



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Нина Симоновић

**Утицај прекондиционарања антагонистима L-типа калцијумских
канала и никорандилом самостално и у комбинацији са
хипербаричном оксигенацијом на функционални опоравак
изолованог срца пацова**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: др сци. мед. Владимир Јаковљевић, редовни професор

Крагујевац, 2019. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Нина Симоновић
Датум и место рођења: 05.04.1987. године, Београд, Србија
Садашње запослење: Дом здравља "Вождовац"
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај прекондиционирања антагонистима L-типа калцијумских канала и никорандилом самостално и у комбинацији са хипербаричном оксигенацијом на функционални опоравак изолованог срца пацова
Број страница: 135
Број слика: 17
Број схема: 5
Број табела: 14
Број графикана: 27
Број библиографских података: 192
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина, Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином
Ментор: др сци. мед. Владимир Јаковљевић, редовни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 05.04.2017. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-584/23 од 07.06.2017.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: Проф. др Сузана Пантовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан Доц. др Владимир Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: Доц. др Иван Срејовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник Проф. др Жарко Финдерле, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Љубљани, (визитинг професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу) за ужу научну област Физиологија, члан Доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, члан
Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Циљ ове студије био је да испита и упореди ефекате прекондиционарања фармаколошким агенсима, хипербаричном оксигенацијом, као и њихове комбиноване примене на анималном моделу. У студију је било укључено 96 пацова (*Wistar albino* сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 200 ± 50 г). У први део студије (*in vivo*) било је укључено 48 животиња које су биле изложене прекондиционарању хипербаричном оксигенацијом (ХБО) у трајању од 14 дана. Након тога је уследио други део студије (*ex vivo*) који је обухватио све животиње које су биле укључене у студију. Изолована срца пацова су перфундована методом ретроградне перфузије по Лангендорфу при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cm H₂O, а након стабилизације срца су подељена у две контролне (контрола без прекондиционарања и ХБО – срца пацова који су били изложени хипербаричној оксигенацији) и 6 експерименталних група које су се међусобно разликовале у примењеном маневру прекондиционарања (верапамил, амлодипин, никорандил или комбиновано ХБО + верапамил, ХБО + амлодипин, ХБО + никорандил). Потом су срца била излагана глобалној исхемији у трајању од 20 минута и реперфузији у трајању од 30 минута. Током читавог експерименталног протокола бележени су кардиодинамски параметри, коронарни проток и сакупљан је коронарни венски ефлуент из кога су одређивани параметри оксидационог стреса. Добијени резултати јасно указују да блокирање калцијумског канала или активација АТР-зависних калијумских канала може посредовати заштитном ефекту прекондиционарања миокарда, сви испитивани лекови имају корисна кардиопротективна својства повезана са нижим вредностима главних прооксидационих молекула.

ABSTRACT

The aim of this study was to examine and compare the effects of preconditioning with pharmacological agents, hyperbaric oxygenation, and their combined applications on the animal model. The study included 96 rats (*Wistar albino*, male gender, 8 weeks old, body weight $200 \pm 50\text{g}$). In the first part of the study (*in vivo*), 48 animals were exposed to hyperbaric oxygenation (HBO) over 14 days. A second part of the study (*ex vivo*) included all the animals involved in the study. Isolated heart rats were perfused by the Langendorff retrograde method at a constant coronary pressure of 70 cm H₂O, and after stabilization period heart were divided into two controls (control without preconditioning and HBO - heart of rats exposed to hyperbaric oxygenation) and 6 experimental groups differed in the applied preconditioning maneuver (verapamil, amlodipine, nicorandil or combined HBO + verapamil, HBO + amlodipine, HBO + nicorandil). Then, the heart was exposed to global ischemia for 20 minutes and reperfusion for 30 minutes. During the entire experimental protocol, cardiodynamic parameters and coronary flow were recorded, while a coronary venous effluent was collected form determination of oxidative stress parameters. Obtained results clearly indicate that blocking of the calcium channel or activation of ATP-sensitive K⁺ channel can mediate the protective effect of myocardial preconditioning; all investigated drugs have useful cardioprotective properties associated with lower values of the major prooxidation molecules.

САДРЖАЈ

1. УВОД	9
1.1. КАРДИОВАСКУЛАРНЕ БОЛЕСТИ	9
1.1.1. ИСХЕМИЈСКА БОЛЕСТ СРЦА	9
1.2. ФЕНОМЕН ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА МИОКАРДА ИСХЕМИЈОМ	11
1.3. НЕФАРМАКОЛОШКО ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊЕ МИОКАРДА	14
1.3.1. ХИПЕРБАРИЧНА ОКСИГЕНАЦИЈА У МОДЕЛУ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА МИОКАРДА	14
1.4. ФАРМАКОЛОШКО ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊЕ МИОКАРДА	16
1.4.1. АНТАГОНИСТИ L-ТИПА КАЛЦИЈУМСКИХ КАНАЛА У МОДЕЛУ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА	16
1.4.1.1. 1,4-Дихидропиридински деривати у прекондиционирању миокарда	18
1.4.1.1.1. Амлодипин	19
1.4.1.2. Фенилалкиламински деривати у прекондиционирању миокарда	21
1.4.1.2.1. Верапамил	22
1.4.1.3. Бензотиазепински деривати у прекондиционирању миокарда	23
1.4.2. ЛЕКОВИ КОЈИ ОТВРАЈУ КАЛИЈУМ-АТР СЕНЗИТИВНЕ КАНАЛЕ	25
1.4.2.1. Никорандил	26
1.5. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС И КАРДИОВАСКУЛАРНЕ БОЛЕСТИ	27
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	29
2.1. ОСНОВНИ ЦИЉ	29
2.2. ОПШТИ ЦИЉЕВИ	29
2.3. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	31
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ	31
3.2. ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊЕ ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ	32
3.3. <i>LANGENDORFF</i>-ОВ МОДЕЛ РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА	33
3.3.1. ПРИПРЕМА <i>KREBS-HENSENLEIT</i> -ОВОГ РАСТВОРА ЗА ПЕРФУНДОВАЊЕ	34
3.3.2. ПОСТУПАК ИЗОЛОВАЊА И ПРИПРЕМЕ СРЦА	35
3.3.3. ПРОТОКОЛ НА <i>LANGENDORFF</i> -ОВОМ АПАРАТУ	36
3.3.4. ЛЕКОВИ КОЈИ СУ КОРИШЋЕНИ У ИСТРАЖИВАЊУ	36
3.4. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ	37
3.4.1. ОДРЕЂИВАЊЕ ИНДЕКСА ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ (МЕРЕН КАО ТВАРС)	37

3.4.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)	39
3.4.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)	40
3.4.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)	41
3.4.5. Одређивање каталазе (CAT)	43
3.4.6. Одређивање супероксид дисмутазазе (SOD)	43
3.4.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)	44
3.5. Хистопатолошка анализа срца пацова	45
3.5.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	45
3.6. Снага студије и величина узорка	46
3.7. Статистичка обрада података	46
4. РЕЗУЛТАТИ	47
<hr/>	
4.1. Ефекти фармаколошког прекондиционирања на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	47
4.1.1. Ефекти прекондиционирања верапамилем	47
4.1.2. Ефекти прекондиционирања амлодипином	50
4.1.3. Ефекти прекондиционирања никорандилом	53
4.1.4. Промене кардиодинамских параметара и коронарног протока у односу на акутно примењен фармаколошки агенс	56
4.2. Ефекти комбиновања два маневра прекондиционирања на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	58
4.2.1. Ефекти комбинованог прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и верапамилем	58
4.2.2. Ефекти комбинованог прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и амлодипином	61
4.2.3. Ефекти комбинованог прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и никорандилом	64
4.2.4. Промене кардиодинамских параметара и коронарног протока у ХБО групи у односу на акутно примењен фармаколошки агенс	67
4.3. Компарација кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца пацова између фармаколошког и комбинованог прекондиционирања	69
4.3.1. Поређење ефеката прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и контролне групе	69
4.3.2. Поређење ефеката прекондиционирања верапамилем и комбинованог прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и верапамилем	71

4.3.3. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА АМЛОДИПИНОМ И КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И АМЛОДИПИНОМ	73
4.3.4. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НИКОРАНДИЛОМ И КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И НИКОРАНДИЛОМ	75
4.4. ЕФЕКТИ ФАРМАКОЛОШКОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЕФЛУЕНТУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	77
4.4.1. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ВЕРАПАМИЛОМ	77
4.4.2. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА АМЛОДИПИНОМ	79
4.4.3. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НИКОРАНДИЛОМ	81
4.4.4. ПРОМЕНЕ ПРООКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА У ОДНОСУ НА АКУТНО ПРИМЕЊЕН ФАРМАКОЛОШКИ АГЕНС	83
4.5. ЕФЕКТИ КОМБИНОВАЊА ДВА МАНЕВРА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЕФЛУЕНТУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	84
4.5.1. ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И ВЕРАПАМИЛОМ	84
4.5.2. ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И АМЛОДИПИНОМ	86
4.5.3. ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И НИКОРАНДИЛОМ	88
4.5.4. ПРОМЕНЕ ПРООКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА У ХБО ГРУПИ У ОДНОСУ НА АКУТНО ПРИМЕЊЕН ФАРМАКОЛОШКИ АГЕНС	90
4.6. КОМПАРАЦИЈА ПРООКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА У ЕФЛУЕНТУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА ИЗМЕЂУ ФАРМАКОЛОШКОГ И КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА	91
4.6.1. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И КОНТРОЛНЕ ГРУПЕ	91
4.6.2. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ВЕРАПАМИЛОМ И КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И ВЕРАПАМИЛОМ	92
4.6.3. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА АМЛОДИПИНОМ И КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И АМЛОДИПИНОМ	93
4.6.4. ПОРЕЂЕЊЕ ЕФЕКТА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НИКОРАНДИЛОМ И КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ХИПЕРБАРИЧНОМ ОКСИГЕНАЦИЈОМ И НИКОРАНДИЛОМ	94
4.7. ЕФЕКТИ ХБО НА СИСТЕМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА	95
4.7.1. ЕФЕКТИ ХБО НА ПРООКСИДАЦИОНЕ МАРКЕРЕ МЕРЕНЕ У КРВИ ПАЦОВА	95
4.7.2. ЕФЕКТИ ХБО НА АНТИОКСИДАЦИОНЕ МАРКЕРЕ МЕРЕНЕ У КРВИ ПАЦОВА	96
4.8. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ МАНЕВАРА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НА ГРАЂУ МИОКАРДА ПАЦОВА	97
4.8.1. ЕФЕКТИ ФАРМАКОЛОШКОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА	97

4.8.2. ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНОГ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА (ХБО + ФАРМАКОЛОШКИ АГЕНС)	101
4.8.3. ПОРЕЂЕЊЕ РАЗЛИЧИТИХ МАНЕВАРА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НА ГРАЂУ МИОКАРДА	104
5. ДИСКУСИЈА	105
5.1. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ МАНЕВАРА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	107
5.2. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ МАНЕВАРА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЕФЛУЕНТУ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА И СИСТЕМСКИ ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС ПАЦОВА	112
5.3. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ МАНЕВАРА ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА НА ОЧУВАНОСТ ГРАЂЕ МИОКАРДА ПАЦОВА	116
6. ЗАКЉУЧЦИ	119
7. ЛИТЕРАТУРА	120
БИОГРАФИЈА АУТОРА	136
БИБЛИОГРАФИЈА	137
AUTHORS CURRICULUM VITAE	138
LIST OF PUBLICATIONS	139
8. ПРИЛОЗИ	140
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА	140
8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION	143

1. УВОД

1.1. Кардиоваскуларне болести

Кардиоваскуларне болести (КВБ) представљају значајан здравствени проблем епидемијских размера и уједно су водећи узрок смрти широм света (1). Ова велика и хетерогена група обољења према десетој ревизији међународне класификације болести (МКБ10, ICD10 – *International Classification of Diseases*, 10. ревизија) обухвата: акутну реуматску грозницу, хроничне реуматске болести срца, болести узроковане повишеним крвним притиском, исхемијску болест срца (коронарна болест срца), болести срца плућног порекла и болести крвних судова плућа, болести крвних судова мозга, болести артерија, малих артерија и капилара, вена, лимфних судова и лимфних чворова и друге неозначене болести срца и крвотока (2). У основи најчешћих кардиоваскуларних обољења је атеросклероза, комплексно обољење спорог, али прогресивног тока, чији су патофизиолошки механизми у последњих неколико деценија интензивно проучавани са аспекта метаболичких, молекуларних и процеса који су посредовани имунским механизмима (3).

