&Е бојења у групи тренираних пацова. Увећања 1) 20; 2) 20; 3) 20.

Анализом ткива у групи која је била повргнута трчању и никардипину, примећен је ирегуларан распоред мишићних влакана проширеног интерстицијума, и неколико фокално хипертрофичних кардиомиоцита са присутним интрацелуларним вакуолама.



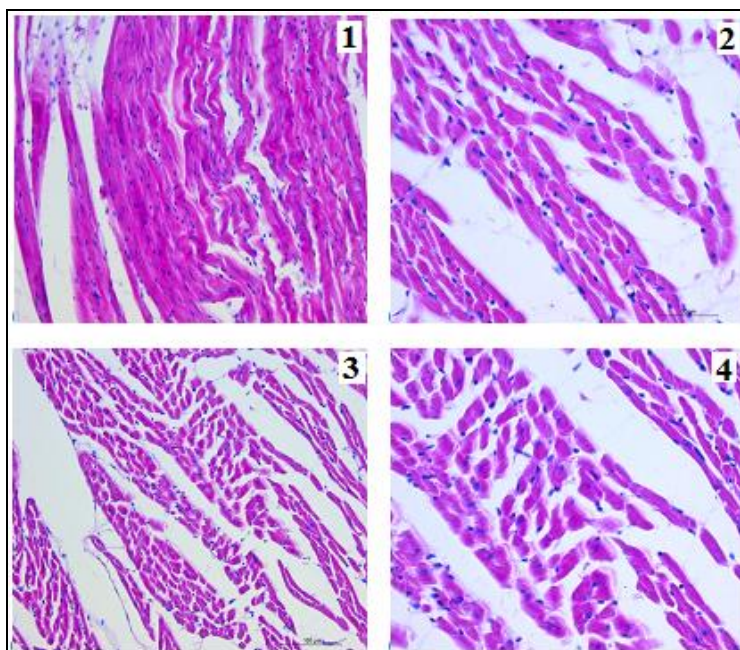
**Слика 9.** Репрезентативни исечци ткива леве коморе срца пацова након Н&Е бојења у групи трчање+никардипин. Увећања 1) 10; 2) 20; 3-6) 40.

У групи животиња које су биле изложене хроничном умереном тренингу и администрацији винпоцетина, на препаратима срчаног ткива примећен је регуларан распоред мишићних влакана проширеног интерстицијума и присуство фокално хипертрофичних кардиомиоцита. Саркоплазма је била уобичајених карактеристика.



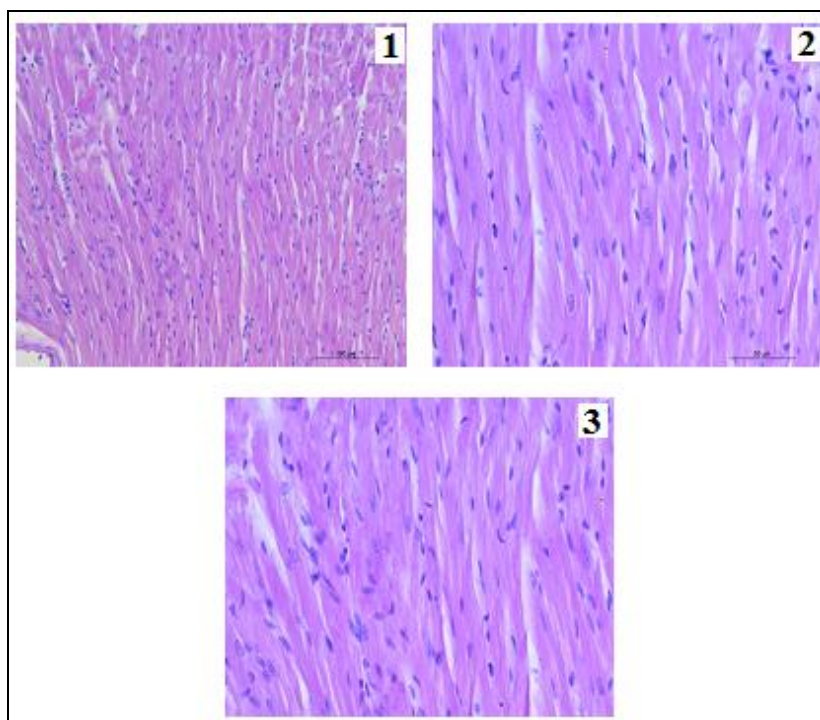
**Слика 10.** Репрезентативни исечци ткива леве коморе срца пацова након Н&Е бојења у групи трчање+винпоцетин. Увећања 1) 10; 2) 10; 3-4) 40.

У групи животиња које су биле изложене хроничном умереном тренингу и администрацији нимодипина, на препаратима срчаног ткива примећен је регуларан распоред мишићних влакана проширеног интерстицијума, присуство фокално хипертрофичних кардиомиоцита уз истањеност појединих мишићних влакана и таласастог изгледа.



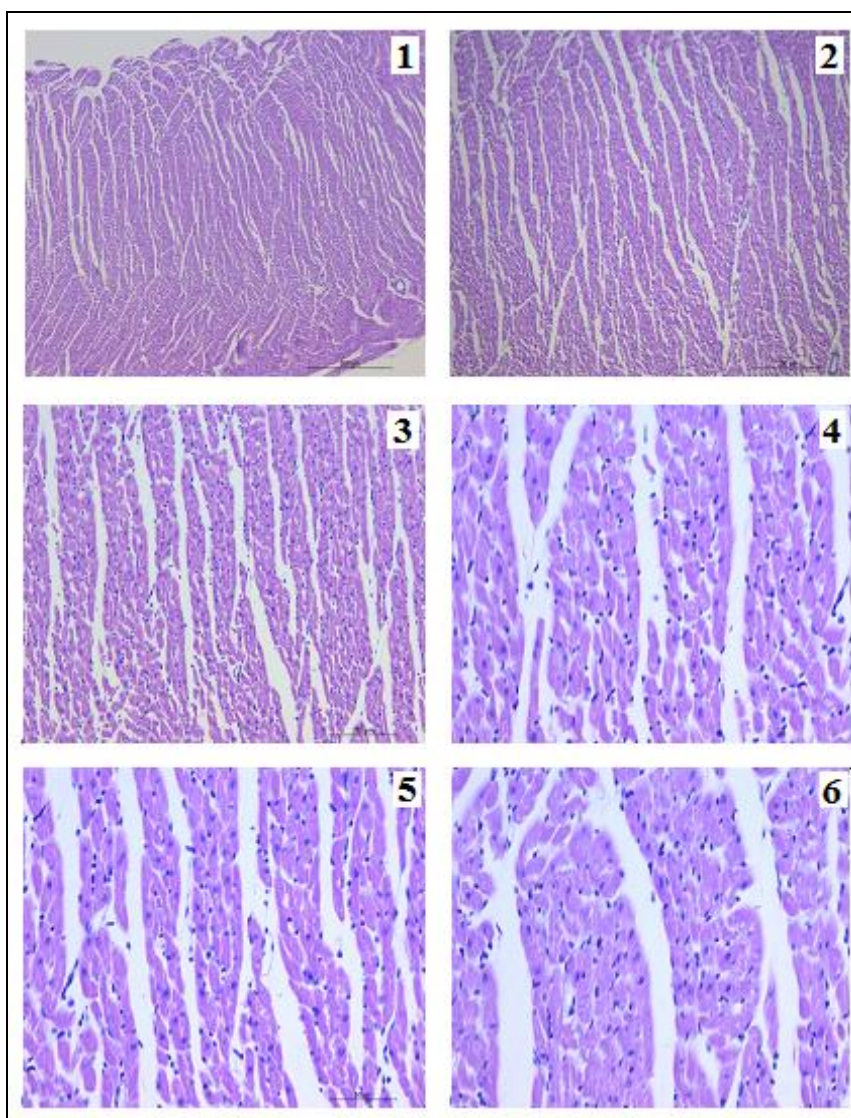
**Слика 11.** Репрезентативни исечци ткива леве коморе срца пацова након Н&Е бојења у групи трчање+нимодипин. Увећања 1) 20; 2) 40; 3) 20; 4) 40.

У групи животиња које су биле изложене хроничном третману никардипином, на препаратима срчаног ткива примећен је регуларан распоред мишићних влакана са фокално хипертрофичним кардиомиоцитима и појединачним једрима везикуларног изгледа са проминентним нуклеолусом што указује на почетак дегенеративних промена, које се разликују по величини и облику.



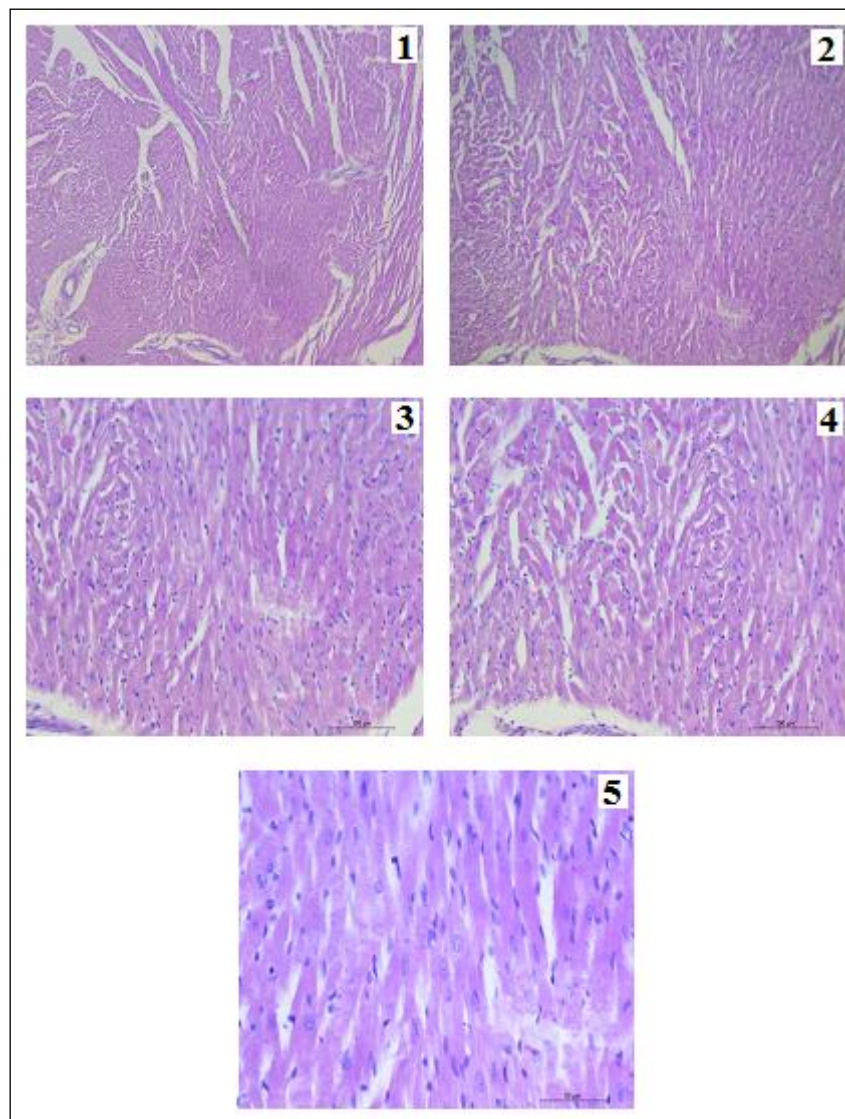
**Слика 12. Репрезентативни исечци ткива леве коморе срца пацова након Н&Е бојења у никардипин групи. Увећања 1) 20; 2) 40; 3) 40.**

У групи животиња које су биле изложене хроничном третману винпоцетином, на препаратима срчаног ткива примећен регуларан распоред мишићних влакана, једра правилна, округласта, местимично лако издужена, равномерно распоређеног хроматина у њима.