Услед такозване "епидемиолошке транзиције" број смртних исхода од КВБ се сваке године повећава и данас износи око 30%. Према епидемиолошким студијама сваке године у свету од КВБ умре преко 17 милиона становника, док само од акутног инфаркта миокарда оболи преко 6 милиона становника, од чега се смртни исход јавља код око 25% случајева. Иако се различите земље налазе у различитим фазама транзиције, предвиђа се да ће до 2020. године болести срца и крвних судова постати водећи узрок смрти у свим земљама, а нарочито у неразвијеним (4,5). Исхемијска болест срца (ИБС) представља најчешће обољење из ове велике групе обољења.

1.1.1. Исхемијска болест срца

Исхемија представља стање недовољног протока крви, при чему поред недовољне количине кисеоника која доспева до ткива, долази и до непотпуног одстрањивања метаболита. Са друге стране реперфузија представља поновно успостављање крвотока након исхемије, а појам исхемијско/реперфузиона (И/Р)

повреда представља суму свих штетних учинка који настају након исхемије и репрфузије (5,6).

ИБС настаје услед несклада између коронарног протока и потребе срца за кисеоником. Суужење лумена крвних судова је у 90% случајева последица атеросклеротских наслага. Атероматозне плоче сужавају лумен крвних судова, што доводи до смањења количине кисеоника и хранљивих материја до срца и последично долази до оштећења срчаног мишића, а самим тим и функције срца. Атеросклероза је процес који се односи на старење, али и многи други фактори су укључени у њен настанак. У малом броју случајева, ИБС може бити узрокована тромбозом, емболијом или спазмом коронарних крвних судова (6,7). У зависности од степена атеросклерозе, сужења коронарних крвних судова и брзине којом долази до сужења или зачепљења, разликују се симптоми и клиничке манифестације ИБС код пацијената. Услед изненадног прекида циркулације кроз једну од артерија које хране срце долази до изумирање срчаног мишића и настанка акутног инфаркта миокарда који уједно представља и последњу фазу и само један од облик за развој ИБС. Најважнији симптом је бол који је јако интензиван и локализован иза грудне кости, а често се шири на раме, леву руку или доњу вилицу. Може бити праћен обилним презнојавањем, слабашћу, малаксалошћу и осећајем недостатка ваздуха. Међутим, у појединим случајевима бол као симптом може бити одсутан (нарочито код пацијената са дијабетесом), па у том случају други пратећи симптоми могу указати на инфаркт миокарда (8). Суужење лумена коронарних крвних судова, због кога срчане ћелије нису довољно снабдевене крвљу, узрокују пролазно смањење прокрвљености, такозвану исхемију, која узрокује снажну бол у грудима (9). Болови у грудима који престају након обустављања провоцирајућих узрока који су их изазвали (физички напор, стрес, излагање хладноћи) или након терапије, знак су пролазног смањења прокрвљености или исхемије дела срчаног мишића (болест позната као ангина пекторис) (10).

Етиопатогенеза ИБС још увек није у потпуности разјашњена, али као најзначајнији независни фактори ризика за појаву ИБС издвајају се пушење дувана, повишен крвни притисак, повећани серумски (укупни и ЛДЛ) холестерол, низак ХДЛ холестерол, *diabetes mellitus*, мушкарци старости преко 55 година и жене после менопаузе и старости изнад 65 година (11,12). Гојазност, абдоминална гојазност, изостанак физичке активности, седентарни начин живота, позитивна породична анамнеза за ИБС у ранијем животном добу (<55 код мушкараца; <65 година код жена), етничке карактеристике, психосоцијални фактори се издвајају као најзначајнији

предиспонирајући фактори, док се као условни фактор издвајају: повишени триглицериди, повишена концентрација ЛДЛ-а, повишен ниво хомоцистеина, повишен липопротеин А, повишен фибриноген, повишени инфламаторни маркери (посебна пажња се посвећује Ц-реактивном протеину) (13).

Када је реч о лечењу ИБС, поред превентивних мера према препоруци лекара, важно је и придржавати се прописаних доза и редовне терапије без њеног изненадног прекида. Многобројне стратегије за терапију КВБ су развијане током година како би се умањили ефекти на метаболизам и контрактилност миокарда као и на одрживост миоцита услед акутног инфаркта миокарда (14). Литературни подаци нам пружају увид у различите приступе терапије, али као најчешћи се издваја употреба тромболитичких агенаса, антагониста β -адренергичких рецептора, инхибитора ангиотензин конвертујућег ензима (АСЕ), коришћење антиоксиданаса, и других агенаса. Треба нагласити да понекад због обима и озбиљности болести није довољна само фармаколошка терапија, већ је неопходно извести и одређене инвазивне процедуре (уграђивање стента, уградња бајпаса, пејсмејкера) (14,15). Једна од ретко коришћених интервенција која је универзално прихваћена, а последњих неколико година изазива велику пажњу научног света је свакако феномен прекондиционарања срца исхемијом (16).

1.2. Феномен прекондиционарања миокарда исхемијом

Прекондиционарање као појам представља појаву толеранције односно отпорности организма на стрес који је пре тога био изложен блажој форми истог тог стреса. Конкретније, представља појаву да ткиво након краткотрајне исхемије постаје отпорније на следећи исхемијску ноксу у одређеном времену. *Janoff* је први у употребу увео термин "прекондиционарање" још шездесетих година прошлог века који се односио на стресом изазвану толеранцију на трауме или оштећења ендотоксинима (17). Од тренутка када је као појам уведен, отворена су и многобројна питања на која научници већ деценијама покушавају да пруже адекватне одговоре. Студије спроведене *in vivo* на различитим анималним моделима пацова и свиња указују да величина инфаркта варира у односу на примењену снагу стимулуса који је послужио као прекондиционарање, што нам и показује да прекондиционарање пружа веома

стрму криву доза-одговор (18). Резултати студија које су спроведене на зечевима, људима и свињама указују да краткотрајно прекондиционирање исхемијом у дужини од једног до два минута након чега следи реперфузија не даје значајне ефекте (19).

Од средине прошлог века, велики број студија сведочи о успешности феномена прекондиционирања како на срцу, тако и на мозгу (20-23), а временом је растао и број модела на којима је уочен овај ефекат па се данас испитује и на јетри, бубрезима, удовима (24,25).

Murry је био први који је описао феномен прекондиционирања на миокарду и истакао да кратке епизоде коронарне оклузије за крајњи резултат имају смањивање величине инфаркта. Наиме, он је показао да један или више циклуса кратке исхемије миокарда праћени такође кратким периодима реперфузије доводе до формирања заштитног механизма срца на касније продужене периоде како исхемије тако и реперфузије (26). Много година касније откривено је да постоје два периода заштите миокарда након прекондиционирања. Осим раног прекондиционирања који су открили *Murry* и сарадници, постоји и касно прекондиционирање које се још назива и прекондиционирање "другог прозора" (енгл. *second window*), а настаје 12-24 часова након прекондиционирања и траје 2 до 3 дана. Према литературним подацима 90 секунди представља доњи праг за иницирање заштите миокарда, док су оптимални циклуси од 5 до 10 минута (27). Дужина реперфузионог периода превасходно зависи од методологије и циљева истраживања и није ограничена, али се истиче да је реперфузија у трајању од 60 минута довољна да се процени максимална заштита и испита ефикасност прекондиционирања (27,28).

Када говоримо о механизмима који су одговорни за позитивне ефекте прекондиционирања на срце, морамо напоменути да се најзначајнији део оштећења ткива миокарда не дешава у самом периоду исхемије, већ у периоду реперфузије што се у литератури наводи као реперфузиона повреда. У току периода реперфузије заправо долази до нарушавања функције ткива, смрти миоцита и некрозе (29,30).

Иако тачан механизам који је одговоран за низ бенефита који настају након прекондиционирања срца исхемијом још увек није детаљно испитан, многобројне студије сведоче да значајан удео у томе имају ендogene супстанце попут брадикина, простагландина, азот монооксида (NO), као и аденозина (31-33). Међу првима за које се сматрало да играју битну улогу у механизму прекондиционирања истакали су се већ споменути брадикинин и аденозин. На различитим анималним моделима показано да долази до пораста концентрације брадикинина и то пре пораста концентрације

аденозина што је посебно значајно у механизму мање интензивног прекондиционирања (19,34).

Досадашњи литературни подаци указују да услед исхемије долази до усмеравања метаболизма у правцу анаеробне гликолизе и смањења доступног АТФ-а чиме се инхибира $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -аза и повећава количина калцијума у цитоплазми (35,36). Повећана продукција калцијума у цитоплазми значајна је у И/Р повреда миокарда јер активира калцијум-зависне протеазе које индукују апоптозу (37). Поред тога, услед поновног успостављања протока крви кроз крвне судове долази до реперфузионих повреда које настају као резултат апоптозе и некрозе кардиомиоцита. Такође, велики број студија сведочи о томе да је у основи И/Р повреда повећана продукција слободних радикала који доводе до настанка оксидационог стреса и последичног оштећења ткива (38,39). Наиме, реактивне кисеоничне врсте (*Reactive oxygen species - ROS*) које махом настају током периода реперфузије могу учествовати као посредници за настанак инфаркта миокарда. Кисеоник који доспе до миокарда, а претходно је претрпео исхемију, доводи до формирања слободних радикала, пре свега супероксид анјон радикала, хидроксил радикала и пероксинитрита који управо у првих неколико минута успостављања протока крви доводе до развоја реперфузионе повреде. ROS могу настати и као последица активације и акумулације неутрофила у периоду реперфузије доводећи до ослобађања фактора активације тромбоцита пореклом из ендотела који привлаче неутрофиле и генеришу повећану продукцију ROS као и степен реперфузионе повреде. Оксидациони стрес током реперфузије миокарда смањује биорасположивост интрацелуларних сигналних молекула као што је азот моноксид, поништавајући тиме његово кардиопротективно деловање (29).

Многобројне биохемијске и имунолошке студије такође указују да водећу улогу у самом механизму има протеин киназа С, јер је доказано да њеном инхибицијом долази до супримирања овог ефекта (40). Да би се у потпуности разјаснио механизам потребно је испитати и улогу АТФ-сензитивних K^+ (K_{ATP}) канала јер активацијом протеин киназе С долази до њиховог отварања (40,41).

Узимајући у обзир да исхемијско прекондиционирање најчешће није клинички применљиво, последњих деценија пажња научне јавности усмерена је ка новијим стратегијама прекондиционирања које могу довести до смањења И/Р повреда. У зависности од примењене методе поред исхемијског, разликујемо и фармаколошко и нефармаколошко прекондиционирање (39,42).

1.3. Нефармаколошко прекондиционирање миокарда

Према дефиницији нефармаколошко прекондиционирање миокарда представља маневар који када се примени пре коронарне оклузије, може у одређеном проценту, да умањи величину инфаркта миокарда. У нефармаколошке маневре спадају хипоксија, срчани пејсмејкер, топлотни стрес, матичне ћелије, као и многобројни модели физичке активности (19,43,44). Сваки од наведених нефармаколошких маневра има свој претпостављени механизам преко којег делује, али оно што је карактеристично је да генерално сви они остварују протективне ефекте тако што се супротстављају механизмима који су одговорни за настанак И/Р повреда. Последњих година, све више се испитује и хипербарична оксигенација (ХБО), као једна од новијих стратегија за нефармаколошко прекондиционирање, а досадашњи литературни подаци указују да смањује стопу смртности и сведоче о потенцијалној протективној улози на исхемични миокард (45).

1.3.1. Хипербарична оксигенација у моделу прекондиционирања миокарда

ХБО представља администрацију 100% кисеоника при притиску од 2 до 3 АТМ. У терапеутске сврхе употребљава се са циљем да подигне притисак артеријског кисеоника и повећа удео кисеоника у плазми. На овај начин омогућава ћелијско дисање и одржава синтезу аденозин трифосфата (АТФ-а) у исхемијско/хипоксичном ткиву. Сматра се да су два базична ефекта хипербаричне оксигенације. Један је искључиво механички који настаје као последица повећаног притиска, док је други значајнији и он се манифестује деловањем на физиолошке системе у организму (46). Примарни механизам деловања укључује хипероксигенацију, вазоконстрикцију, ангиогенезу, пролиферацију фибробласта, оксидативну леукоцитну деградацију, инхибицију токсина и сингергизам са антибиотицима. Применом хипербаричне оксигенације повећава се притисак кисеоника 10-13 пута преко његовог физиолошког нивоа у ткивима (уколико је реч о притиску око 2,5 АТМ), на овај начин долази до потпуне сатурације хемоглобина, чак и у венској крви (47).

Значај хипербаричне оксигенације у патофизиологији исхемијске болести срца је вишеструк. Услед исхемије долази до смањења оксидативне фосфорилације уз последични пад производње високо-енергетског фосфата који је неопходан за

одржавање трансмембранског јонског потенцијала. Такође, долази до развоја екцесивне деполаризације, формирања слободних радикала који испољавају штетне ефекте не само на ткиво захваћено исхемијом, већ и на удаљене органе (46). Због тога се хипербарична оксигенација последњих година налази у жижи научних интересовања, а имајући у виду да ретко изазива нежељене ефекте, издваја се као један од пожељнијих кандидата за клиничку примену у прекондиционирању миокарда (48,49).

Wada и коаутори су још 1996. године упоређивали два протокола излагања ХБО. Наиме, први протокол је подразумевао пет излагања ХБО сваког другог дана, док је други протокол подразумевао једно излагање ХБО, након тога изазвана је петоминутна исхемија оклузијом каротидних артерија. Резултати ове студије указале су на повећану толеранцију на исхемијско-неуронска оштећења највероватније путем индукције синтезе HSP-72 (50). 2001. године *Kim* је објавио чланак где је показано да позитивни ефекти који настају након поновљеног излагања ХБО су уско повезани са повећањем активности антиоксидационих ензима и генске експресије каталазе (CAT) (51). Такође, показано је да понављани циклуси ХБО могу да изазову толеранцију на фокалну церебралну исхемију која је изазвана оклузијом средње моздане артерије у трајању од 2 сата. Оно што је битно напоменути је да је ХБО примењена у пет циклуса била делотворнија од ХБО која је примењена у три циклуса (52).

Током година истраживања, међу научницима су се јавила два основна питања. Прво је било да ли је хипероксија или хипербаричност одговорна за настанак толеранције на И/Р повреде, док се друго односило на механизма који је одговоран за позитивне ефекте ХБО. Као један од потенцијалних механизма којим се ублажавају повреде настале након исхемије миокарда је супресија путева апоптозе (блокада активности *caspase-3* и заштите од апоптозе посредоване *Bax/Bcl-2*), инхибиција експресије циклооксигеназе-2 и активација антиоксидационих одбрамбених система као што су супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза (48,53,54). Такође, последњих година многи научници су предложили и бројне молекуле који играју значајну улогу у протективним ефектима ХБО, али потребна су детаљнија и свеобухватнија истраживања која би у потпуности објаснила овај механизам.

1.4. Фармаколошко прекондиционирање миокарда

Фармаколошко прекондиционирање разликује се од нефармаколошког јер, како му и само име каже, омогућава смањење величине инфаркта миокарда помоћу фармаколошких агенаса који се примењују пре коронарне оклузије, било акутно или хронично (55). Међутим, још увек није у потпуности разјашњено да ли различити облици прекондиционирања фармаколошким агенсима деле исте молекуларне механизме са исхемијским прекондиционирањем.

Loubani и *Galiñanes* су 2002. године спровели истраживање у коме су упоређивали механизме фармаколошког и исхемијског прекондиционирања. Они су на хуманом моделу кардиомиоцита испитивали и упоређивали утицај агониста $\alpha 1$ -адреноцептора и рецептора за аденозин и исхемијског прекондиционирања. На основу резултата ове студије може се закључити да фармаколошко прекондиционирање има идентичне ефекте као и исхемијско прекондиционирање, а да у оба случајева активација РКС, р38МАРК (р38 митогеном активирана протеин киназа), као и митохондријалних K^+ -АТР-азних (*mitoK_{ATP}*) канала представља саставни део сигналне трансдукције у кардиопротективним механизмима (56).

С обзиром да је генерални циљ прекондиционирања да се умањи величина инфаркта, данас се на основу доступних литературних података може закључити да се у ту сврху испитују најразличитији фармаколошки агенси. Анестетици попут десфлурана, изофлурана и халотана (57), затим супстанце добијене из грожђа, попут ресвератрола (58), инхибитори протонске пумпе (42), и многи други су у литератури предложени као агенси који се са великим успехом могу користити у циљу фармаколошког прекондиционирања. Поред већ наведених, с обзиром на механизам настанка И/Р повреда, посебна пажња је усмерена ка фармаколошким агенсима који модулирају Ca^{2+} (59,60).

1.4.1. Антагонисти L-типа калцијумских канала у моделу прекондиционирања

Калцијум кроз канале за калцијум улази у глатке мишићне ћелије и ћелије миокарда којима је неопходан за контракцију. Већина канала за калцијум се отвара, односно активира када се мембрана ћелије деполарише и зато се канали називају волтажно-зависни канали. Антагонисти L-типа калцијумских канала (енгл. *Calcium*

Channel Blockers - CCBs) уведени су у клиничку употребу 1960-их година, а за лечење хипертензије одобрени су 1980-их година (61,62). Дуги низ година ова група лекова је главна у терапији многих кардиоваскуларних обољења, попут ангине пекторис, пароксизмалне суправентрикуларне тахиаритмије, хипертрофичне кардиомиопатије, *Raynaud*-овог феномена, пулмоналне хипертензије, дифузног езофагеалног спазма и церебралног вазоспазма (63).

Терапијски значајни антагонисти калцијумских канала делују на L-тип канала који су добили име по томе што кад се једном деполаризују, њихово деловање је дуже (*long lasting*). Када се мембрана деполаризује, L-тип калцијумски канали се морају фосфорилисати да би се отворили (64).

CCBs су хеторегена група лекова, а на основу хемијске структуре, а и места везивања на L-типу калцијумских канала разликују се 3 главне класе: дихидропиридин, фенилалкиламин и бензотиазепини (65,66). Управо разлике у њиховим хемијским структурама пружају разноликост у њиховим деловањима. Међутим сви они селективно инхибирају отварање L-типа калцијумских канала у васкуларним глатким мишићима и миокарду, везивањем за α 1-субјединицу и тиме спречавају даљи инфлукс јона Ca^{2+} у ћелије, чиме се онемогућава ћелијска контракција. Ова инхибиција доводи до релаксације глатких васкуларних мишићних ћелија, вазодилатације и снижења крвног притиска (67,68). L-тип калцијумских канала активира: алфа адренергички систем, ангиотензин II и ендотелин. Блокадом ових канала практично се блокира завршна карика различитих механизма који доводе до вазоспазма (69). CCBs смањује вазоконстрикцију посредовану ангиотензином II и смањује стимулаторни ефекат ангиотензина II на биосинтезу и секрецију алдостерона из надбубрежне жлезде (70). За разлику од других вазодилататора, CCBs изазивају благу натриурезу и не изазивају ретенцију. Према томе, CCBs снижавају крвни притисак углавном тако што смањују периферни васкуларни отпор (71). Занимљиво је то да у многим клиничким студијама постоји контроверзни подаци о узимању CCBs и повећању морталитета од КВБ (72,73).

Иако литература пружа неколико теорија, механизми којима CCBs повећавају морталитет и даље није познат. Међутим, хипотеза да преоптерећење ћелијског калцијума може допринети настанку иреверзибилних исхемијских повреда ћелије уједно је и пружила идеју да се ови лекови примене са циљем заштите миокарда од исхемије (74).

1.4.1.1. 1,4-Дихидропиридински деривати у прекодиционирању миокарда

Први пут су описани 1882. године у раду *Hantzsch*-а и сарадника који су користили дихидропиридине за синтезу супституисаних пиридина. Педесетак година касније, интересовање за ову групу хемијских једињења је порасло због открића да је прстен 1,4- дихидропиридина одговоран за „трансфер водоника“, који обавља коензим NADH. У групу дихидропиридина спадају амлодипин, клевидипин, фелодипин, израдипин, лацидипин, лерканидипин, никардипин, нифедипин, низолдипин и други (схема 1) (66).

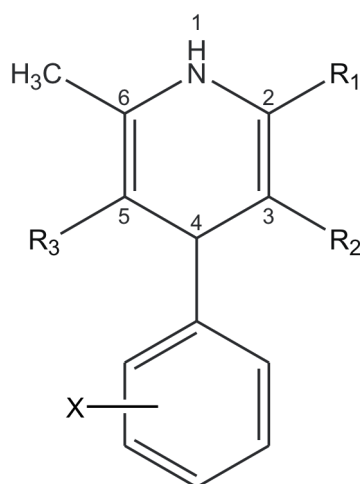


Схема 1. Општа структурна формула 1,4-дихидропиридинских деривата антагониста калцијумских канала

Експериментални подаци указују на то да се ова група антагониста калцијумских канала везује за дихидропиридинско и недихидропиридинско место за везивање. Ова подгрупа CCBs делује тако што селективно инхибира инфлукс јона калцијума преко ћелијске мембране, са већим ефектом на васкуларне глатке мишићне ћелије него на ћелије срчаног мишића (75).