**Слика 13.** Репрезентативни исечци ткива леве коморе срца пацова након Н&Е бојења у винпоцетин групи. Увећања 1) 5; 2) 10; 3) 20; 4) 40; 5) 40; 6) 40.

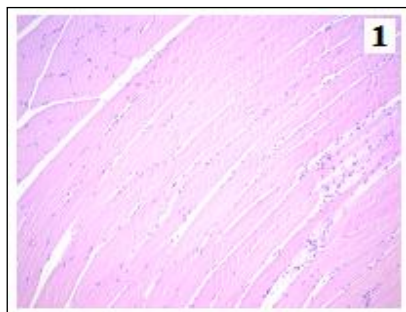
У групи животиња које су биле изложене хроничном третману нимодипином, на препаратима срчаног ткива примећен је ирегуларан распоред мишићних влакана, истањеног изгледа, проширеног интерстицијума, појединих крвних судова задебљалих зидова. У неким исечцима примећени су знаци губитка једара, хипереозинофилије са кондензацијом саркоплазме што у наговештају може бити присуство фокалне исхемије.



**Слика 14.** Репрезентативни исечци ткива леве коморе срца пацова након Н&Е бојења у нимодипин групи. Увећања 1) 5; 2) 10; 3) 20; 4) 20; 5) 40.

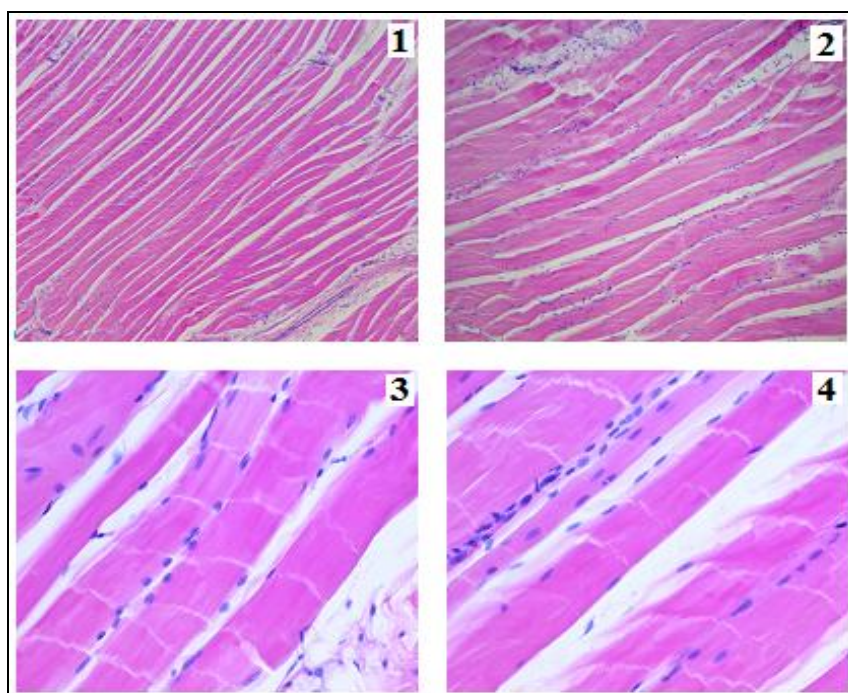
#### 4.6.2. Хистолошка анализа ткива *musc. quadriceps-a*

Патохистолошком анализом ткива скелетног мишића у контролној групи примећен је пресек регуларног распореда мишићних влакана уобичајене морфологије и уобичајеног изгледа интерстицијума, без елемената фиброзе, масне инфилтрације и целуларне инфилтрације.



Слика 15. Репрезентативни исечци ткива скелетног мишића пацова након Н&Е бојења у контролној групи. Увећање 1) x5.

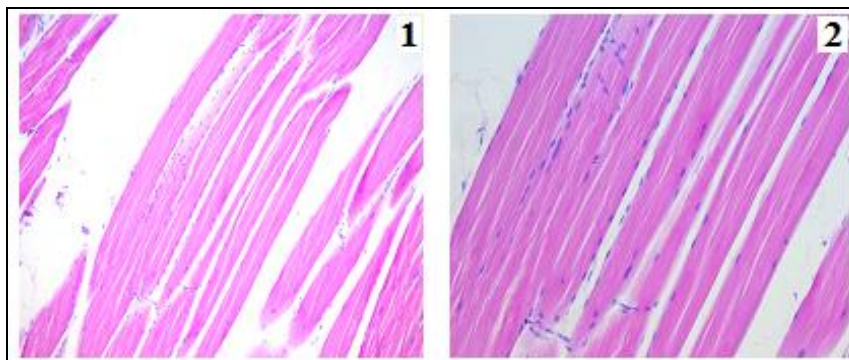
Патохистолошком анализом ткива скелетног мишића у групи која је имала тренинг трчањем, примећен је регуларан распоред мишићних влакана, са хипертрофијом појединачних мишићних влакана са проширеним интерстицијом и фокално умноженим масним ткивом – масна инфилтрација и лакостепени мононуклеарни ћелијски инфилтрат. Крвни судови уобичајене морфологије ендотелних ћелија и зидова. Интерстицијум је проширен са умереном масном инфилтрацијом и неравномерном дистрибуцијом ћелијског инфилтрата који углавном чине лимфоцити. Хипертрофија и истањеност влакана. У истањеним влакнима долази до кондензације саркоплазме и губитка попречне стријације као и једара, а присутна једра су пикнотично измењена.



Слика 16. Репрезентативни исечци ткива скелетног мишића пацова након Н&Е бојења у групи која је тренирала. Увећање 1) 5; 2) 10; 3) 40; 4) 40.

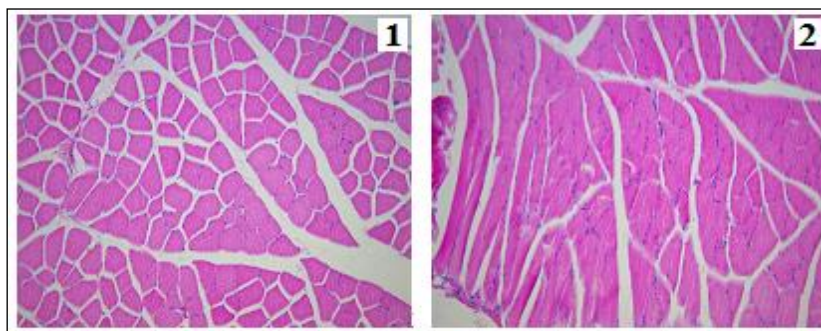


Патохистолошком анализом ткива скелетног мишића у групи која је имала тренинг трчањем и администрацију никардипина, примећена су истањена мишићна влакна са губитком стријације, фокалном кондензацијом саркоплазме и везикуларним једрима, као и изразито проширен интерстицијум.



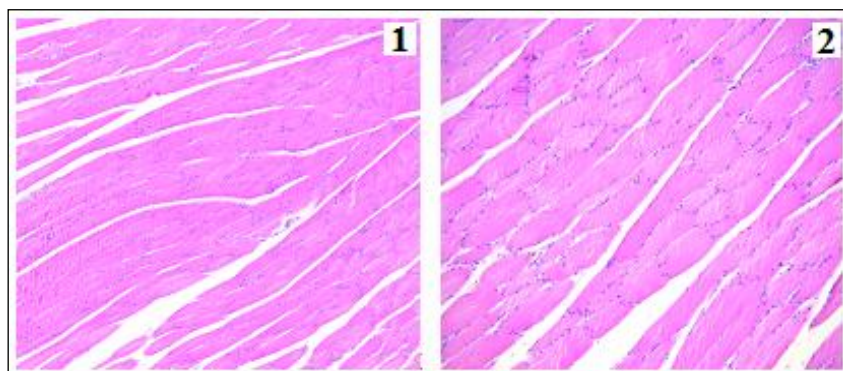
**Слика 17. Репрезентативни исечци ткива скелетног мишића пацова након Н&Е бојења у групи тренинг+никардипин. Увећање 1)  $\times 10$ ; 2) 20.**

Анализом ткива скелетног мишића у групи трчање+винпоцетин, примећена је регуларност мишићних влакана, хипертрофија са проширеним интерстицијумом и локалним умножавањем везивног ткива уз мононуклеарну ћелијску инфилтрацију. Такође, запажају се уздужни и попречни пресеци хипертрофично измењених мишићних влакана са проширењем интерстицијума и иницијалном фиброзом у истом.



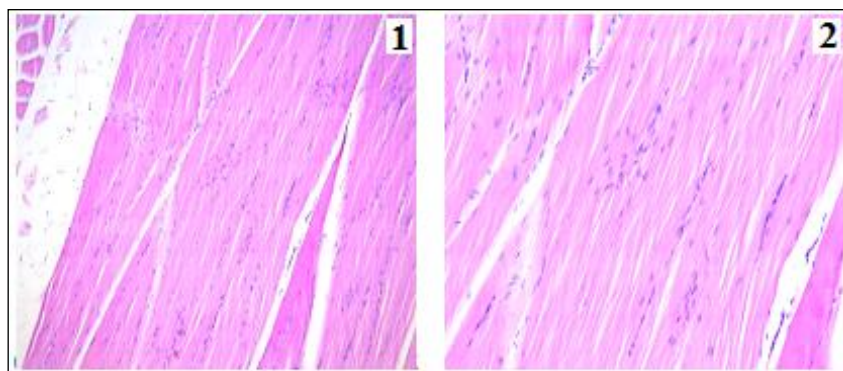
**Слика 18. Репрезентативни исечци ткива скелетног мишића пацова након Н&Е бојења у тренинг+винпоцетин групи. Увећање 1) 10; 2) 10.**

Анализом ткива скелетног мишића у групи трчање+нимодипин, примећују се умерено хипертрофична влакана регуларног распореда и лако проширеног интерстицијума. Запажа се губитак стријације. Једра су полиморфна, везикуларног изгледа.



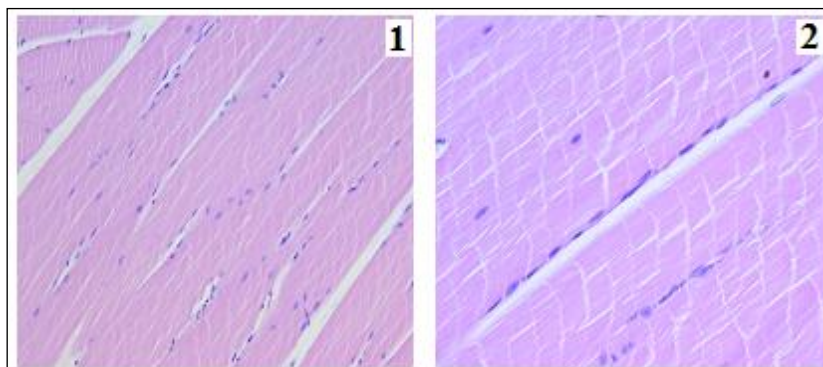
**Слика 19.** Репрезентативни исечци ткива скелетног мишића пацова након Н&Е бојења у тренинг+нимодипин групи. Увећање 1) 5; 2) 10.

Анализом ткива скелетног мишића у групи никардипин, примећују се мишићна влакна са проширеним интерстицијумом. Поједина влакна су истањена, таласастог изгледа. Фокално се уочава полиморфизам и везикуларност једара. Запажа се губитак стријације. Једра су полиморфна, везикуларног изгледа, диспергованог хроматина и проминентног нуклеолуса.