Дихидропиридини имају променљиве ефекте на срчану фреквенцију. Акутно, ови лекови имају тенденцију да индукују рефлексну тахикардију, али студије студије које су се бавиле испитивањем ефеката њихове хроничне примене нису забележили ове резултате (76). Сматра се да су веће дозе ових лекова углавном повезане са порастом срчане фреквенције. Група аутора чак сугерише да уколико се краткоделујући

нифедипин примени у умереним или вишим дозама доводи до повећања морталитета (77), међутим постоје студије чији резултати сведоче супротно (78). Терапија нифедипином код пацијената са слабом колатералном циркулацијом смањује епизоде исхемије, док уколико се примени код пацијената са добром колатералном циркулацијом, долази до повећања исхемијских епизода (77). Према истраживањима *Cain* и сарадника нифедипин и израдипин показују исте ефекте (79). Такође, *in vitro* експерименти на хуманим атријалним трабекулама указују на то да пацијенти који користе ССВс нису функционално заштићени од транзијентне исхемије. Међутим, функционалне разлике након И/Р између атријалне трабекуле која је била изложена ССВс и која није била изложена нису пронађене (80).

Wallbridge је у својој студији на свињама испитивао да ли примена низолдипина може да утиче на кардипротективне ефекте исхемијског прекондиционирања. Резултати ове студије указују да континуирана инфузија низолдипина не смањује потенцијални заштитни механизам исхемијског прекондиционирања, чак донекле показује и синергистички ефекат чиме доприноси кардиопротекцији (78). Наведени резултати су у корелацији са експерименталном студијом која је испитивала ефекте нифедипина на изолованом срцу заморчета. Наиме, они су закључили да нифедипин примењен непосредно пред исхемију доводи до побољшања притиска у левој комори и смањује накопљање калцијума током периода реперфузије. С обзиром на добијене резултате ова група аутора истакла је да се нифедипин може предложити као један од агенаса за прекондиционирање миокарда (81).

1.4.1.1.1. Амлодипин

Најзначајнији представник дихидропиридинских деривата антагониста калцијумских канала је амлодипин (**схема 2**). Иако се већ дуги низ година користи у терапији различитих кардиоваскуларних обољења, у истраживачком свету још увек побуђује значајну пажњу.

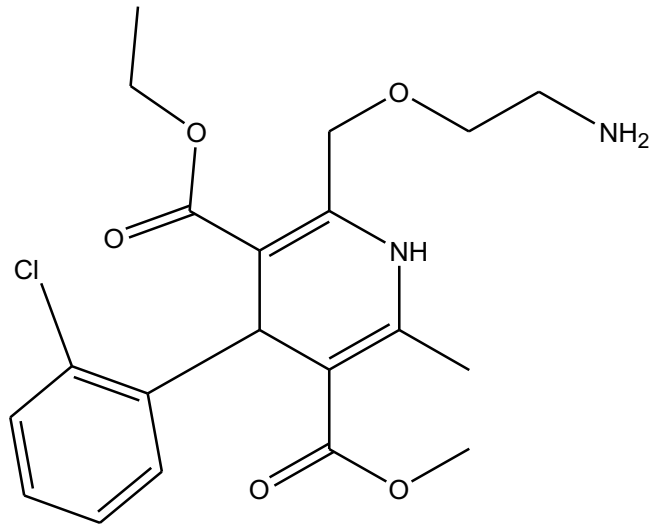


Схема 2. Структурна формула амлодипина

Амлодипин припада другој генерацији 1,4-дихидропиридинских деривата, а на тржишту се налази у облику соли бензенсулфонске киселине, амлодипин-бензилата. Фармакокинетику амлодипина одликује добра и успорена ресорпција након оралне примена, стабилно одржавање концентрације у плазми, при чему се највиша концентрација у крви постиже након 6 до 12 часова. Храна не утиче на ресорпцију амлодипина. Терапијске концентрације у плазми се постижу након 7 до 8 дана узастопног дозирања (82,83). Биорасположивост амлодипина износи око 60-65%. За протеине плазме се везује 97,5% амлодипина, док је време полумелиминације из плазме око 35-50 часова. У јетри се метаболише до неактивних метаболита (60%), који се излучују урином, заједно са око 10% неизмењеног лека. Метаболизам амлодипина је сложен и екстензиван и у сагласности је са оксидацијом дихидропиридина, при чему као главни производа метаболизма настаје пиридински аналог (84,85).

Група аутора из Турске која је проучавала ефекте прекондиционирања амлодипином на различитим анималним моделима, је у својим радовима показала да амлодипин поседује антиинфламацијске, антиостеопоротске, антиоксидационе, као и заштитне ефекте од оштећења која настају након И/Р. У својим радовима су се преваходно базирали на ефекте који се постижу на танким цревима зеца и на оваријуму пацова (86-88). Ови позитивни ефекти амлодипина највероватније се постижу јер се амлодипин супротставља улогама калцијума у инфламационој патогенези, што резултира снажним антиинфламацијским ефектом. Такође, на моделу хипертензивних пацова третираних амлодипином, оштећење можданих ткива је било мање, а овај ефекат највероватније настаје као последица тога што амлодипин повећава

активност супероксида дисмутазе (SOD) (89). У прилог овим резултатима је и студија *Kyselovic* и сарадника. Они су показали да код пацова који су третирани амлодипином долази до смањења оштећења срца након оклузије коронарне артерије (90).

1.4.1.2. Фенилалкиламински деривати у прекондиционарању миокарда

Фенилалкиламински деривати антагониста калцијумских канала су релативно селективни на миокард, смањују потребу миокарда за кисеоником и често се користе за лечење ангине. У оквиру ове групе се убрајају верапамил, галопамил, тиапамил и други (схема 3). Лекови из ове групе делују тако што инхибирају алфа и бета подјединице волтаж-зависних калцијумских канала. Конкретно, њихов ефекат на L-тип калцијумских канала у срцу изазива смањење инотропног и хронотропног ефекта, али утиче и на смањење срчане фреквенце и крвног притиска (67,91).

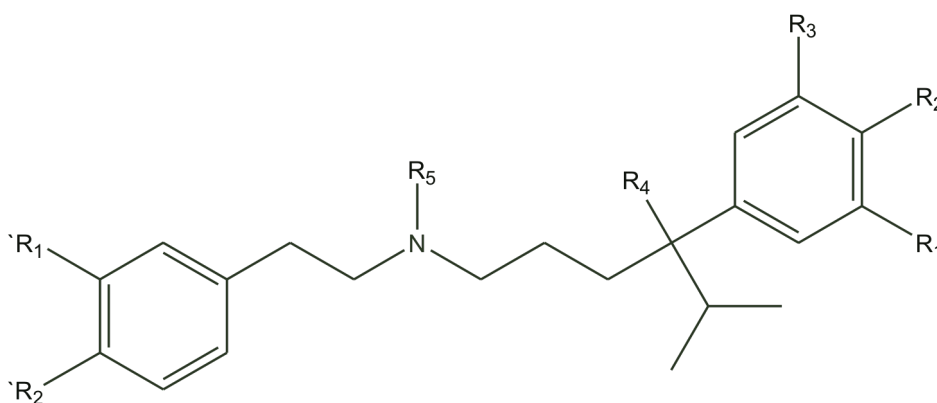


Схема 3. Општа структурна формула фенилалкиламинских деривата антагониста калцијумских канала

1.4.1.2.1. Верапамил

Најчешће коришћени лек из ове групе је верапамил (схема 4) (91).

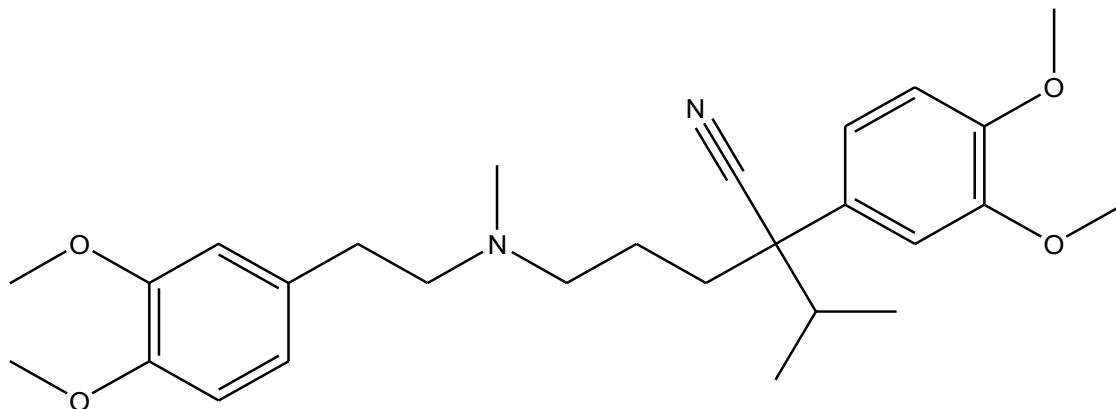


Схема 4. Структурна формула верапамила

Верапамил је антагонист калцијумских канала који спречава трансмембрански инфлукс калцијума у ћелије проводног система срца (СА- и АВ-чвора), радне мускулатуре срца и глатких мишића коронарних и периферних крвних судова. Последица овога је негативно хронотропно и дромотропно дејство, чиме се постиже антиаритмијски ефекат, затим негативно инотропно дејство и смањење васкуларног отпора у коронарном крвотоку, чиме се постиже антиангинозни ефекат и смањење укупног периферног отпора због системске вазодилатације, чиме се постиже антихипертензивни ефекат (91). Уколико се примени у облику таблете, апсорбује се преко 90% од унете дозе. Биолошка искористљивост је мала (10-20% унете дозе) због ефекта првог пролаза кроз јетру. Максимална концентрација лека у плазми се постиже након 1 до 2 сата од примењене дозе. Полувреме елиминације 1,8 - 5,3 часова, али се може и удвостручити током дуготрајне примене лека (63,67). Елиминација верапамила из организма одвија се углавном путем урина (70%), али и преко столице (15%). Након интравенске примене, максимална концентрација лека у крви се постиже брзо, зависно од брзине ињекције или инфузије. Дејство почиње већ после 0,5 -1 минута, а максимум се постиже након 10 до 15 минута. Верапамил је индикуван за лечење ангине пекторис (хронична, стабилна и вазоспастична), суправентрикуларне аритмије (атријални флатер, атријална фибрилација, пароксизмална вентрикуларна тахикардија), хипертрофична кардиомиопатија, артеријска хипертензија (91).