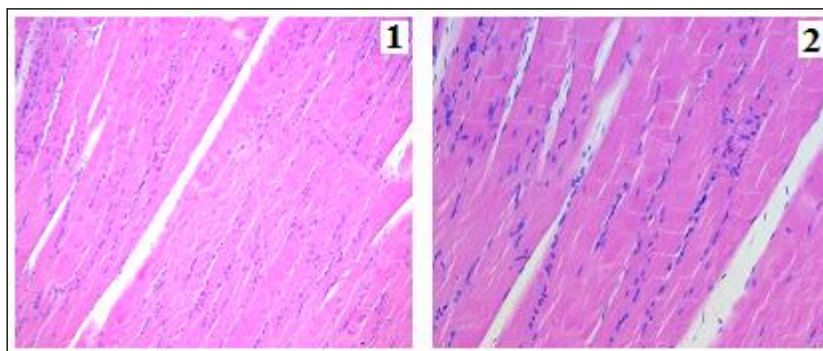
**Слика 20.** Репрезентативни исечци ткива скелетног мишића пацова након Н&Е бојења у никардипин групи. Увећање 1) 10; 2) 20.

Анализом ткива скелетног мишића у групи винпоцетин, примећују се мишићна влакна регуларног распореда мишићних влакана уобичајене морфологије и уобичајеног изгледа интерстицијума, без елемената фиброзе, масне инфилтрације и целуларне инфилтрације. Појединачна умерено хипертрофична влакна.



**Слика 21.** Репрезентативни исечци ткива скелетног мишића пацова након Н&Е бојења у винпоцетин групи. Увећање 1) 20; 2) 40.

Анализом ткива скелетног мишића у групи нимодипин, примећују се мишићна влакна са пољима „таласастог изгледа“ влакана, која су истањена и без попречне стријације. Једра су полиморфна и везикуларног изгледа, проминентних нуклеолуса.



**Слика 22.** Репрезентативни исечци ткива скелетног мишића пацова након Н&Е бојења у нимодипин групи. Увећање 1) 10; 2) 20.

# ДИСКУСИЈА

## 5. ДИСКУСИЈА

Научне студије и искуства из клиничке праксе и свакодневног живота потврђују да физички тренинг има разноврсне позитивне утицаје на појединачне органе и системе органа, који би се могли описати као благотворан ефекат на организам као целину (170-172). Према актуелним препорукама, умерена редовна физичка активност је незаменљив елемент и темељ нефармаколошког третмана кардиоваскуларних, метаболичких и коштаном-мишићних обољења (173).

Једна од значајних тема истраживачких група које се баве проблемом и значајем физичке активности је утврђивање оптималног интензитета физичке активности који може допринети кардиопротекцији, али и деловати штетно уколико није адекватан. Дефинисање оптималног интензитета физичке активности довело би до унапређења здравља, продужетка животног века, побољшања квалитета живота и смањења инциденце болести повезаних са животним стилем (174). Тренинг умереног интензитета (енгл. *moderate intensity training, MIT*) представља модел физичке активности која подразумева вежбе дужег трајања умереног интензитета, које се изводе са кратким паузама или без одмора, односно континуирано (175).

Епидемиолошки подаци говоре у прилог томе да физичка активност управо умереног интензитета и хроничног карактера смањује стопу морталитета код пацијената са инфарктом миокарда, па се као таква користи као један од видова нефармаколошког прекондиционирања (176, 177). Са друге стране, иако се доста зна о последицама и крајњим ефектима физичке активности, врло мало се зна о тачним молекуларним механизмима који посредују у тој кардиопротекцији. Механизми који се сматрају одговорним за кардиопротективне ефекте физичке активности нису у потпуности испитани. Расположива литература указује да су они на много начина слични механизмима исхемијског прекондиционирања, што имплицира да кратки периоди исхемије и реперфузије могу изградити заштитни механизам миокарда.

Поред нефармаколошких модела прекондиционирања, у литератури се све чешће помињу и различите стратегије фармаколошког прекондиционирања које би могле да замене дуготрајне и исцрпљујуће методе нефармаколошког прекондиционирања, али комплексни кардиопротективни ефекти ових поступака још увек нису расветљени у потпуности. Контроверзна мишљења и подаци из литературе указују на значајну улогу аденозина, норепинефрина и брадикинина као кардиопротективних медијатора (178, 179). Зна се да исхемија смањује количину расположивог АТП-а, тиме инхибирајући натријум-калијум АТП-азу, што резултује у преоптерећењу калцијумом. Повећање накупљања калцијума у цитоплазми је разлог за оштећење миокарда јер интензивира његово везивање за калмодулин киназу-2 и формирање калцијум-калмодулин комплекса, чија је улога активација азот-моноксид синтазе. Овај ензим катализује реакцију синтезе цитрулина из L-аргинина при чему се ослобађа снажни вазодилататора азот-моноксида (180).

Наведене чињенице неодложно намећу истраживачко питање да ли дуготрајна примена инхибитора калцијум-калмодулин комплекса односно инхибитора фосфодиестеразе-1 може да послужи као модел фармаколошког прекондиционирања. Ова студија је имала за циљ да испита улогу и ефекте инхибитора фосфодиестеразе-1 самостално или у комбинацији са физичким тренингом на кардиодинамику и редокс статус експерименталних животиња.

У нашем истраживању, праћењем максималне и минималне стопе раста притиска у левој комори, систолног и дијастолног притиска леве коморе (максимална и минимална стопа раста притиска, СПЛК, ДПЛК) пратили смо функцију и контрактилност највеће срчане шупљине - леве коморе односно целог срчаног мишића. Са друге стране анализа фреквенце срца и коронарног протока који директно зависи од саме фреквенце и ритма

миокарда, доприноси бољем разумевању очуваности и функције коронарне циркулације код сваког изолованог срца посебно и прецизно.

Наше истраживање се базира на откривању кардипротективног агенса, односно методе, која ће бити довољно снажна да смањи реперфузионо оштећење настало након глобалне исхемије изолованог срца пацова. Из тог разлога, акценат је био на ефекту тренинга самостално или у комбинацији на кардиодинамске параметре изолованог срца током реперфузије (тачке P1-P30). Резултати овог истраживања указују на промењену (смањену) контрактилност срца услед хроничног тренинга умереног интензитета, али и повећану услед примене инхибитора фосфодиестеразе-1, доминантно нимодипина (Графикон 1-8, Табела 1, 2). Систолни притисак леве коморе је био статистички значајно снижен у групи која прекондиционирана тренингом у поређењу са контролном групом у другој половини периода реперфузије; дијастолни притисак леве коморе је био статистички значајно промењен у P1 и P20 тачкама, и то у смислу значајног снижења у тренираној групи. Систолни притисак је био снижен у реперфузији код тренираних у односу на Контролу, а у комбинацији са нимодипином, винпоцетином и никардипином тренирани пацови имају повишен систолни притисак у односу на нетрениране (Графикон 9-16, Табела 3 и 4). Примењени самостално, тренинг и инхибитори имају супротне ефекте, а у комбинацији контрактилност је значајно повишена. Аутори недавне студије, истраживали су ефекте селективног инхибитора фосфодиестеразе-1 (ПТИ-214) на срце паса јер су тренутно доступни подаци ограничени на глодаре који имају углавном изоформу ензима фосфодиестеразе-1 што се одражава на различите ефекте на циклични гуанозин монофосфат (181). Фосфодиестераза тип 1 хидролизује циклични аденозин монофосфат и циклични гуанозин монофосфат и њена експресија је ограничена на срце. Код људи, овај ензим хидролизује оба монофосфата а код животиња нарочито *in vivo* овај ефекат варира. Из тог разлога, поменуто истраживање је доказало уравнотежене акутне ефекте фосфодиестеразе-1 на оба монофосфата што је битна полазна тачка за тумачење резултата. Поред тога, ова студија је потврдила кардипротективне ефекте инхибитора фосфодиестеразе-1 након акутне примене, што отвара нова поглавља у терапији срчане слабости (181). Оваква сазнања потврдили су и други аутори, нагласивши различиту експресију ензима фосфодиестеразе у срцу пацова. Одатле проистиче потреба да се истраживања прошире и на друге животињске врсте (182).

Тренутно инхибитори фосфодиестеразе-1 у клиничкој фази испитивања разматрају се и за лечење неколико других индикација, поред терапије срчане слабости, укључујући когнитивне дефиците повезане са шизофренијом и Алцхајмеровом болешћу, поремећајима покрета, поремећајем пажње и хиперактивношћу (183).

Испитивали смо ефекте селективних инхибитора фосфодиестеразе-1 на динамику срчане фреквенце и коронарног протока, као две основне мере за анализу коронарне циркулације. Примена нимодипина није довела до значајних разлика у срчаној фреквенци у поређењу са контролном групом, али у поређењу са тренираном групом, вредности у нимодипин групама су биле статистички значајно више у скоро свим тачкама реперфузије. Примена винпоцетина је довела до значајног повећања срчане фреквенце, у поређењу са тренираном групом.

Наши резултати показују да је срчана фреквенца била статистички значајно снижена у скоро свим тачкама реперфузије у тренираној групи, док сви инхибитори фосфодиестеразе у комбинацији са тренингом повећавају срчану фреквенцу у односу на трениране без фармаколошког третмана (Графикони 17-20, Табела 7). Коронарни проток је био статистички значајно снижен у последњој тачки реперфузије у групи која је била прекондиционирана физичким тренингом у односу на групу која то није. Комбинација нимодипина и тренинга је довела до статистички значајних повишења коронарног протока у реперфузији у односу на само трениране или само на нимодипину, винпоцетин само у крајњим тачкама реперфузије снижава проток, док никардипин значајно смањује проток али у односу на нетрениране контролне животиње почев од P10 тачке мерења

(Графикон 21-24, Табела 8). Хронична умерена физичка активност смањује срчану фреквенцу и проток, док инхибитори фосфодиестеразе-1 делују супротно на проток у коронарним крвни судовима и срчани ритам. Овакви резултати су логични и сасвим очекивани јер је позната улога ензима фосфодиестеразе у срцу односно улога у хидролизи и инактивацији цикличних нуклеотида као важних регулаторних процеса у кардиоваскуларном систему. Веома је мало студија, само неколико у медицинским базама, које су се бавиле сличном проблематиком и испитивањем тачне улоге инхибитора фосфодиестеразе-1. Једна од њих је испитивала ефекте нових инхибитора LU-AF41228 и LU-AF58027 на функцију кардиоваскуларног система (184). На моделу артерије мезентерике пацова праћени су ефекти ових агенаса на крвни притисак и срчани пулс. Закључено је да наведене супстанце односно инхибитори фосфодиестеразе дозно-зависно делују на хемодинамске параметре, односно да доводе до смањења крвног притиска за 10-15 mmHg и повећања срчане фреквенце. Поред тога, PDE1 индукују и вазодилатацију крвних судова, што потврђује значај ових лекова у третману хипертензије и вазоспазма.

Већ је познато да се у срчаном ткиву налази најмање пет типова фосфодиестераза (PDE1-5). Стимулацијом бета-1 рецептора, односно бета-адренергичком стимулацијом, катехоламини делују позитивно инотропно на срце. Током те стимулације, циклични аденозин монофосфат се највећим делом хидролизује путем PDE3 и PDE4 изоформи код пацова, мишева и зечева. Међутим, тахикардија која настаје код глодара услед дејства катехоламина, не може у потпуности бити контролисана нити инхибирана дејством на PDE3 и PDE4, због још увек недовољно расветљених механизма њиховог деловања. Студија која се бавила овим научним проблемом, испитивала је ефекте цилостамида и ролипрама на хронотропне ефекте норадреналина на синоатријалним ћелијама зеца, што је тренутно најбољи експериментални модел у проучавању пејсмејкера. Закључено је да цилостамид повећава синоатријалну стимулацију и фреквенцу за око 30% за разлику од ролипрама. Са друге стране, инхибитори PDE1 су узроковали маргинална тахикардију и то при врло високим концентрацијама и нису значајно утицали на ефекте норадреналина на ћелијама срца, односно ниједан инхибитор PDE па ни PDE1 није у могућности да редукује тахикардију насталу услед дејства катехоламина. Ова студија је јасно указала на могућност настанка резистенције кардиомиоцита на инхибиторе PDE у случајевима  $\beta$ -адренергичке стимулације и тахикардије срца, као што је случај са ефектима катехоламина на срце (185).