Miyawaki и његови сарадници су још 1996. године указали да комбинована примена два маневра прекондиционирања доводи до бољег одговора срца. Наиме, они су на моделу изолованог срца пацова на *Langendorff*-у испитивали ефекте исхемијског прекондиционирања и прекондиционирања верапамилом. Њихови резултати наводе на закључак да се најбољи одговор на И/Р повреде остварује уколико се срце током исхемијског прекондиционирања изложи и прекондиционирању верапамилом у дози од 0,63 $\mu\text{mol/L}$ (59). Такође, у још једној студији истих аутора показано је да је концентрација АТР-а знатно виша, као и да је ћелијска структура боље очувана код срца која су била прекондиционирана Ca^{2+} него код контролних срца која су само била изложена исхемији. У групама у којима је прилив Ca^{2+} током прекондиционирања Ca^{2+} био инхибиран ниским дозама верапамила (0,2 и 0,5 $\mu\text{mol/L}$), такође је забележена кардиопротекција. Са друге стране код срца која су третирана са 2 $\mu\text{mol/L}$ верапамила, отпуштање лактат дехидрогеназе је значајно повећано, концентрација АТР-а смањена, митохондрије су биле делимично оштећене, а миофибрили делимично трансформисани (92). Са друге стране, *Yu* и његов тим су показали да када се верапамил примени 10 минута у дози од 20 $\mu\text{mol/L}$, доведе до значајног побољшања дијастолне и систолне функције и смањи инциденцу аритмија које настају у периоду реперфузије. Ова група аутора сматра да је један од могућих механизма за овај ефекат смањење прилива Ca^{2+} чиме се стабилизују кардиомиоцити током исхемије и избегава накупљање Ca^{2+} који се ослобађа током И/Р (93).

Верапамил се последњих неколико деценија често користио као фармаколошки агенс за прекондиционирање. Међутим, добијени резултати су често контроверзни, зато су неопходна даља испитивања која би донела прецизније закључке.

1.4.1.3. Бензотиазепински деривати у прекондиционирању миокарда

Бензотиазепински деривати делују подједнако и на срце и на крвне судове, а као главни представник ове групе издваја се дилтиазем. Делује тако што инхибира улазак калцијумових јона током деполаризације мембране срчаног мишића, спроводног апарата срца и глатке мускулатуре крвних судова, смањује снагу срчане контракције, периферни васкуларни отпор и потребу срца за кисеоником, а са друге стране повећава повећава дилатацију коронарних крвних судова, како епикардних тако и субендокардних. Дилатацијом крвних судова смањује периферни васкуларни отпор,

чиме се смањује дијастолни и систолни крвни притисак. Дилтиазем је ефикасан у лечењу ангине, а може да се формулише тако да има дуже дејство и у том случају се примењује за лечење хипертензије. У мањем степену изазива негативно инотропно дејство од верапамила, али се свакако не препоручује комбинована терапија са бета антагонистима (94).

Добро се ресорбује, са израженим ефектом првог проласка кроз јетру, па је биолошка расположивост око 40%. Метаболише се у јетри до фармаколошки активних метаболита, док се свега око 2-4% дилтиазема излучује се путем бубрега као непромењен лек, а остало у облику метаболита. Ефекат дилтиазема је најизраженији након 4 сата од примене, а његово дејство траје 10 до 12 часова. Примењује се у лечењу артеријске хипертензије, профилаксе ангинозног бола код ангине пекторис (61,63).

Okuda и његове колеге су у свом истраживању које је спроведено на псима истаки да прекондиционирање дилтиаземом у дози од 10 mg/kg доводи до смањења површине коронарне артерије која је захваћена инфарктом (95). Такође, у студији која се бавила акутним ефектима дилтиазема на изоловано срце пацова на *Langendorff*-овом апарату, који је примењен непосредно пред или током глобалне исхемије, показано је да овај агенс смањује катаболизам аденинских нуклеотида, смањио је потребу миокарда за кисеоником и на тај начин побољшао функцију срца (96).

С обзиром да је према свом деловању дилтиазем у средини, између верапамила као представника фенилалкиламина и амлодипина, као представника дихидропиридина, није био од значајног интереса за испитивање у овој студији.

1.4.2. Лекови који отварају калијум-АТР сензитивне канале

Прва синтетисана супстанца из групе која се заједничким именом назива активатори К-АТР сензитивних канала (*АТР-sensitive potassium channel opener*) била је кромакалим, а његов механизам дејства први пут је описан 1986. године (97,98). Овој групи лекова, поред новосинтетисаних супстанци прикључени су и неки већ познати вазодилататори попут диазооксида и миноксидила, а према хемијском саставу све лекове из ове групе можемо поделити на следеће подгрупе: бензопирани (левкромакалин, бимакалим), бензотиадиазини (диазоксид), цианогванидини (пинацидил), циклобутениди (миноксидил), терцијални карбонали (ZD-6169), тиоформамиди (априкалим), никотианамиди (никорандил) и супстанце сличне дихидропиридинима (ZM-244085). Од свих споменути, у клиничкој пракси су у употреби једино никорандил, диазоксид и миноксидил (99).

Иако се према хемијском саставу лекови из ове групе значајно разликују, сви поседују заједнички механизам дејства. Доводе до отварања канала за K^+ , након чега долази до ефлука јона K^+ и хиперполаризације мембране након чега се затварају волтажност-зависни Ca^{2+} канали чиме се инхибира инфлукс екстрацелуларног Ca^{2+} и инхибира ослобађање Ca^{2+} из интрацелуларног депоа. На овај начин, као крајњи ефекат се постиже инхибиција контракције васкуларних глатких мишића и кардиомиоцита (100,101). Поред директног деловања на срчани мишић, активатори К-АТР сензитивних канала доводе до и до вазодилатације, па не чуди ни чињеница да су за кратко време заузели значајно место у терапији кардиоваскуларних обољења. Индиковани су у лечењу срчне инсуфицијенције, стабилне ангине пекторис, хипертензије и аритмија (102).

С обзиром да литературни подаци сведоче о томе да су *mitoK_{АТР}* канали одговорни за заштиту кардиомиоцита у феномену прекондиционарања (35) као и да директним деловањем на срце ограничавају поље исхемије миокарда (100), последњих неколико деценија лекови из ове групе се испитују као фармаколошки агенси у прекондиционарању миокарда.

1.4.2.1. Никорандил

Никорандил отвара канале за калијум, доводећи до дилатације артерија и вена, што није случај са свим лековима из групе активатора К-АТР канала. Зато се за никорандил каже да показује дуална својства то јест да делује и као нитрат и као активатор К-АТР канала (**схема 5**). Индикован је за превенцију и лечење напада ангине пекторис и углавном се примењује самостално, али се може прописати пацијентима који већ примају максималну терапију и тада показује додатан користан ефекат. Због опасности од хипотензије и смањења прилива крви у срце, никорандил дозира са опрезом (103).

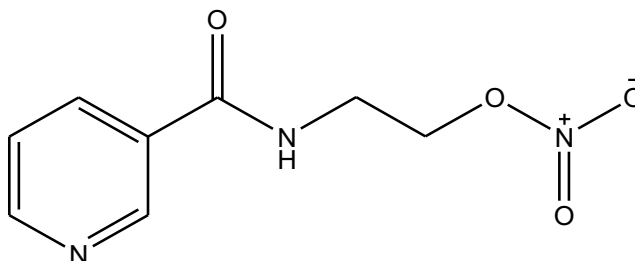


Схема 5. Структурна формула никорандила

Holmuhamedov и његови сарадници су показали да никорандил побољшава контрактилност исхемичне зоне, редукује величину инфаркта и смањује ослобађање лактат-дехидрогеназе (104). Резултати многих клиничких студија сведоче о томе да интавенски примењен никорандил код пацијената са акутним инфарктом миокарда смањује инциденце малигних вентрикуларних аритмија (105,106). Такође, у клиничкој студији из 2002. године показано је пацијенти који су лечени никорандилом имају смањен релативни ризик од коронарних догађаја (103).

Због великог броја обећавајућих резултата, никорандил често има запажену улогу у студијама које се баве испитивањима прекондиционирања фармаколошким агенсима.

1.5. Оксидациони стрес и кардиоваскуларне болести

У респираторном ланцу митохондрија, преко 90% укупног кисеоника се редукује до воде. Парцијална редукција кисеоника кроз процесе ћелијског дисања, пре свега оксидационе фосфорилације, којом се обезбеђује енергија, главни је извор настанка реактивних кисеоничних врста (енгл. *Reactive oxygen species*, ROS). ROS постоје и у физиолошким условима, али у врло малој количини. Њихова основна улога је да регулишу сигналне путеве унутар ћелије који се најчешће активирају стимулацијом ћелијских рецептора. У самом организму постоје и бројни антиоксидациони механизми (енгл. *Antioxidative defense system*, ADS) чија је улога да неутралише слободне радикале, спречи њихово накупљање, као и да обнови настала оксидациона оштећења. Захваљујући овим одбрамбеним механизмима, одржава се хомеостаза ћелија, а оксидациони стрес настаје када дође до нарушавања баланса између прооксидационих и антиоксидационих молекула (107).

Улога оксидационог стреса у патогенези многих обољења предмет је истраживања већ вековима уназад, а судећи према резултатима бројних студија, оксидациони стрес је један од значајнијих фактора за развој КВБ (108).

Када говоримо о кардиоваскуларним обољењима, морамо напоменути да се ROS стварају пре свега у ендотелним ћелијама, ћелијама глатких мишића и кардиомиоцитима (109). Оксидациони стрес се сматра доминантним покретачем атеросклерозе која може бити узрок али и последица патофизиолошких збивања у многим обољењима. Поред генетских, предиспонирајућих фактори за настанак атеросклерозе су хиперлипидемија, дијабетес и хипертензије, а у свим овим поремећајима показано је и повећано стварање ROS (110). Услед настанак атеросклеротских плакова које чине мононуклеари, пролиферисани глатки мишићи и компоненте екстрацелуларног материјала, долази до задебљања и очвршћивања крвних судова. ROS код атеросклерозе индукују експресију ензима протеин киназа, пре свега фокалну адхезивну киназу и интрацелуларни адхезивни молекул (енгл. *intracellular adhesive molecule 1*, ICAM-1). Везивање оксидованог липопротеина ниске густине (енгл. *oxidized low density lipoproteins*, oxLDL) за свој рецептор на моноцитима, макрофагама и глатким мишићима, доводи до активације моноцита и макрофага, као и стимулације експресије ензима митохондријалне супероксид дисмутазе (SOD). Услед повећане активности SOD, долази до повећане концентрације водоник пероксида (H₂O₂), што уједно условљава и промену редокс стања у околини (111-112).

Многе студије сведоче о томе да руптура атеросклеротског плака настаје услед апоптозе ендотелних ћелија у фиброзној капи атеросклеротске лезије, што је повезано и са активацијом oxLDL. У самом процесу атеросклерозе, значајна је и улога цитокина попут фактора некрозе тумора алфа, интерлеукина 1 β и интерферона γ , као и ангиотензина II који индукују стварање супероксид анјон радикала (O_2^-) у ендотелним ћелијама. Стварање O_2^- је посредовано никотинамид аденин динуклеотид фосфатом, за кога се сматра да је најзначајнији извор ROS у миоцитима (113).

Учешће ROS у појединим обољењима је неминовно, и они најчешће представљају део комплексног патофизиолошког механизма оштећења. Нарушавање оксидо-редукционог миљеа, кроз повећање липидне пероксидације, промену активности директних или индиректних антиоксидационих ензима, као и смањеног садржаја редукованог глутатиона (GSH) у ткивима током пресимптомских фаза болести, може бити добра смерница и показатељ измењених метаболичких и функционалних збивања у организму. Због тога је на одређивање параметара оксидационог стреса у нашем истраживању дата посебна пажња.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Основни циљ

Основни циљ овог истраживања био је да испита ефекте комбинованог прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и фармаколошким агенсима (верапамил, амлодипин или никорандил) на моделу исхемијско/реперфузионе повреде изолованог срца пацова.