Могућност изазивања тахикардије када су у питању инхибитори PDE1 је већ раније утврђена и наши резултати нису изненађујући. PDE1 се доминантно налази у мозгу, миокарду и глатким мишићним ћелијама крвних судова, па иако би требало да буду селективни, због своје заступљености у наведеним ткивима делују као да су неселективни инхибитори. Инхибиција PDE1 зато и узрокује тахикардију и вазодилатацију (186).

Компарацијом ефеката преко кондиционарања различитим инхибиторима фосфодиестеразе 1 (PDE1) у седентарним условима, као и у условима утренираности покушали смо детаљније да објаснимо разлике и ефекте ових агенаса на реперфузионо оштећење миокарда и кардиодинамику. Код седентарних пацова, нимодипин значајно повећава контрактилност у односу на контролне пацове, као и систолни притисак, док дијастолни притисак повећавају никардипин и винпоцетин. Срчану фреквенцу значајно повећавају винпоцетин и никардипин, док коронарни проток значајно снижавају сва три инхибитора са доминантном улогом никардипина и винпоцетина при крајњим тачкама реперфузије (Графикони 25-30).

Са друге стране, у условима физичке утренираности пацова, сва три инхибитора повећавају параметре контрактилности, са доминантнијим повећањем максималне и минималне стопе раста притиска у левој комори као и систолног притиска након примене винпоцетина и нимодипина. Срчана фреквенца је била значајно повишена услед примене

нимодипина у односу на Контролу, као и коронарни проток (Графикони 31-36). Анализирањем разлика између PDE1 инхибитора које смо користили у истраживању дошли смо до закључка да су наши резултати донекле и очекивани.

Студија која је истраживала примену нимодипина и винпоцетина самостално и у комбинацији у моделу инфаркта миокарда индукованим исопротеренолом показала је да нимодипин и винпоцетин могу сузбити преоптерећење  $Ca^{2+}$  јонима и спречити оштећење срца са значајним побољшањем систолног и дијастолног притиска и срчане фреквенце. Потврђено је побољшање снабдевања миокарда кисеоником кроз субендокардијалну регију вентрикула, што додатно потврђује кардиопротективне ефекте нимодипина, винпоцетина и њихове комбинације (187).

Имајући у виду чињенице да је никардипин лек одобрен за примену у терапији хипертензије, вазоспазма и ангине пекторис, а да је, са друге стране, винпоцетин у фази истраживања и као потенцијални лек у третману епилепсије и срчане слабости (188), не изненађује ни разлика у њиховим ефектима уочена у овој студији. Нимодипин је лек који доминантно делује на контрактилност крвих судова јер као 1,4-дихидропиридински блокатор калцијумских канала стабилизује волтажно зависне канале за калцијум Л-типа и тиме превенира контракцију мишићних ћелија и последничну вазоконтракцију (189). Оно што га издваја од других блокатора калцијумских канала је то што снажније делује на церебралну циркулацију него на периферну, па се из тог разлога користи за побољшање неуролошких исхода након субарахноидалних крварења. Из тих разлога, сасвим је оправдан резултат који смо добили, тахикардичне особине винпоцетина и никардипина, као и вазодилататорни ефекат нимодипина (190). Физички тренинг у комбинацији са овим агенсима наглашава њихове позитивне фармаколошке ефекте на кардиодинамику (191,192).

Прва истраживања која су пружила увид у повезаност оксидационог статуса са физичким тренингом су спроведена од стране Dillard-a и сарадника (193). Резултати њихове студије су показали да до пораста липидне пероксидације долази код прекомерне физичке активности. Ово истраживање је подстакло и друге истраживаче да испитају улогу РОС и других слободних радикала у току физичке активности. Истраживања су показала да физичка активност може да има значајне ефекте на срце, мозак и мишиће, као и да ендогени антиоксиданти могу имати важну улогу у адаптацији ових органа на оксидациони стрес изазван вежбањем (194). У физиолошким условима, прооксиданси се континуирано стварају као резултат различитих базалних, метаболичких и биохемијских процеса у организму. Прооксиданси се у ћелијама континуирано стварају у ниским концентрацијама и тада имају улоге у различитим физиолошким процесима, као сигнални молекули, медијатори или учесници неких реакција. Претходни подаци указују да, насупротив ниским физиолошким нивоима прооксиданаса који се стварају у мишићима што има важну улогу у нормалној контрактилности, прекомерно стварање РОС води до контрактилне дисфункције, праћене мишићном слабошћу и исцрпљеношћу. Без обзира на изворе прооксиданаса у мишићима, интензивно и дуготрајно вежбање може довести до оксидационих оштећења протеина и липида (195).

Прекондиционирање је процес у коме се користе ниске дозе стимулативног агенса за изазивање адаптивног одговора, који штити биолошки систем од накнадних великих оштећења и повреда, као што је реперфузиона повреда у инфаркту миокарда која може бити и смртоносна. Експерименталне студије потврдиле су адаптивни одговор на одговарајућу дозу стимуланса, и одређивање те дозе која је кључан фактор развоја адекватне адаптације је у фокусу многих истраживања (196-197).

Поред врло добро познатог исхемијског прекондиционирања, данас се све више трага за неисхемијским односно фармаколошким начинима прекондиционирања. Разумевање механизма настанка исхемијског прекондиционирања и његових последица је основ за разумевање резултата нашег фармаколошког прекондиционирања. Исхемијско прекондиционирање је појава краткотрајног периода исхемије који када је



праћен реперфузијом смањује штетне ефекте следећег другог периода исхемије, односно смањује величину инфаркта. Прекондиционирање данас представља савремен концепт у кардиологији, који би требало да директно утиче на величину поља некрозе срчаног мишића које настаје услед оклузије коронарне артерије. У терапијском смислу, како срчани мишић не може да се регенерише на месту некрозе, изузетно је важно да се некроза спречи или ограничи. Фибринолитичка терапија има за циљ тромболизу али ретко када се примењује довољно брзо да би потпуно спречила некрозу ткива. Из тога разлога исхемијско, али и фармаколошко прекондиционирање се наводе као решења која би довела до смањења величине инфаркта, учесталости срчане болести али и свих других компликација срчане болести. У самом реперфузионом оштећењу ткива у великој мери посредују и слободни радикали, чија хиперпродукција узрокује ендотелну дисфункцију и води прогресији срчане слабости. Поред слободних радикала, сличан механизам имају и брадикинин, ангиотензин, ендотелин који посредују у активацији гена одговорних за синтезу протеина који делују протективно на миокард. Ране промене настале услед прекондиционирања настају одмах након неколико минута а касне су повезане са хиперпродукцијом азот-моноксида који отвара канале за калијум у митохондријама чиме се ствара антиаритмијски ефекат (198). Са друге стране, инхибиција фосфодиестеразе тип 1, због специфичне локализације у срчаном ткиву би могла да буде један од начина прекондиционирања миокарда Испитивањем винпоцетина, никардипина и нимодипина покушали смо да објаснимо да ли и како делују анализом маркера оксидационог стреса и одабраних ензимских и неензимских параметара антиоксидативне заштите. Инхибитори PDE-1 су атрактивна терапијска мета због њихових улога у различитим медицинским стањима, као што су кардиоваскуларне болести, когнитивна оштећења, аутоимунска обољења, деменције итд. Инхибитори PDE-1 регулишу нивое цикличног гуанозин монофосфата и цикличног аденозин монофосфата тако што врше њихову хидролизу. За деривате дихидропиридина (као што је нимодипин), је већ показано да ступају у значајне биофизичке интеракције са мембранама ћелија, које за последицу имају снажан антиоксидациони ефекат на нивоу липида, независан од способности да модификују калцијумове канале (199,200). Винпоцетин, никардипин и нимодипин изабрани су као блокатори калцијумских канала и инхибитори PDE-1 јер доказано имају и антиоксидациона својства.

Наведене чињенице сугеришу да је стратегија употребе фармаколошких инхибитора PDE-1 као методе прекондиционирања миокарда у нашем истраживању била оправдана. За нефармаколошки начин прекондиционирања изабрали смо умерену хроничну физичку активност трчањем, имајући у виду литературне податке према којим су тренирана срца пацова мање подложна накупљању калцијума у односу на срца седентарних животиња (201). Додатни разлог зашто смо се одлучили за овај модел истраживања је тај што до данас у литератури још увек није потпуно разјашњено како инхибитори PDE-1 самостално или у комбинацији са физичком активношћу могу утицати односно смањити системски оксидациони стрес.

У коронарном ефлуенту код тренираних пацова и у групама које су фармаколошки прекондиционирале, нивои супероксид анјон радикала су били статистички значајно нижи под утицајем сва три тестирана инхибитора PDE1 (Графикон 57). Резултати нашег истраживања показују да нимодипин, никардипин, винпоцетин и само тренирање као и њихова комбинација нису утицали на промену концентрације супероксид анјон радикала у крви пацова (Графикон 61, Табела 13). Супротно томе, претходно истраживање је ипак потврдило значајно повећање овог прооксиданса након хроничног физичког тренинга и то већег интензитета (175). Разлог за ову разлику у резултатима вероватно лежи у интензитету физичког тренинга и протоколу истраживања који се разликује. Насупрот нашим резултатима, резултати друге студије наводе податак да деривати дихидропиридина деловањем на хумане и анималне неутрофиле инхибирају продукцију супероксид анјон радикала и то блокадом калцијума и активирањем протеин

киназе С (202). Винпоцетин у дози од 30 mg снижава ниво супероксид анјон радикала и то у неутрофилима који су значајан извор овог радикала због активности ензима NADPH оксидазе. Студија је потврдила да винпоцетин својим антиоксидационим деловањем и смањењем преузимања неутрофила у ткиво смањује оштећење ткива (203).

У нашој студији пратили смо концентрацију водоник-пероксида, једињења које по структури није слободни радикал али учествује у реакцијама у којима настају други слободни радикали, реактивна кисеоникова једињења као што је хидроксилни радикал. Наши резултати показују да физички тренинг доводи до смањења овог прооксиданса, али не и након примене PDE-1 инхибитора у крви пацова. Комбинација вежбања са нимодипином, никардипином и винпоцетином индуковала је смањење концентрације водоник-пероксида. Најевидентније промене у коронарном ефлуенту изазвала је комбинација физичког тренинга са никардипином, винпоцетином и нимодипином. Добијени резултати указују да примена инхибитора PDE-1 у комбинацији са тренингом значајно смањује нивое прооксидационих маркера (Графикон 58, Табела 10).

Као последица физичке активности, у цитоплазми ћелија се подстиче појачана активност ензима каталазе која разлаже водоник-пероксид на кисеоник и воду. У ћелији су активности антиоксидационих ензима спрегнуте тако да се у условима када се водоник-пероксид повећано ствара вероватно активира и ензим глутатион-пероксидаза који такође катализује реакцију разградње овог прооксиданса. Редуковани глутатион је супстрат овог антиоксидационог ензима и троши се у реакцији разлагања водоник-пероксида. У ћелији се у физиолошким условима одржава висок однос редукованог глутатиона, GSH према оксидованом облику GSSG (100:1) и на тај начин су могуће овакве антиоксидационе реакције. У патолошком стању, посебно у оним стањима у којима се развија оксидациони стрес, овај однос се смањује на 10:1, чак и на 1:1, па је овај вид заштите од прооксииданаса угрожен. На реакцију ензима глутатион-пероксидазе која „троши“ редуковани облик глутатиона надовезује се реакција ензима глутатион редуктазе која враћа оксидовани облик глутатиона у редуковани. Познато је и да водоник-пероксид настаје у реакцији дисмутације супероксидног анјона коју катализује ензим СОД, јасно је колико су елементи система антиоксидационе заштите повезани и како излазак само једног од елемената из тог система може значајно да поремети хомеостатску равнотежу (204). Такви поремећаји су кључни за развој различитих патолошких процеса па и оних који су везани за кардиоваскуларне болести и због тога активне супстанце које помажу одржавању оптималне концентрације GSH значајно могу допринети спречавању развоја болести. Резултати наше студије су показали да сви примењени третмани, физичка активност и сва три инхибитора PDE-1, а посебно комбиновани третмани имају позитиван учинак на повећање концентрације глутатиона у еритроцитима (Графикон 67).

Испитивали смо ефекте тренинга самостално или у комбинацији са терапијом на биорасположивост азот-моноксида у форми нитрита. У нашем организму, азот-моноксид настаје из аминокиселине аргинина и има значајну улогу у многим физиолошким процесима. Оптимални нивои овог молекула су важни у свим ткивима јер он представља битан физиолошки медијатор у неколико процеса, док се његово накупљање, односно вишак одражава директно на ткиво и може деловати токсично у организму. Азот-моноксид је врло активан молекул и доминантну улогу има у циркулаторном систему, где га одликује снажна способност вазодилатације. Данас се зна да тренинг трчањем подразумева повећану експресију ензима ендотелијалне азот-моноксид синтазе и појачану производњу азот-моноксида (205). Фармаколошка истраживања наводе и податак о значајној улози лекова блокатора калцијумских канала у регулисању нивоа азот-моноксида (206,207). Имајући у виду да је његов полуживот веома кратак, фокусирали смо се на мерење стабилних метаболита као што су нитрити. У нашем истраживању након тренинга ниво нитрита у крви пацова је био повишен, као одговор NOS:аргинин система на физичку активност. Ниво нитрита се значајно повећао након

тренинга, примене лекова (нимодипин, винпоцетин и никардипин), као и након комбинације фармаколошког третмана и тренинга (нимодипин+тренинг група, винпоцетин+тренинг група и никардипин+тренинг група). Тренинг и комбинације повећавају ниво нитрита али мање него појединачне терапије у односу на контролну групу али ипак значајно и тренинг и комбинација тренинга са терапијом. (Графикон 63). У винпоцетин+тренинг групи и никардипин+тренинг групи приметили смо значајно снижени ниво нитрита у поређењу са винпоцетин и никардипин групама. Занимљиво је да је комбинација никардипина са тренингом довела до значајног повећања нивоа нитрита вероватно због њиховог адитивног деловања: тренинг повећава синтезу NO путем повећане експресије ендотелијалне NOS, док никардипин повећава синтезу NO, недовољно јасним механизмом. Резултати наше студије су потврдили резултате других студија (208). Примена никардипина код зечева довела је до повећане продукције нитрита. Никардипин је спречавао повећану разгрању азот-моноксида, без утицаја на ензиме супероксид дисмутазу и каталазу (209). Двоструки механизам дејства никардипина као блокатора калцијумових канала и инхибитора фосфодиестеразе, може објаснити висок ниво синтезе азот-моноксида у групама које су добијале никардипин. PDE1 инхибиција доводи до хипотензивног ефекта, преко обезбеђивања високе концентрације азот-моноксида, као последице хидролизе cAMP и cGMP (210). У коронарном ефлуенту поређењем група које су прекондициониране тренингом са групама које су прекондициониране тренингом и фармаколошким агенсом, приметне су више вредности азот-моноксида у групама са фармаколошким прекондиционарањем. Код тренираних пацова, нивои азот-моноксида су били статистички значајно виши под утицајем нимодипина и винпоцетина (Графикон 59).

Важан део ове студије је ефекат поменутих агенаса на липидну пероксидацију. Реактивне кисеоничне врсте али и други слободни радикали су врло агресивне молекуле које могу узроковати и липидну пероксидацију. Липидна пероксидација је сложен процес који се догађа у три важна корака. Слободнорадикалским механизмом настаје прва фаза и то након реакције кисеоника са полинезасићеним масним киселинама. Тако из масних киселина настају слободни радикали а разлог за то су присутне нестабилне двоструке везе у масним киселинама које се лако кидају. У зависности од тога да ли су у питању аеробни или анаеробни услови, настају хидропероксиди или пероксиди који даље настављају пропацију стварања нових слободних радикала (фаза пропације). У катализовању реакција липидне пероксидације учествује транзициони метал гвожђе, које као и бакар због могућности да мења валенцу учествује у оксидо-редукционим реакцијама. Процес липидне пероксидације је повезан са повећањем активности антиоксидационих ензима каталазе и супероксид дисмутазе. Као продукти липидне пероксидације уз учешће гвожђа и бакра, настају крајњи производи разградње липидних хидропероксида, малондиалдехид, алдехиди, кетони, хидроксиалкенал, 4-хидроксиноненал (HNE) и различите класе изопростана.

Мерењем индекса липидне пероксидације (TBARS), утврдили смо да су сви тестирани инхибитори PDE-1 као и тренинг смањили ниво TBARS-а у крви пацова. Оба начина прекондиционарања смањила су ниво липидне пероксидације. Овакав резултат указује на вероватну антиоксидациону активност инхибитора PDE-1. И друга истраживања су у сагласности са нашим резултатима. Винпоцетин утиче на смањење концентрације MDA након индукције оксидационог стреса гентамицином и настанка акутне повреде бубрега. На моделима индукције токсичних ефеката глутаматом, винпоцетин је показао свој потенцијал да умањи липидну пероксидацију (211). Никардипин у студијама смањује индекс липидне пероксидације како на моделима субарахноидалних крварења тако и на моделима атеросклеротских промена крвних судова (212). Несумњив је и значај никардипина код смањења липидне пероксидације услед хроничне хипертензије. Недостанак нашег истраживања када је у питању липидна пероксидација је недовољна специфичност и сензитивност која се постиже мерењем

TBARS-a, па је отуда потекла идеја да у наредним истраживањима за процену оксидационог стреса и степен овог вида оштећења липидних биомолекула процењујемо одређивањем изопростана. На пример F2 изопростани су деривати арахидонске киселине, настају *in vivo* и имају проинфламаторне особине. TBARS метода за процену концентрације МДА, као крајњег продукта разградње липидних хидропероксида, је метода која је једноставна и зато најчешће примењивана, али не представља прецизну меру оксидационим процесима изазваног оштећења липида (213). У коронарном ефлуенту испитивани инхибитори у комбинацији са тренингом делују антиоксидационо (Табела 12).

У последњем делу истраживања, испитивали смо утицај инхибитора PDE-1 самостално и у комбинацији са физичким тренингом на активност одабраних параметара антиоксидационе заштите, два антиоксидациона ензима (каталаза и супероксид дисмутаза) и једног неензимског ћелијског антиоксиданса, редукованог глутатиона. Посматрајући активност каталазе, супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона који је неензимског порекла, инхибитори PDE-1 су показали да се активности супероксид дисмутазе не мењају под утицајем различитих третмана, док сви третмани повећавају значајно концентрацију редукованог глутатиона. Само деловање антиоксиданаса се може описати различитим механизмима: уклањањем кисеоника односно утицајем на смањење локалних концентрација кисеоника, уклањањем јона метала који су катализатори оксидо-редукционих реакција, уклањањем циљаних реактивних кисеоничних врста као што су супероксид анјон радикал или водоник-пероксид, уклањање слободних радикала уопште или уклањањем синглет кисеоника. Наши резултати показују повећан ниво каталазе (Графикон 65) у нимодипин групи у односу на никардипин групу. Сам никардипин изазива значајан пораст супероксид дисмутазе (Графикон 66) и каталазе што је у складу са резултатима претходних студија. Нимодипин и винпоцетин имају више активности СОД у односу на никардипин али те разлике нису биле статистички значајне. Комбинација нимодипина и никардипина са тренингом повећава активност супероксид дисмутазе али разлика нема статистичку значајност. Супероксид дисмутаза припада групи металоензима и учествује углавном у дисмутацији супероксида у водоник-пероксид а потпуна неутрализација ових прооксиданаса настаје тек након деловања ензима каталазе и глутатион пероксидазе.

Сви PDE-1 инхибитори, тестирани у нашој студији, су показали антиоксидациони потенцијал што може бити додатна кардиопротективна карактеристика ових лекова. Податак из литературе говори да винпоцетин у већим дозама може имати супротно дејство, односно деловати као прооксиданс и повећати производњу слободних радикала, што због различите концепције није било могуће проверити у овој студији (214). Интересантно је запажање и других аутора да код спонтано хипертензивних пацова примена никардипина може да стабилизује концентрацију редукованог глутатиона, што је још једна у низу тврдњи која иде у прилог антиоксидационим особинама инхибитора PDE-1 (215).

У нашој студији посматране су патохистолошке промене ткива срца и скелетног мишића пацова. У групи животиња које су биле изложене физичком тренингу, уочени су почетни знаци хипертрофије као и повећан волумен појединих ћелија и једара (Слика 8). Анализом ткива у групи која је била повргнута трчању и никардипину, винпоцетину и нимодипину, примећен је ирегуларан распоред мишићних влакана проширеног интерстицијума, и неколико фокално хипертрофичних кардиомиоцита са присутним интрацелуларним вакуолама (Слика 9-11).

Насупрот групама које су биле подвргнуте и тренингу и инхибиторима фосфодиестеразе, на препаратима ткива срчаног ткива пацова који су били изложени само фармаколошком прекондиционирању, примећен је регуларан распоред мишићних влакана са фокално хипертрофичним кардиомиоцитима и појединачним једрима везикуларног изгледа са проминентним нуклеолусом што указује на почетак

дегенеративних промена, које се разликују по величини и облику (Слика 12 и 13). Издваја се група животиња које су биле на третману нимодипином, где су примећени знаци губитка једара, хипереозинофилије са кондензацијом саркоплазме што у наговештају може бити присуство фокалне исхемије (Слика 14).

Литературни подаци су у сагласности са нашим резултатима. У кардиомиоцитима, сАМР и сGMP имају некада и антагонистичку активност па чак у исто време и физиолошку и патолошку. Акутна и хронична сигнална трансдукција нуклетода може да има различите ефекте и то супротне. Акутна адренергичка активација аденозинског нуклеотида повећава контрактилност срца и пренос сигнала док активација гуанозинског антагонизује ову реакцију. Хронична стимулација бета адренергичких рецептора на морфолошком нивоу доводи до развијања маладаптивних механизма у смислу ремоделовања миокарда, фиброзе и апоптозе кардиомиоцита, док хронична нуклеотидна активација делује супротно на ткиво срчаног мишића (216). Имајући у виду да су примећени инхибитори фосфодиестеразе тип-1 неселективног карактера, сасвим је логичан ефекат ових лекова на нивоу миокарда. Претходне претклиничке и клиничке студије која су испитивале селективни и то кардиоселективни инхибитор фосфодиестеразе-1 наводе да дуготрајна примена овог инхибитора доводи до хипертрофије миокарда и периферних крвних судова (217). На сам ефекат инхибитора фосфодиестеразе је познато да могу утицати и разни други кофактори, као на пример друга придружена стања и болести, физички тренинг и други лекови, чији се ефекти пре свега огледају у промењеној експресији фосфодиестеразе у сваком ткиву. што доводи касније до ремоделовања срчаног мишића.

Патохистолошком анализом ткива скелетног мишића у односу на контролну групу пацова где је примећен регуларан распоред мишићних влакана уобичајене морфологије и изгледа интрестицијума без елемената фиброзе и инфилтрација, у групи која је имала тренинг трчањем примећен је регуларан распоред мишићних влакана, са хипертрофијом појединачних мишићних влакана са проширеним интерстицијумом и фокално умноженим масним ткивом-масна инфилтрација и лакостепени мононуклеарни ћелијски инфилтрат. Крвни судови уобичајене морфологије ендотелних ћелија и зидова. Интерстицијум је проширен са умереном масном инфилтрацијом и неравномерном дистрибуцијом ћелијског инфилтрата који углавном чине лимфоцити. Хипертрофија и истањеност влакана. У истањеним влакнима долази до кондензације саркоплазме и губитка попречне стријације као и једара, а присутна једра су пикнотично измењена (Слика 15 и 16).