2.2. Општи циљеви

Сходно основном циљу, поставили смо и следеће експерименталне задатке:

1. Евалуација ефеката акутне администрације различитих лекова из групе антагониста калцијумских канала и никорандила као фармаколошких агенаса у моделу прекондиционирања на функцију и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
2. Евалуација ефеката хипербаричне оксигенације у моделу прекондиционирања на функционисање миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
3. Испитивање ефеката комбиноване примене фармаколошког и прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
4. Компарација ефеката акутне администрације антагониста калцијумских канала и никорандила као фармаколошких агенаса у моделу прекондиционирања и прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом, као и њихове комбиноване примене на миокард и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
5. Испитивање учешћа различитих биомаркера оксидационог оштећења: супероксид анјон радикала (O_2^-), нитрита (NO_2^-), индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију при примени модела фармаколошког, прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и њихове комбиноване примене.
6. Одређивање вредности антиоксидационих ензима и слободних радикала из крви животиња које су претходно биле изложене хипербаричној оксигенацији и

упоређивање вредности ових параметара са животињама које нису биле изложене *in vivo* прекондиционрању.

7. Стандардним хистолошким методама утврдити и упоредити акутна оштећења миокарда настала након различитих манерава прекондиционирања и исхемије.

2.3. Хипотезе истраживања

1. Прекондиционирање хипербаричном оксигенацијом и прекондиционирање антагонистима калцијумских канала односно никорандилом има протективни утицај на промене редокс статуса, функционалне и морфолошке карактеристике срца пацова.
2. Комбинована примена прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и испитиваним фармаколошким агенсима има бенефите у погледу редокс статуса, функционалних и морфолошких карактеристика изолованог срца пацова у односу на самостално примењене споменуте маневре прекондиционирања.
3. Вредности антиоксидационих ензима код животиња које су претходно биле изложене прекондиционирању хипербаричном оксигенацијом ће се статистички значајно разликовати у односу на вредности ових параметара код животиња које нису биле изложене хипербаричној оксигенацији; такође, вредности слободних радикала биће значајно различите у групи животиња које су биле прекондициониране у односу на групу која није била изложена прекондиционирању хипербаричној оксигенацији.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ова експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vivo* и *ex vivo*. спроведена је у Лабораторији за кардиоваскуларна истраживања Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. При експерименталном раду су поштоване одредбе прописаних аката (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes* 86/609/ЕЕС) и принципа етичности. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

3.1. Експерименталне животиње

Истраживање је спроведено на 112 пацова *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 8 недеља, телесне масе 200 ± 50 g. Пацови су током трајања експеримента одгајани у виваријуму Лабораторије за кардиоваскуларна истраживања, Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Универзитета у Крагујевцу у стандардним лабораторијским условима (температура ваздуха $23 \pm 1^\circ\text{C}$, релативна влажност ваздуха 50%, 12:12 часова циклус светлост:тама, (са почетком светлог периода у 9:00 часова) и са слободним приступом води и храни (*ad libitum*).

Све животиње су у зависности од тога да ли су биле изложене прекондиционарању хипербаричном оксигенацијом биле подељене у две експерименталне групе, а потом и на одговарајуће подгрупе у зависности од акутно перфундованог фармаколошког агенса.

Прва група (n=48) је обухватила контролну групу животиња и животиње које су биле подвргнуте само фармаколошком маневру прекондиционарања. У зависности од примењеног фармаколошког разликујемо:

- Контролну подгрупу (n=12) – срца пацова којима је акутно изазвана И/Р према одговарајућем протоколу;
- Подгрупа верапамил (n=12) – прекондиционарање верапамилом 5 минута у дози од $0,63 \mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, И/Р према одговарајућем протоколу (59);

- Подгрупу амлодипин (n=12) – прекондиционирање амлодипином 5 минута у дози од 0,1 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, И/Р према одговарајућем протоколу (59);
- Подгрупа никорандил (n=12) – прекондиционирање никорандилом 5 минута у дози од 200 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, И/Р према одговарајућем протоколу (114).

Друга група (n=48) је обухватила животиње које су 60 минута дневно, током две недеље биле изложене прекондиционирању хипербаричном оксигенацијом. Након двонедељног прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом, све животиње из ове групе су биле жртвоване и по истом принципу као и у претходној групи, подељене на одговарајуће подгрупе:

- Подгрупа ХБО – након периода стабилизације, И/Р према одговарајућем протоколу (115);
- Подгрупа ХБО + верапамил – прекондиционирање верапамилом 5 минута у дози од 0,63 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, И/Р према одговарајућем протоколу (59);
- Подгрупа ХБО + амлодипин – прекондиционирање амлодипином 5 минута у дози од 0,1 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, И/Р према одговарајућем протоколу (59);
- Подгрупа ХБО + никорандил – прекондиционирање никорандилом 5 минута у дози од 200 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, И/Р према одговарајућем протоколу (114).

3.2. Прекондиционирање хипербаричном оксигенацијом

Прекондиционирање хипербаричном оксигенацијом представљао је први део истраживања (*in vivo*) и обухватао је половину (n=48) од укупног броја пацова који су били укључени у ово истраживање.

Хипербарична оксигенација пацова се спроводила у посебно конструисаној хипербаричној комори за пацове (НУВ-С 300) (слика 1). Животиње су се једном дневно, током 14 дана, излагале 100% кисеонику у трајању од 60 минута при притиску

од 2 АТМ. Како би се избегли ефекти варијација диурналног ритма, хипербарична оксигенација је увек почињала у исто време (115). Након завршетка овог двонедељног протокола уследио је други део истраживања.



Слика 1. Хипербарична комора за мале животиње

3.3. *Langendorff*-ов модел ретроградне перфузије изолованог срца

Други део истраживања (*ex vivo*) је обухватио све животиње укључене у студију. Да бисмо испитали функцију срца и коронарну циркулацију, користили смо методу ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimentria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O који је применљив на изолованом срцу сисара (пацов, пас, мачка, зец, заморче).

Овај апарат се састоји од: две вертикалне стаклене цеви, при чему се мања налази у већој. Између ове две цеви циркулише загрејана вода (37 °C) из воденог купатила, при чему загрева читав систем. Методом негативног притиска се у мању цев улива *Krebs-Henseleit*-ов раствор, који има сличне особине као екстрацелуларна течност. На самом крају цеви мањег калибра се налази канила, на коју се поставља изоловано срце; резервоара у коме се налази *Krebs-Henseleit*-ов раствор, који је са једне стране повезан са унутрашњом цеву мањег калибра, а са друге стране са боцом у којој се налази смеша гасова O₂ : CO₂; Боца са смешом гасова у односу O₂ : CO₂ = 95% : 5%, чији је задатак да постигне физиолошки парцијални притисак кисеоника и угљен диоксида какав је у артеријској крви и да негативним притиском, који ствара у

резервоару, убацује раствор у унутрашњу цев система; канила на коју се причвршћава изоловано срце за апарат и омогућава његово повезивање преко асцендентне аорте за цев мањег калибра и проток *Krebs-Henseleit* раствора кроз изоловано срце пацова; инфузиона пумпа којом се жељени агенс адекватном брзином (у зависности од базалног коронарног протока) перфундује непосредно на споју каниле и асцендентне аорте; рачунар који поседује одговарајући софтвер (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) за континуирано праћење кардиодинамских параметара срчаног рада, који захваљујући сензору добија податке о раду срца, а потом софтвер те податке посредством математичких формула преводи у излазне податке и на самом крају сензор односно трансдјусер који се посебним техникама уводи у изоловано срце и који континуирано региструје функције миокарда - леве коморе (промена систолног и дијастолног притиска, срчане фреквенце). Овај сензор је физички повезан са лучно савијеном, танком металном цеви која се завршава балончићем (пречника 5mm, латекс/ најлон фолија) испуњеним дестилованом водом. Након прокидања митралне валвуле између леве преткоморе и коморе балончић се уводи у леву преткомору и омогућава сензору директно регистровање притисака и срчане фреквенце из ове шупљине срца. На овај начин се региструју следећи параметри функције леве коморе: $dp/dt \max$ – максимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, $dp/dt \min$ – минимална стопа промене притиска у левој комори изражава се у mmHg/s, SLVP – систолни притисак у левој комори изражава се у mmHg, DLVP – дијастолни притисак у левој комори изражава се у mmHg и HR – фреквенца рада срца изражава се као број откуцаја по минути (енгл. *beat per minute*, bpm).

С обзиром да је морфолошки и функционално лева комора доминантнија, праћењем ових параметара се може објективно и прецизно испитати функција срца у целости, што је и био циљ овог истраживања.

3.3.1. Припрема *Krebs-Hensenleit*-овог раствора за перфундовање

Krebs-Hensenleit-ов перфузиони раствор је по свом саставу у многоме сличан екстрацелуларној течности, што му омогућава обезбеђивање одговарајуће исхране и несметан рад на апарату. У овом раствору се налазе следеће супстанце: натријум хлорид (NaCl – 118 mmol/L), калијум хлорид (KCl – 4,7 mmol/L), магнезијум сулфата ($MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1,66 mmol/L), калијум дихидроген фосфат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$ – 1,18

mmol/L), натријум бикарбонат (NaHCO_3 – 24,88 mmol/L), глукоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ – 5,5 mmol/L) и калцијум хлорид (CaCl_2 – 2,52 mmol/L). pH вредност добро припремљеног раствора износи 7,4.

3.3.2. Поступак изоловања и припреме срца

Животиње се жртвују цервикалном дислокацијом (*Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK*) након краткотрајне наркозе изазване интраперитонеалном применом комбинације кетамина и ксилазида. Након тога, животињи се отвара абдомена, дијафрагма сече лучно, с лева на десно, а потом се отвара грудни кош, бочно, дуж мамиларне линије, затим је пресечен перикард чиме је омогућено изоловање срца. Да би се срце одржало у релативној хомеостази током ових процедура, срце је преливано охлађеним ($+4^\circ\text{C}$) физиолошким раствором. Након пресецања перикарда, крвни судови на бази срца се ресецирају, орган се вади из грудног коша и одмах се ставља у ледени физиолошки раствор, чиме се импровизују тзв. „физиолошка клешта“ при чему се метаболички процеси у миокарду своде на минимум. Затим се спроводи тупа препарација базе срца и отклањају се сви делови који нису потребни тако да асцедентна аорта остане очувана, да би се потом концем причврстио за канилу и да би се отпочео експеримент. Да би добијени резултати били што поузданији, односно да би се одржала виталност препарата, читава описана хируршка процедура треба да се сведе на 2 до 3 минута. Потом се у пределу леве аурикуле пресеца лева преткомора и омогућава се приступ митрално валвули. Пинцетом се разарају митрални залистци, при чему се притисак у левој преткомори своди на нулу и тиме искључује утицај независне од функције леве коморе на коронарну циркулацију. Осим тога прокидањем митралне валвуле је обезбеђено је и директно постављање сензора у леву комору као што је претходно и описано и омогућава се праћење функција срчаног мишића ($dp/dt \text{ max}$, $dp/dt \text{ min}$, SLVP, DLVP, HR). Параметри функције леве коморе се прате и снимају помоћу рачунара, што је омогућено захваљујући повезаности између сензора и софтверске јединице. Поред поменутих параметара флуорометријском методом је праћен и проток *Krebs Henseleit*-овог раствора кроз коронарне крвне судове. Означаво се као коронарни проток (енгл. *Coronary flow*, CF), а изражавао се у ml/min.