У групама које су биле поврнуте тренингу и инхибиторима фосфодиестеразе примећена су истањена мишићна влакна са губитком стријације, фокалном кондензацијом саркоплазме и везикуларним једрима, као и изразито проширен интерстицијум на препарату скелетног мишића (слика 17-19). Интересантно је да у винпоцетин групи је приметна хипертрофија са проширеним интерстицијумом и локалним умножавањем везивног ткива уз мононуклеарну ћелијску инфилтрацију, што може указати на почетне стадијуме инфламације односно на антиинфламаторно локално деловање овог инхибитора (Слика 18). Са друге стране, у никардипин групи, примећују се мишићна влакна са проширеним интерстицијумом, при чему су поједина влакна су истањена, таласастог изгледа. Поред тога фокално се уочава полиморфизам и везикуларност једара и запажа се губитак стријације. У овој групи, једра су полиморфна, везикуларног изгледа, диспергованог хроматина и проминентног нуклеолуса, што указује на патолошке промене на нивоу скелетног мишића (Слика 20).

Винпоцетин остварује сличне морфолошке промене на нивоу срчаног и скелетног мишића када је у комбинацији са физичким тренингом. Инфламаторне промене у тим групама су очигледне, али не можемо са сигурношћу проценити да ли је винпоцетин ублажио настале инфламацијске промене настале интензивним физичким тренингом (хипертрофија и инфламација) или је тренинг деловао протективно у односу на

фармаколошко прекоиндифицирање. Имајући у виду литературне податке, вероватније је да винпоцетин има антиинфламаторан ефекат у овом случају као и да су инфламаторне промене у регресији, на шта указује постојање везивног ткива. Претходна истраживања наглашавају значај винпоцетина у васкуларном ремоделовању и то механизмом инхибиције пролиферације и миграције глатких мишићних ћелија, односно значајно утиче на неоинтималну формацију у каротидним артеријама након оштећења какво се среће у инфаркту миокарда. Поред тога, описано је и да значајно смањује акумулацију колагена и експресију фибронектина, и то механизмом атенуације реактивних кисеоничних врста које настају при оштећењу. Оваква сазнања у комбинацији са нашим резултатима дају могућност потенцијалне примене винпоцетина у пролиферативним васкуларним поремећајима (218).

Наши резултати су указали да физички тренинг умереног интензитета довољног трајања самостално или у комбинацији са инхибиторима PDE-1 смањило ослобађање прооксиданаса и побољшао активност ензима антиоксидационе заштите, превенирајући системски оксидациони стрес или ограничавајући његово ширење. Физички тренинг умереног интензитета доводи до развијања позитивних протективних адаптивних механизма који се манифестују смањењем оксидационог стреса и побољшањем одбрамбених способности организма.

Добијени резултати су од великог клиничког значаја јер доводе до разумевања нефармаколошких и фармаколошких стратегија у превенцији и терапији узрока, односно последица оксидационог стреса у организму и доприносе расветљавању механизма којима би одређене терапије могле да делују на патофизиолошке поремећаје у чијој основи се налази поремећена редокс равнотежа.

# ЗАКЉУЧЦИ

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу све претходно наведеног, можемо закључити следеће:

- У условима физичке утренираности пацова, сва три инхибитора фосфодиестеразе 1 (никардипин, винпоцетин и нимодипин) повећавају параметре контрактилности, са доминантнијим повећањем максималне и минималне стопе раста притиска у левој комори као и систолног притиска након примене винпоцетина и нимодипина. Значајан пораст срчане фреквенце и коронарног протока корелира са применом нимодипина у односу на контролну групу
- Винпоцетин и никардипин се одликују “тахикардичним” особинама, а нимодипин вазодилататорним ефектима.
- Физички тренинг у комбинацији са PDE1 инхибиторима потенцира њихове фармаколошке ефекте на кардиодинамику.
- Нимодипин доминантно делује на контрактилност крвних судова срца јер као 1,4-дихидропиридински блокатор калцијумских канала стабилизује волтажно зависне канале за калцијум Л-типа и тиме превенира контракцију мишићних ћелија и последничну вазоконстрикцију.
- У редокс равнотежи обе методе прекондиционирања остварују подједнаку улогу и то смањењем нивоа липидне пероксидације и повећањем нивоа нитрита.
- Физички тренинг умереног интензитета адекватног трајања самостално или у комбинацији са PDE1 инхибиторима доводи до развијања позитивних протективних адаптивних механизма у виду редукације оксидационог стреса и побољшања одбрамбених способности организма.



# ЛИТЕРАТУРА

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Laslett LJ, Alagona P, Clark BA, Drozda JP, Saldivar F, Wilson SR, Poe C, Hart M. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:S1–S49.
2. Mickovski N, Jakovljević B, Lapčević M. Klasifikacija, epidemiologija, faktori rizika i primarna prevencija ishemijske bolesti srca. *Srce i Krvni Sudovi* 2011;30. 10.5937/siks1103145M.
3. Mendoza W, Miranda JJ. Global Shifts in Cardiovascular Disease, the Epidemiologic Transition, and Other Contributing Factors: Toward a New Practice of Global Health Cardiology. *Cardiol Clin.* 2017;35(1):1-12.
4. Olvera Lopez E, Jan A. Stat Pearls [Internet]. Stat Pearls Publishing; Treasure Island (FL): Dec 6, 2019. Cardiovascular Disease.
5. Nowbar AN, Gitto M, Howard JP, Francis DP, Al-Lamee R. Mortality from ischemic heart disease. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2019; 12(6):e005375.
6. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001;104(22):2746-2753.
7. Alwan A, Maclean DR, Riley LM, et al. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *Lancet* 2010;376(9755):1861-1868.
8. Roberts R. Genetics of coronary artery disease: an update. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* 2014;10(1):7-12.
9. Baines CP. How and when do myocytes die during ischemia and reperfusion: the late phase. *J Cardiovascular Ther* 2011;16(3-4):239-243.
10. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary vasomotor tone under normal conditions and during acute myocardial hypoperfusion. *Pharmacol Ther* 2000; 86:87–110.
11. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* 2008;88(3):1009-1086.
12. Giannoglou GD, Antoniadis AP, Koskinas KC, Chatzizisis YS. Flow and atherosclerosis in coronary bifurcations. *Euro Intervention* 2010; 6:16-23.
13. Daniels LB, Clopton P, deFilippi CR, Sanchez OA, Bahrami H, Lima JA et al. Serial measurement of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and cardiac troponin T for cardiovascular disease risk assessment in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am Heart J* 2015;170(6):1170-1183.
14. Wolf D, Zirlik A, Ley K. Beyond vascular inflammation—recent advances in understanding atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:3853–3869.
15. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481–348
16. Crossmann DC. The pathophysiology of myocardial ischaemia. *Heart* 2004;90(5): 576–580.
17. Berghuanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis *Neth Heart J* 2017; 25(4): 231–242
18. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol* 2002;7(1):40–53.
19. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J* 2013;34(10):719-28. Epub 2012 Dec 13
20. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25(3):287–299.

21. Sato H, Shibata M, Shimizu T, Shibata S, Toriumi H, Ebine T, et al. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience* 2013;248: 345-358.
22. Al-Gubory KH, Garrel C, Faure P, Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reprod Biomed Online* 2012;25(6):551–560.
23. Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013;46:200–206.
24. Beckmann JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271(5):C1424–C1437.
25. Cervelli T, Borghini A, Galli A, Andreassi MG. DNA damage and repair in atherosclerosis: current insights and future perspectives. *Int J Mol Sci* 2012;13(12):16929–16944.
26. Andreassi, Maria Grazia. DNA damage, vascular senescence and atherosclerosis. *J Mol Med* 2008;86: 1033-1043.
27. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90(17):7915–7922.
28. Guo C, Ding P, Xie C, Ye C, Ye M, Pan C, et al. Potential application of the oxidative nucleic acid damage biomarkers in detection of diseases. *Oncotarget*. 2017 Sep 8;8(43):75767-75777.
29. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000;21(3):361–370.
30. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999;424(1-2):83–95.
31. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and huMann disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44–84.
32. Togliatto G, Lombardo G, Brizzi MF. The Future Challenge of Reactive Oxygen Species (ROS) in Hypertension: From Bench to Bed Side. *Int J Mol Sci* 2017;18(9):1988. Published 2017 Sep 15.
33. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763.
34. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95:1062–1071.
35. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006;141(2):312–322.
36. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008;4(2):89–96.
37. Galle J, Heermeier K, Wanner C. Atherogenic lipoproteins, oxidative stress, and cell death. *Kidney Int Suppl* 1999;71:S62–S65.
38. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100(9):2153–2157.
39. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;91(6):2546–2551.
40. White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(3):1044-1048
41. Beckmann JS, Beckmann TW, Chen J, Marshall PA, Freemann BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(4):1620–1624.
42. Bachem MG, Wendelin D, Schneiderhan W, Haug C, Zorn U, Gross HJ, et al. Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins stimulate

- extracellular matrix synthesis or induce apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(3):319-326
43. Touyz RM, Deschepper C, Park JB, He G, Chen X, Neves MF, et al. Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang II-induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2002;20(6):1127-1134.
  44. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3217-3266.
  45. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemoattractant protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991;88(6):2039-2046.
  46. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004;44(4):275-295.
  47. Zwart LL, MeerMann JH, ComManndeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999;26(1-2):202-226.
  48. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1 Suppl):314S-321S.
  49. Pellegrino D. Antioxidants and cardiovascular risk factors. *Diseases* 2016;4(1):11. Published 2016 Feb 17.
  50. Urano S, Inomori Y, Sugawara T, Kato Y, Kitahara M, Hasegawa Y, et al. Vitamin E: inhibition of retinol-induced hemolysis and membrane-stabilizing behavior. *J Biol Chem* 1992;267(26):18365-18370.
  51. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999;37(9-10):949-962.
  52. Fukuzawa K, Inokami Y, Tokumura A, Terao J, Suzuki A. Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and alpha-tocopherol in liposomes. *Lipids* 1998;33(8):751-756.
  53. Keys SA, Zimmermann WF. Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. *Exp Eye Res* 1999;68(6):693-702.
  54. Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA* 1999;281(15):1415-1423.
  55. Jialal I, Vega GL, Grundy SM. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990;82:185-91.
  56. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995;22(4):375-383.
  57. Hertog MG, Feskens EJ, Hollmann PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342(8878):1007-1011.
  58. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995;155(4):381-386.
  59. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study, INTERHEART Study Investigators. *Lancet* 2004 Sep 11-17; 364(9438):937-952.
  60. Macek P, Zak M, Terek-Derszniak M, Biskup M, Ciepela P, Krol H, Smok-Kalwat J, Gozdz S. Age-dependent disparities in the prevalence of single and clustering