3.3.3. Протокол на *Langendorff*-овом апарату

Након успостављања стабилног срчаног рада који је подразумевао да се коронарни проток након најмање 3 серије мерења као и сви праћени параметри срчане функције не мењају значајно, за шта је било потребно око пола сата, створени су услови за испитивање функције изолованог срца и отпочињања са протоколом.

На самом крају периода стабилизације (који ће се у даљем тексту означавати са С), забележени су сви испитивани параметри и узет је коронарни венски ефлуент. Након тога је у зависности од тога којој подгрупи припадају, преко инфузионе пумпе у срце перфундован верапамил 5 минута у дози од 0,63 $\mu\text{mol/l}$ (подгрупама верапамил и ХБО + верапамил), амлодипин 5 минута у дози од 0,1 $\mu\text{mol/l}$ (подгрупама амлодипин и ХБО + амлодипин) (59), никорандил 5 минута у дози од 200 $\mu\text{mol/l}$ (подгрупама никорандил и ХБО + никорандил) (114) или срца нису била изложена фармаколошком прекондиционирању (подгрупе контрола и ХБО).

Након 5-минутног фармаколошког прекондиционирања или у случају контролних група (контрола и ХБО) 5 минута након стабилизације уследио је период глобалне исхемије у трајању од 20 минута. Непосредно пред исхемију, узет је коронарни венски ефлуент и забележени су сви праћени кардиодинамски параметри (овај тренутак је обележен као П).

Глобална исхемија се постиже потпуним затварањем протока на *Langendorff*-овом апарату тако да до срца не стиже *Krebs Henseleit*-ов раствор и да срце буде у потпуној хипоксији. Након истека 20 минута, поново се отвара проток и наступа период реперфузије у трајању од 30 минута. Коронарни венски ефлуент и сви мерени кардиодинамски параметри су прикупљани и бележени у следећим тачкама од интереса: тачки стабилизације (С), на самом крају фармаколошког прекондиционирања, односно у случају контролних подгрупа, 5 минута након исхемије, а потом и у првом (1), петом (5), десетом (10), петнаестом (15), двадесетом (20), двадесетпетом (25) и тридесетом (30) минути реперфузије.

3.3.4. Лекови који су коришћени у истраживању

За испитивање ефеката фармаколошког прекондиционирања, самостално или у комбинацији са ХБО коришћени су антагонисти L-типа кацијумских канала верапамил (*Verapamil*) чија моларна маса износи 491,06 g/mol и амлодипин (*Amlodipine*) чија

моларна маса износи 408,879 g/mol, као и активатор калијумских канала никорандил (*Nicorandil*), чија моларна маса износи 211,175 g/mol. Сви фармаколошки агенси су комерцијални препарати чији је произвођач *Sigma–Aldrich Chemie GmbH*, (Немачка).

3.4. Биохемијске анализе

У тренутку жртвовања, животињама се узимала крв из које су се центрифугирањем одвјала плазма и еритроцити из којих су мерени антиоксидациони ензими и слободни радикали у циљу испитивања потенцијалних разлика између групе која је прекондиционирана хипербаричном оксигенацијом и групе која није подвргнута овом маневру прекондиционирања. Након центрифугирања, из плазме би се одређивале вредности про-оксидационих параметара: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2); док би се из еритроцита одређивале вредности параметара антиоксидационог система заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GSH) (116).

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, за сваку тачку од интереса, спектрофотометријским методама су се одређивали биомаркери оксидационог стреса исти као и у плазми: TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2 .

Све поменуте методе урађене су спектрофотометријском методом на апарату марке *Specord S-600 Analytik Jena*, Велика Британија.

3.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Индекс липидне пероксидације у овом истраживању одређиван је индиректно преко продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином. Скраћеница TBARS (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) потиче одатле. У коронарном венском ефлуенту ниво TBARS-а је одређиван методом која се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА) (117).

За одређивање концентрације TBARS-a, неопходно је: 2-тиобарбитурна киселина (TBA, C₄H₄N₂O₂S), M_r=144,15; натријум хидроксид (NaOH) M_r=40,00.

У епрувете је пипетирано 800 µl коронарног венског ефлуента и 200 µl 1% TBA у 0,05 M натријум хидроксиду. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је еквивалентна количина *Krebs-Hensenleitov*-ог раствора. Након пипетирања, узорци су инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100°C.Њ, а потом извађени из воденог купатила и остављени на собној температури. Након прилагођавања температури отпочело се са детерминисањем концентрације TBARS у коронарном венском ефлуенту.

За одређивање концентрације TBARS-a у плазми протокол је сличан. Екстракт се добија комбиновањем 400 µl 28% трихлорсирћетне киселине (TCA) и 800 µl плазме, затим се 15 минута оставља на лед, након чега се 15 минута врши центрифугирање на 6000 rpm. У 800 µl супернатанта додаје се 200 µl 1% тиобарбитурне киселине, а потом се добијени узорци кувају 15 минута на 100°C. Након наведене инкубације узорци се прилагођавају собној температури. Поступак за слепу пробу је исти, само се уместо плазме користи дестилована вода. Мери се на спектрофотометру при таласној дужини од 530 nm.

Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS/ml ефлуента или плазме} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1.56 \times 1.25$$

при чему је A_u апсорбанца узорка, док је A_{sp} апсорбанца слепе пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактор за овај есеј.

Након тога, количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol TBARS/минуто/g wt} = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times CF / m_{\text{срца}}$$

Важно је напоменути да се, за разлику од свих осталих биохемијских параметара, ниво TBARS изражава у µM, док је количина осталих молекула изражавана у nM. Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара.

3.4.2. Одређивање нитрита (NO₂⁻)

С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником: $\text{NO} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$ ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља количину ослобођеног NO-а. Па нам метода за одређивања количине ослобођених нитрита представља довољно поуздану методу за процену функционалности ендотелног L-аргинин:NO система у коронарној циркулацији (118).

Реагенаси који су нам били потребни за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита су: Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина, C₆H₇NO₃S), M_r=173,19; N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA, C₁₂H₁₅C₁₂N), M_r=259,18; амонијум хлорид (NH₄Cl), M_r=53,49; Боракс (Na₂B₄O₇×10H₂O), M_r=381,4; 85% орто-фосфорна киселина (H₃PO₄), ρ=1,685 gcm⁻³; натријум нитрит (NaNO₂), M_r=69,00.

Биохемијски се ова метода заснива на употреби *Griess*-овог реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. *Griess*-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (може се чувати на собној температури) и 0,1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4 °C, због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете (12 x 100) је пипетирано 1 ml коронарног венског ефлуента, 250 μl свеже направљеног *Griess*-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера (pH=9.0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH₄Cl) и натријум тетраборат (Na₂B₄O₇). Амонијачни пуфер, који се у току припеме мора загревати, због изузетно слабе растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml *Krebs-Hensenleitov*-ог раствора.

Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорака, који су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Добијана је пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO₂ у 1 ml *Krebs-Hensenleitov*-ог раствора и то: 3, 6, 12, 24 μl, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2,18, 4,37, 8.73 и 17,34 nmol NO₂/ml. Након стабилизације боје на собној температури 5-10 минута

приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=550$ nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

Одређивања стандардног фактора (F), који се добијао из следеће једначине:

$$\frac{\text{Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}}$$

за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml ефлуента} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

Након тога, количина ослобођених нитрита по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol NO}_2/\text{минут/g wt} = \Delta E/F \times CF \text{ (коронарни проток)/m}_{\text{срца}}$$

3.4.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (енгл. *Nitro Blue Tetrazolium*, NBT) до нитроформаза плавог (119).

Реагенаси који су нам били потребни за детерминацију супероксид анјон радикала (O_2^-) су TRIS (Трис (хидроксиметил) аминотетан, $C_4H_{11}NO_3$), $M_r=121,14$; 37% хлороводонична киселина (HCl), $\rho=1,19$ gcm⁻³, $M_r=36,5$; Na₂EDTA, $M_r=372,24$; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, $C_{40}H_{30}ClN_{10}O_6$), $M_r=817,6$; Желатин ($C_{15}H_{11}N_2NaO_2$), $M_r=61,5$ kDa.

Мерење се спроводило на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}}=550$ nm. Есејна смеша (“*assay mixture*”) представља смешу 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8,6), 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12x100) је пипетирано 50 μ l коронарног венског ефлуента и 950 μ l есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо коронарног венског

ефлуента коришћена је адекватна количина *Krebs-Hensenleitov*-ог раствора. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E_1 . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближн о исте екстинкције. Последња екстинкција се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу следећих једначина

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol } O_2^-/\text{ml ефлуента} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05$$

Након тога, количина ослобођеног O_2^- по граму срчаног ткива се одређивала према следећој једначини:

$$\text{nmol } O_2^-/\text{минут/g} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \times CF/m_{\text{срца}}$$

3.4.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Детерминација водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (енгл. *HorserradishPerOxidase* - HRPO). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ (120).

Реагенаси који су нам били потребни за детерминацију водоник пероксида (H_2O_2) су калијум хидрогенфосфат дихидрат ($K_2HPO_4 \times 2H_2O$) $M_r=214,23$; калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$) $M_r=164,09$; натријум хлорид ($NaCl$) $M_r=58,44$; водоник пероксид (H_2O_2), $M_r=34,01$; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), $M_r=198,17$; фенол црвено (енгл. *phenol red*, $C_{19}H_{14}O_5S$), $M_r=354,4$; пероксидаза из коњске ротквице (енгл. *peroxidase from horse radish*, HRPO EC 1.11.1.7), $M_r=44=kDa$.

Линеарна зависност апсорбанце 610nm од концентрациј H_2O_2 је постојана за 1-60 μM опсег концентрација (1-60 nmol/ml). Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања H_2O_2 за временски интервал од 5-60 минута. У епрувете (12x100) пипетирано је 200 μl коронарног венског ефлуента и 800 μl свеже направљеног раствора фенол црвеног (енгл. *Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140

mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ($pH = 7$), 5,5 mM D(+)-глюкозе и 0,28 mM фенол црвеног. Узорцима се затим дода 10 μl (1:20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци су отављани на собној температури 10 минута, а затим се подеси $pH \approx 12$, помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина *Krebs-Hensenleitov*-ог раствора. Концентрација ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређиваног за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H_2O_2 износи 0,810). У 3 епрувете је пипетирано: (уместо коронарног венског ефлуента) 5, 10 и 20 μl , 1 mM раствора H_2O_2 , 200 μl дестиловане, 800 μl раствора фенол црвеног и 10 μl (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је $pH \approx 12$ помоћу 1 M NaOH (10 μl). Тако је финална концентрација H_2O_2 у 3 узорака стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ml}$. Мерење апсорбанце (A) спровођене су на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$, у стакленим киветама, запремина 1 ml на спектрофотометру. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу:

Фактор апсорбанце (F) по једном nmol-у водоник пероксида:

$$F = \Delta A / \text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{cuv}$$

На основу апсорбанце узорка на $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ (A_u) и њеног упоређивања са слепом пробом (A_{sp}) израчунава се финална апсорбанца (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). Помоћу овако добивене апсорбанце, фактора F и количине коронарног венског ефлуента употребљеног опотребљеног у есеју (200 ml) и израчунавана је концентрација и количина H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$

Након тога, количина ослобођеног H_2O_2 по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{ml} / \text{минут} / \text{g wt} = \Delta A / F \times CF / m_{\text{срца}}$$

3.4.5. Одређивање каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се по методи *Beutler*-а (121). Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на 230 nm. Наведена таласна дужина је од значаја јер на 230 nm водоник пероксид апсорбује светлост. Прецизна концентрација водоник-пероксида се одређује у односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1:10). Као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0,9 ml разблаженог пуфера и 0,1 ml разблаженог 30% раствора H₂O₂ (1:100). Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H₂O₂, на 230 nm, 0,071, по формули:

$$C = \Delta A / 0,071$$

Наон тога, добијена концентрација се разблажује до 10 mM.