- cardiovascular risk factors: a cross-sectional cohort study in middle-aged and older adults. *Clin Interventions Aging* 2020; 15: 161-169.
61. Holm S, Oma I, Hagve TA, Saatvedt K, Brosstad F, Mikkelsen K, Rydningen H, Risnes I, et al. Levels of lipoprotein (a) in patients with coronary artery disease with and without inflammatory rheumatic disease: a cross-sectional study, *BMJ Open* 2019;9(5): e030651
  62. Fanapour PC, Yug B, Kochar MS. Hyperhomocysteinemia: An Additional Cardiovascular Risk Factor *WMJ* 1999;98(8):51-54.
  63. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
  64. Manngge H, Stelzer I, Reininghaus EZ, Weghuber D, Postolache TT, Fuchs D. Disturbed tryptophan metabolism in cardiovascular disease. *Curr Med Chem* 2014; 21(17):1931-1937.
  65. Bjartveit K, Tverdal A. Health consequences of smoking 1–4 cigarettes per day. *Tobacco Control* 2005;14(5):315–320.
  66. Oliveira A, Barros H, Maciel MJ, Lopes C. Tobacco smoking and acute myocardial infarction in young adults: a population-based case-control study. *Prev Med* 2007; 44(4):311-316.
  67. Markidan J, Cole JW, Cronin CA, Merino JG, Phipps MS, Wozniak MA, Kittner SJ. smoking and risk of ischemic stroke in young men. *Stroke* 2018; 49(5):1276-1278.
  68. Kendall DM, Harmel AP, Kendall DM, Harmel AP. The metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease: understanding the role of insulin resistance. *Am J Mannag Care* 2002;8(20):S635-653.
  69. Krenz M, Korthuis RJ. Moderate ethanol ingestion and cardiovascular protection: from epidemiologic associations to cellular mechanisms. *J Mol Cell Card* 2012;52(1):93-104.
  70. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Mannag* 2007;3(6):853-876.
  71. Vanuzzo D, Giampaoli S. 70th Anniversary of the Framingham Heart Study. *Cardiovascular Epidemiology from the Past to the Future, Ital Cardiol (Rome)*. 2018; 19(11):601-605.
  72. Crawford MH. Chapter 6. Chronic ischemic heart disease. In: Crawford MH, editor. *Current diagnosis & treatment: cardiology, 4e*. New York: McGraw-Hill; 2014.
  73. Paffenbarger RS Jr, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med* 1993;328:538-545.
  74. Králová A, Králová Lesná I, Poledne R. Immunological aspects of atherosclerosis *Physiol Res* 2014;63(3):S335-42.
  75. McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res* 2011;50(4):331-347.
  76. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 2013;13:709–721.
  77. Yoshida H. Front line of oxidized lipoproteins: role of oxidized lipoproteins in atherogenesis and cardiovascular disease risk. *Rinsho Byori* 2010; 58(6):622-630.
  78. Babiak J, Rudel L. Lipoproteins and atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1987;1(3):515-550.
  79. Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med* 2002; 162(16):1867-1872.
  80. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et.al; Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *American*

- Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 2005;112(17):2735-2752.
81. Ades PA, Savage PD, Toth MJ, Harvey-Berino J, Schneider DJ, Bunn JY, Audelin MC, Ludlow Met al. High-calorie-expenditure exercise: a new approach to cardiac rehabilitation for overweight coronary patients. *Circulation* 2009;119(20):2671-2678.
  82. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham heart study and the epidemiology of cardiovascular disease: A historical perspective. *Lancet* 2014; 383:999–1008.
  83. Simon AS, Vijayakumar T. Molecular studies on coronary artery disease-a review. *Indian J Clin Biochem* 2013;28(3):215–226.
  84. Sutton-Tyrell K, Lassila HC, Meilahn E, Bunker C, Matthews KA, Kuller LH. Carotid atherosclerosis in premenopausal and postmenopausal women and its association with risk factors measured after menopause. *Stroke* 1998;29:1116-1121.
  85. Egred M, Viswanathan G, Davis GK. Myocardial infarction in young adults. *Postgrad Med J* 2005;81:741–745.
  86. Veronesi G, Gianfagna F, Giampaoli S, Chambless LE, Mannica G, Cesana G, Ferrario MM. Improving longterm prediction of first cardiovascular event: the contribution of family history of coronary heart disease and social status. *Prev Med* 2014;64:75–80.
  87. Stephens JW, Humphries SE. The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *J Intern Med* 2003;253(2):120–127.
  88. Vaccarino V, Johnson BD, Sheps DS, Reis SE, Kelsey SF, Bittner V, et al. Depression, inflammation, and incident cardiovascular disease in women with suspected coronary ischemia: The national heart, lung, and blood institute-sponsored wise study. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;50:2044–2050.
  89. Meigs JB, Jacques PF, Selhub J, Singer DE, Nathan DM, Rifai N, et al. Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: The Framingham offspring study. *Diabetes Care* 2001;24:1403–1410.
  90. Neki NS. Hyperhomocysteinemia - an independent risk factor for cardiovascular diseases. *J IACM* 2003;4:55–60.
  91. Donald M, Kiang L, Lu Tian, Greenland P. Assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2006;145(1):35–42.
  92. Enas EA. Lipoprotein (a) is an important genetic risk factor for coronary artery disease in Asian Indians. *Am J Cardiol* 2001;88:201–202.
  93. Tate LM, Tsai PF, Landes RD, Rettiganti M, Lefler LL. Temporal discounting rates and their relation to exercise behavior in older adults. *Physiol Behav* 2015;152(Pt A):295–299. 10.1016/j.physbeh.2015.10.003
  94. Light S. History of therapeutic exercise. In: *Therapeutic Exercise*, ed. Light S. New Haven, CT: Elizabeth Licht, 1958, p. 380–422.
  95. 2008 Physical Activity Guidelines for Americans. US Department of Health and HuMann Services; 2008. [Accessed May 31, 2011]
  96. Pollock M, Gaesser G, Butcher J, Despres J, DishMann R, Franklin B, et al. American College of Sports Medicine position stand: the recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30(6):975–991.
  97. Warburton DER, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. *Curr Opin Cardiol* 2017;32:541–556.
  98. Lee DC, Pate RR, Lavie CJ, Sui X, Church TS, Blair SN. Leisure time running reduces all cause and cardiovascular mortality risk. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:472–481.
  99. Flint AJ, Hu FB, Glynn RJ, Caspard H, Mannson JE, Willett WC, Rimm EB. Excess weight and the risk of incident coronary heart disease among men and women. *Obesity* 2010;18(2):377–383.

100. Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, McAlister FA. Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *Am Heart J* 2008;156(1):13–22.
101. Lira FS, Yamashita AS, Uchida MC, Zanchi NE, Gualano B, Martins E, et al. Low and moderate, rather than high intensity strength exercise induces benefit regarding plasma lipid profile. *Diabetol Metab Syndr* 2010;2:31.
102. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Effect of physical activity on serum C-reactive protein. *Am J Cardiol* 2004;93:221–225.
103. Cramer H., Lauche R., Haller H., Steckhan N., Michalsen A., Dobos G. Effects of yoga on cardiovascular disease risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 2014;173:170–183.
104. Mul JD, Stanford KI, HirshMann MF, Goodyear LJ. Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;135:17-37.
105. Wienbergen H, Hambrecht R. Physical exercise and its effects on coronary artery disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2013;13(2):218–225.
106. Hornig B, Maier V, Drexler H: Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1996;93:210-214.
107. Despres JP. Abdominal obesity: the most prevalent cause of the metabolic syndrome and related cardiometabolic risk. *Eur Heart J.* 2006;8:4–12.
108. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, FlaxMann A, Murray CJ, Naghavi M. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation* 2014;129(14):1493-501. Epub 2014 Feb 26.
109. Stable angina: Management. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2016.
110. Percutaneous Coronary Intervention. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi.* 2018;55(1):46-50.
111. Frasier CR, Moore RL, Brown DA. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. *J Appl Physiol* 2011;111:905-915.
112. Bishopric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:141–150.
113. Piper HM, Kasseckert SA, Schlüter KD, Abdallah Y. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury. *Deutsch Med Wochenschr* 2008; 133(12):586-590.
114. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124–1136.
115. Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 1991;260(3 Pt 2):H796–H804.
116. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104(24):2981–2989.
117. Gross ER, Gross GJ. Ischemic preconditioning and myocardial infarction: An Update and Perspective. *Drug Discov Today Dis Mech* 2007;4(3):165–174.
118. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301(5):H1723-741.
119. Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischaemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc Res* 1992;26(3):226–231.
120. Jeremic N, Petkovic A, Srejsovic I, Zivkovic V, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart. *Braz J Cardio Surg;* 2015:266-275.
121. Kunst G, Klein AA. Peri-operative anaesthetic myocardial preconditioning and protection-cellular mechanisms and clinical relevance in cardiac anaesthesia. *Anaesthesia* 2015;70(4):467–482.

122. Kaljusto ML, Stensløkken KO, Mori T, Panchenko A, Frantzen ML, Valen G, et al. Preconditioning effects of steroids and hyperoxia on cardiac ischemia–reperfusion injury and vascular reactivity. *Eur J Cardiothor Surg* 2008;33(3):355–363.
123. Bradamante S, Piccinini F, Barenghi L, Bertelli AA, De Jonge R, Beemster P, et al. Does resveratrol induce pharmacological preconditioning? *Int J Tissue React* 2000;22(1):1–4.
124. Downey JM, Krieg T, Cohen MV. Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach. *Ann NY Acad Sci* 2008;1123:187–196.
125. Gori T, Di Stolfo G, Sicuro S, Dragoni S, Lisi M, Forconi S, Parker JD. Nitroglycerin protects the endothelium from ischaemia and reperfusion: huMann mechanistic insight. *Br J Clin Pharmacol* 2007;64: 145–150 .
126. Tang XL, Xuan YT, Zhu Y, Shirk G, Bolli R. Nicorandil induces late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(4):H1273–H1280.
127. Tarkin JM, Kaski JC. Nicorandil and Long-acting Nitrates: Vasodilator Therapies for the Mannagement of Chronic Stable Angina Pectoris. *Eur Cardiol* 2018;13(1):23–28.
128. Baxter GF. Role of adenosine in delayed preconditioning of myocardium. *Cardiovasc Res* 2002;55(3):483–494.
129. Baxter GF, Ebrahim Z. Role of bradykinin in preconditioning and protection of the ischaemic myocardium. *Br J Pharmacol* 2002;135(4):843–854.
130. Kots AY, Martin E, Sharina IG, Murad F. A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(191):1-14.
131. Ashmann D, Lipton R, Melicow M, Price D. Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1963;11:330–334.
132. Amsallem E, Kasparian C, Haddour G, Boissel JP, Nony P. Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev (Online)* 2005;1 CD002230
133. Orstavik O, Ata SH, Riise J, Dahl CP, Andersen GO, Levy FO, et al. PDE3-inhibition by levosimendan is sufficient to account for its inotropic effect in failing humann heart. *Br J Pharmacol* 2014;171:5169–5181.
134. Baillie GS, Tejada GS, Kelly MP. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nature reviews. Drug Discovery* 2019;18(10):770-796.
135. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 2006;147(1):S252–S257.
136. Medina AE. Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions. *Front Neurosci* 2011;5:21. Published 2011 Feb 18.
137. Sharma RK, Wang JH, Wu Z. Mechanisms of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonists. *J Neurochem* 1997;69(2):845–850.
138. Maggi M, Filippi S, Ledda F, Magini A, Forti G. Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy. *Eur J Endocrinol*. 2000; 143(2):143-54.
139. Behling A, Rohde LE, Colombo FC, Goldraich LA, Stein R, Clausell N.Effects of 5'-phosphodiesterase four-week long inhibition with sildenafil in patients with chronic heart failure: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Card Fail* 2008;14:189–197.
140. Miller CL, Cai Y, Oikawa M, Thomas T, Dostmann WR, Zaccolo M, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart. *Basic Res Cardiol* 2011;106:1023–1039.
141. Whiting RL, Dow RJ, Graham DJM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of nicardipine. *Angiology* 1990; 41 (11): 987–989.



142. Valikovics A, Csányi A, Németh L. Study of the effects of vinpocetin on cognitive functions. *Ideggyogy Sz* 2012;65(3-4):115-120.
143. Nekrassov V, Sitges M. Comparison of acute, chronic and post-treatment effects of carbamazepine and vinpocetine on hearing loss and seizures induced by 4-aminopyridine. *Clin Neurophysiol* 2008;119:2608–2614.
144. Roos YBWEM, Levi M, Carroll TA, Beenen LFM, Vermeulen M. Nimodipine increases fibrinolytic activity in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2001;32:1860-1862.
145. Szapáry L, Késmárky G, Tóth K, Misnyovszky M, Tóth T, Balogh A, et al. Vinpocetin in neurological diseases. *Ideggyogy Sz* 2012;65(11-12):387-393.
146. Blaha L, Erzigkeit H, Adamczyk A, Freytag S, Schaltenbrand R. Clinical evidence of the effectiveness of vinpocetine in the treatment of organic psychosyndrome. *Humann Psychopharmacol* 1989;4(2):103-111.
147. Patyar S, Prakash A, Modi M, Medhi B. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. *Pharmacol Rep* 2011;63(3):618–628.
148. Nicholson CD. Pharmacology of nootropics and metabolically active compounds in relation to their use in dementia. *Psychopharmacol (Berl)*. 1990;101(2):147–159.
149. Szatmari SZ, Whitehouse PJ. Vinpocetine for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(1):CD003119.
150. Zhang J, Liu J, Li D, Zhang C, Liu M. Calcium antagonists for acute ischemic stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019;2:CD001928.
151. Das J, Zito PM. Nimodipine. [Updated 2019 Dec 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534870/>
152. Allen GS, Ahn HS, Preziosi TJ, Battye R, Boone SC, Chou SN, et al. Cerebral arterial spasm - a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med* 1983; 17;308(11):619-624.
153. Birks J, López-Arrieta J. NIModipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2002;3: CD000147.
154. Curran MP, Robinson DM, Keating GM. Intravenous nicardipine: its use in the short-term treatment of hypertension and various other indications. *Drugs* 2006;66(13):1755–1782.
155. Wright JM, Musini VM, Gill R. First-line drugs for hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018;4: CD001841.
156. Ayme-Dietrich E, Marzak H, Lawson R, et al. Contribution of serotonin to cardiac remodeling associated with hypertensive diastolic ventricular dysfunction in rats. *J Hypertens* 2015;33:2310-2321.
157. Jeremic N, Petkovic A, Srejavic I, Zivkovic V, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2015;30(2):266-275.
158. Farah D, Nunes J, Sartori M, Dias DD, Sirvente R, Silva MB, et al. Exercise training prevents cardiovascular derangements induced by fructose overload in developing rats. *PLOS ONE* 2016; 11:e0167291
159. Sharma S, Deshmukh R. Vinpocetine attenuates MPTP-induced motor deficit and biochemical abnormalities in Wistar rats. *Neuroscience* 2015;286:393-403.
160. Wang K, Wen L, Peng W, Li H, Zhuang J, Lu Y, et al. Vinpocetine attenuates neointimal hyperplasia in diabetic rat carotid arteries after balloon injury. *PLOS ONE* 2014;9:e96894.
161. Yamada S, Uchida S, Naito T, Urayama A, Kimura R, Murakami Y, et al. Increase in receptor binding affinity for nimodipine in the rat brain with permanent occlusion of bilateral carotid arteries. *Life Sci* 2000;66:1351-1357.

162. Döring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique-function-application. *Physiol Bohem* 1990;39(6):481-504. PMID: 2103635.
163. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Une, Boca Raton. 1985; 123–132.
164. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358.
165. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Met* 1980; 38(1-2): 161-170.
166. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126(1): 131-138.
167. Beutler E. Catalase. In: Beutler E, ed. *Red cell metabolism, a Manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton 1982;105-106.
168. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E, ed. *Red cell metabolism, a Manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton; 1975;112-114.
169. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247(10):3170-3175.
170. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, ed. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia: Grune and Stratton; 1984:83-85.
171. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*. 2008;2008: pdb.prot4986.
172. Simioni C, Zali G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonnelli A, Neri LM. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget* 2018;9(24):17181-17198.
173. Green DJ, Eijsvogels T, Bouts YM, Maiorana AJ, Naylor LH, Scholten RR, et al. Exercise training and artery function in huManns: nonresponse and its relationship to cardiovascular risk factors. *J Appl Physiol* 2014;117(4):345–352.
174. Farah BQ, Barbosa SS, Vianna LC, Cornelissen VA, Ritti-Dias RM. Acute and chronic effects of isometric handgrip exercise on cardiovascular variables in hypertensive patients: a systematic review. *Sports (Basel)* 2017;5(3):E55.
175. Jakovljevic B, Nikolic Tunic T, Jeremic N, Jeremic J, Bradic J, et al. The impact of aerobic and anaerobic training regimes on blood pressure in normotensive and hypertensive rats: focus on redox changes. *Mol Cell Biochem* 2019;454(1-2): 111-121.
176. Paffenbarger RS, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med* 1993;328:538-545.
177. Morris JN, Everitt MG, Pollard R, Chave SP, Semmence AM. Vigorous exercise in leisure-time: protection against coronary heart disease. *Lancet* 2 1980; 1207-1210.
178. Pickard JMJ, Burke N, Davidson SM, Yellon DM. Intrinsic cardiac ganglia and acetylcholine are important in the mechanism of ischaemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2017;112:11.
179. Zhang JY, Kg LH, Lai D, Jin, ZX, Gu XM, Zhou JJ. Glutamate protects against Ca<sup>2+</sup> paradox induced injury and inhibits calpain activity in isolated rat hearts. *Clin Exp Pharm Physiol* 2016;43:951-959.
180. Bell JR, Erickson JR, Delbridge LMD. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent kinase II: a critical mediator in determining reperfusion outcomes in the heart? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2014; 41(11):940–946.
181. Hashimoto T, Kim GE, Tunin RS, Adesiyun T, Hsu S, Nakagawa R, et al. Acute enhancement of cardiac function by phosphodiesterase type 1 inhibition. *Circulation* 2018;138(18):1974-1987.

182. Derici MK, Sadi G, Cenik B, Güray T, Demirel-Yilmaz E. Differential expressions and functions of phosphodiesterase enzymes in different regions of the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2019;844:118-129..
183. Li P, Zheng H, Zhao J, Zhang L, Yao W, Zhu H, et al. Discovery of potent and selective inhibitors of phosphodiesterase 1 for the treatment of cognitive impairment associated with neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. *J Med Chem* 2016; 59:1149–1164.
184. Laursen M, Beck L, Kehler J, Christoffersen CT, Bundgaard C, Mogensen S, et al. Novel selective PDE type 1 inhibitors cause vasodilatation and lower blood pressure in rats. *Br J Pharmacol* 2017;174(15):2563-2575.
185. Kaumann AJ, Galindo-Tovar A, Escudero E, Vargas ML. Phosphodiesterases do not limit beta1-adrenoceptor-mediated sinoatrial tachycardia: evidence with PDE3 and PDE4 in rabbits and PDE1-5 in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009;380(5):421-430.
186. Bischoff E. Potency, selectivity, and consequences of non selectivity of PDE inhibition. *Int J Impot Res* 2004;16(1):S11-14.
187. Ansari MA, Iqbal A, Ekbbal R, Haque SE. Effects of nimodipine, vinpocetine and their combination on isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. *Biomed Pharmacother* 2019;109:1372-1380.
188. Zhang YS, Li JD, Yan C. An update on vinpocetine: New discoveries and clinical implications. *Eur J Pharmacol* 2018;819:30-34. Epub 2017 Nov 26.
189. McCarthy RT, Cohen CJ. Nimodipine block of calcium channels in rat vascular smooth muscle cell lines. Exceptionally high-affinity binding in A7R5 and A10 cells. *J Gen Physiol* 1989;94(4):669-692.
190. Richard S. Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. *Drugs* 2005;65(2):1-10.
191. Weber KT, Janicki JS, Maskin CS. Effects of new inotropic agents on exercise performance. *Circulation* 1986;73(3):196-204.
192. Bowles DK, Starnes JW. Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol* 1994;76:1608-1614.
193. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1978;45:927–932.
194. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants *J Appl Physiol* 2000;89(1):21–28.
195. Bradic J, Dragojlovic Ruzicic R, Jeremic J, Milovanovic Z, Petkovic A, Srejovic I et al. Comparison of training and detraining on redox state of rats: gender specific differences. *Gen Physiol Biophys* 2018;37(3):285–297.
196. Scuto MC, Mancuso C, Tomasello B, Laura Ontario M, Cavallaro A, Frasca F, et al. Curcumin, hormesis and the nervous system. *Nutrients* 2019;11(10):2417. Published 2019 Oct 10.
197. Trovato Salinaro A, Pennisi M, Di Paola R, Scuto M, Crupi R, Cambria MT, et al. Neuroinflammation and neurohormesis in the pathogenesis of Alzheimer's disease and Alzheimer-linked pathologies: modulation by nutritional mushrooms. *Immun Ageing* 2018;15:8. Published 2018 Feb 14.
198. Sirmagul B, Ozdener F, Gulbas Z, Erol K. Calcium channel blockers increase the amount of nitrite production in rabbits without decreasing the responsiveness of platelets to collagen. *Clin Exp Med* 2007;7(4): 142-148.
199. Nabavi SM, Talarek S, Listos J, Nabavi SF, Devi KP, Roberto de Oliveira M, et al. Phosphodiesterase inhibitors say NO to Alzheimer's disease. *Food Chem Toxicol* 2019; 134:110822.

200. Mokry J, Urbanova A, Kertys M, Mokra D. Inhibitors of phosphodiesterases in the treatment of cough. *Respir Physiol Neurobiol* 2018;257:107-114.
201. Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol* 2013;57:119–128.
202. Kouoh F, Gressier B, Dine T, Luyckx M, Brunet C, Ballester L, et al. Antioxidant effects and anti-elastase activity of the calcium antagonist nifedipine on activated human and rabbit neutrophils - a potential antiatherosclerotic property of calcium antagonists? *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16(6):515-520.
203. Ruiz-Miyazawa KW, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Pavao-de-Souza GF, Casagrande R, Verri WA. Vinpocetine reduces carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in mice by inhibiting oxidative stress, cytokine production and NF- $\kappa$ B activation in the paw and spinal cord. *PLOS ONE* 2015;10(3):e0118942.
204. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3217-3266.
205. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 1994;74:349–53.
206. Brovkovich VV, Kalinowski L, Muller-Peddinghaus R, Malinski T. Synergistic antihypertensive effects of nifedipine on endothelium: concurrent release of NO and scavenging of superoxide. *Hypertension* 2001;37: 34–39.
207. Simonovic N, Jeremic J. Role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning. *Ser J Exp Clin Res* 2017;18: 281–287.
208. Sirmagul B, Ozdener F, Gulbas Z, Erol K. Calcium channel blockers increase the amount of nitrite production in rabbits without decreasing the responsiveness of platelets to collagen. *Clin Exp Med* 2007;7(4): 142-148.
209. Sozmen EY, Kerry Z, Uysal F, Yetik G, Yasa M, Ustunes L, Onat T. Antioxidant enzyme activities and total nitrite/nitrate levels in the collar model. Effect of nifedipine. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(1): 21-25.
210. Zhang X, Hintze TH. Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation* 1998;97(6):576-580.
211. Santos MS, Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR. Synaptosomal response to oxidative stress: effect of vinpocetine. *Free Radic Res* 2000;32(1):57–66.
212. Marzatico F, Gaetani P, Spanu G, Buratti E, Rodriguez y Baena R. Effects of nifedipine treatment on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> + ATPase and lipid peroxidation after experimental subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 1991;108(3-4): 128-133.
213. Moselhy H, Reid R, Yousef S, Boyle S. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *J Lipid Res* 2013;54(3):852–858.
214. Abdel-Salam OM, Khadrawy YA, Salem NA, Sleem AA. Oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain: the effect of piracetam and vinpocetine. *Neurochem Res* 2001;36(6):1062-1072.
215. Carlos DM, Goto S, Urata Y, Iida T, Cho S, Niwa M, et al. Nifedipine normalizes elevated levels of antioxidant activity in response to xanthine oxidase-induced oxidative stress in hypertensive rat heart. *Free Radic Res* 1998;29(2):143–150.
216. Knight W, Yan C. Therapeutic potential of PDE modulation in treating heart disease. *Future Med Chem.* 2013;5(14):1607-1620.
217. Miller CL, Oikawa M, Cai Y, Wojtovich AP, Nagel DJ, Xu X, et al. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 2009 Nov 6;105(10):956-64.

218. Cai Y, Knight WE, Guo S, Li JD, Knight PA, Yan C. Vinpocetine suppresses pathological vascular remodeling by inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343(2):479-488. doi:10.1124/jpet.112.195446