Поступак детерминисања нивоа овог антиоксидационог ензима се спроводи тако што се у кварцну кивету у којој се налази 50 μ l пуфера додаје између 5 и 50 μ l узорка (зависно од активности каталазе). Реакција почиње додатком 1 ml 10 mM раствора водоник-пероксида. Пад апсорбанце прати се на 230 nm у току 3 минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H₂O₂, изражена у μ M, у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$\Delta A * R / 0,071 * Low * V$$

при чему је ΔA – промена апсорбанце у минути; R – разблажење; V – запремина узорка (ml); *Low* – количина протеина (mg/ml сонификата).

3.4.6. Одређивање супероксид дисмутазае (SOD)

Одређивање активности супероксид дисмутазае (SOD) заснива се на епинефринској методи која се заснива на праћењу смањења брзине аутооксидације у алкалној средини, која зависи од O₂^{•-} (122). SOD уклања O₂^{•-} и на тај начин спречава аутооксидацију епинефрина. Брзина аутооксидације се детектује спектрофотометријски на апсорбанци од 480 nm. Референцу, односно контролу представља брзина аутооксидације епинефрина у одсуству SOD, док брзина аутооксидације епинефрина у присуству SOD представља део референтних вредности. Износ SOD је изражена у

јединицама њене активности по граму Hb (unit/gHb) (123). Израчунавање се врши према наведеној реакцији:

$$\text{SOD} - 1 = 2(\Delta K - \Delta A) * R / V * Hb * \Delta K$$

При чему је ΔK промена апсорпције контролне реакције у минути; ΔA промена апсорпције реакције са узорком у минути; V запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml); Hb количина хемоглобина (g/100ml лизата); R разблажење.

3.4.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Ниво редукованог глутатиона (GSH) у плазми се одређује спектрофотометријски по методи *Beutler*-а (124), а ова метода се заснива на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5–дитио-бис-6,2-нитробензојеве киселином (DTNB). GSH се екстрахује тако што се у 0,1 ml 0,1% EDTA дода 0,4 ml плазме и 0,75 ml раствора за преципитацију. Овај раствор се прави према тако што се помеша 1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, а потом допуни до 100 ml дестилованом водом; раствор је стабилан 3 недеље на +4 °C. После мешања на *Vortex* мешалици, смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 rpm. У епрувете (12 x 100) пипетира се 300 μ l венског ефлуента, 750 μ l Na₂HPO₄ и 100 μ l DTNB (1 mg DTNB/ml 1% натријум цитрата). Као слепа проба користи се дестилована вода. Мерење се спроводи у кварцним киветама запремине 1 ml.

Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у еритроцитима одређује се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј.

За конструкцију стандардне криве користи се стандардни *Stock*-раствор редукованог глутатиона концентрације 1,5 mmol/l тако што се у 4 епрувете пипетира 10, 20, 30 и 40 μ l 1 mM раствора GSH, 300 μ l хладног перфузионог *Krebs-Hensenleit*-овог раствора (уместо венског ефлуента). На овај начин се одређује концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског

ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту према следећој формули:

$$\text{nmol GSH / ml еритроцита} = \Delta A / F$$

3.5. Хистопатолошка анализа срца пацова

Након завршетка експеримената на *Langendorff*-овом апарату, срца се фиксирају у 10% раствор формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена срца. Потом су срца укалупљена у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени резови дебљине 5 μm . Пресеци су нанесени на предметна стакла, а затим бојени хематоксилином и еозином.

3.5.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на +56 °C у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и урађен је поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води.

Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута, а потом су испирани дестилованом, а онда и текућом водом у трајању од 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем током једног минута у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом два пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*). Хистопатолошка анализа извршена је на основу ткива миокарда које је узимано из сваке групе и описа патолога који није

знао којој групи припадају који узорци. Резултати су представљени кроз слике, графикон и табелу која показује оцену оштећења миокарда. Оштећење миокарда је оцењивано према следећим критеријумима: 0 – без; 1 – благо (лако); 2 – умерено; 3 – тешко.

3.6. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на претходно публикованим резултатима (115,125). За прорачун је коришћен *t*-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (126).

Узимајући у обзир резултате ових студија, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 96 (по 12 у свакој групи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе, укупни студијски узорак је утврђен на најмање 112 експерименталних животиња.

3.7. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података се радила у статистичком пакету *IMB SPSS 20.0 for Windows*. За испитивање нормалности расподеле користили су се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користили су се Студентов *t*-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиле се *Bonferroni* тест. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, при чему се за статистичка значајност подразумева да је $p < 0,05$. За креирање графикона и табела коришћен је *Microsoft Excel*.

4. РЕЗУЛТАТИ

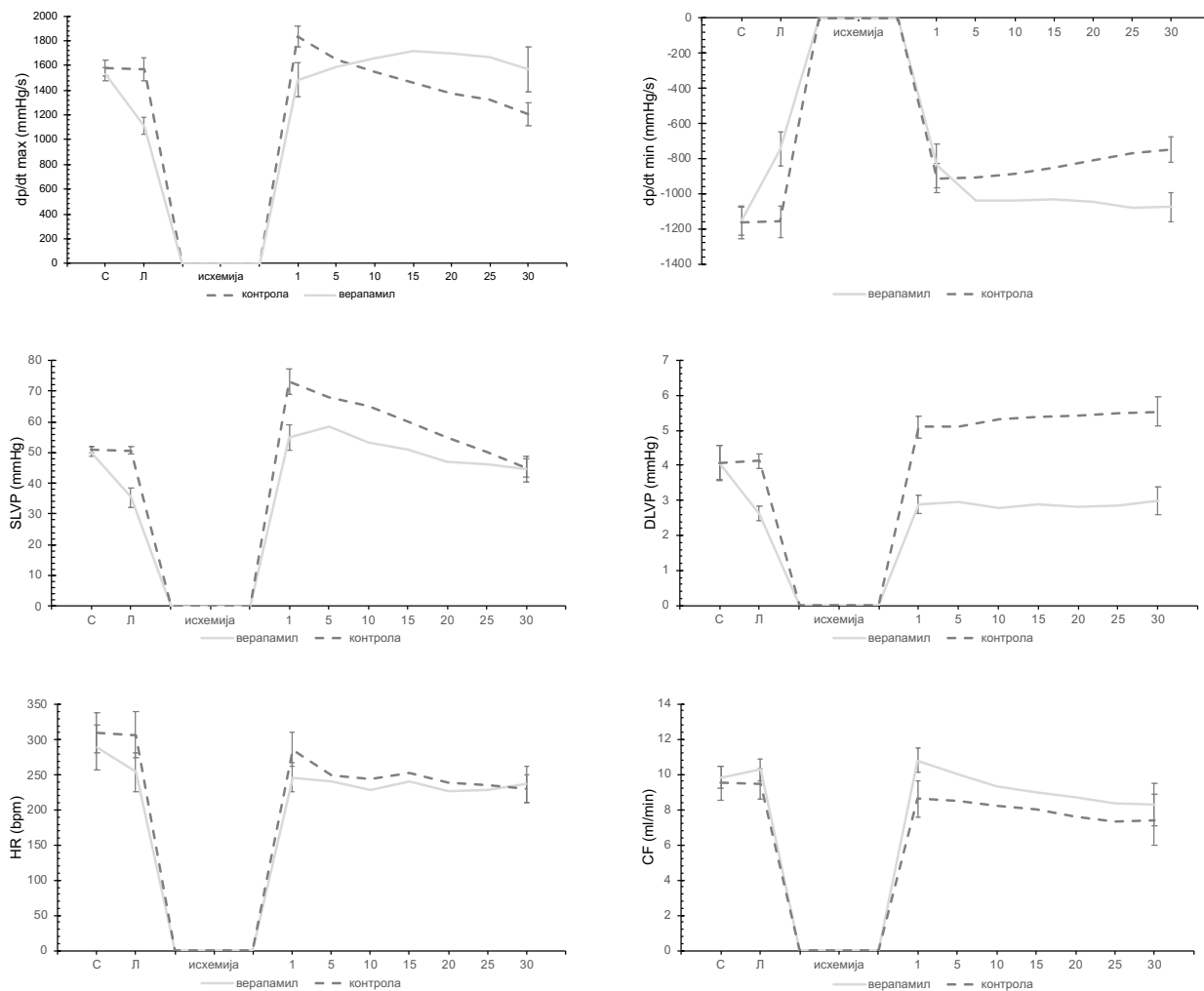
4.1. Ефекти фармаколошког прекондиционирања на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

4.1.1. Ефекти прекондиционирања верапамилом

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између контролне и групе у којој су срца прекондиционирана верапамилом, приказане су на **графикону 1**. У **табели 1** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

У верапамил групи, вредности $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP и DLVP су биле значајно снижене након администрације верапамила (Л) у односу на тачку стабилизације (С). У првом минуту реперфузије вредности $dp/dt \min$ и DLVP такође су биле значајно ниже у односу на тачку стабилизације, док су у последњем минуту реперфузије значајно ниже вредности у односу на стабилизацију биле у случају дијастолног притиска и коронарног протока. Прекондиционирање верапамилом довело је до снижења следећих параметара: $dp/dt \max$ (у односу на прву и последњу тачку реперфузије), $dp/dt \min$ (у односу на последњу тачку реперфузије), SLVP (у односу на прву тачку реперфузије). Вредности $dp/dt \min$ и CF су биле значајно снижене у последњем у односу на први минут реперфузије.

Значајне разлике између контролне и верапамил групе забележене су у свим праћеним параметрима, сем у фреквенци срца где су вредности биле приближно сличне. Вредности $dp/dt \max$ након прекондиционирања верапамилом биле су значајно ниже у првом, а више у последњем минуту реперфузије у односу на контролну групу. Вредности $dp/dt \min$ биле су значајно ниже у последњем минуту реперфузије у односу на контролну групу. SLVP је био су значајно нижи, док је DLVP био виши у првом минуту реперфузије у односу на контролу. Супротно томе, коронарни проток је био значајно виши у првом минуту реперфузије код групе која је прекондиционирана верапамилом.



Графикон 1. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у контролној и верапамил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекодиционарања верапамилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 1. Ефекти прекондиционирања верапамилом на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

		dp/dt max (mmHg)	dp/dt min (mmHg)	SLVP (mmHg)
контрола	С	1580.02 ± 67.32	-1163.21 ± 90.73	50.80 ± 0.95
	Л	1571.99 ± 65.48	-1159.93 ± 90.33	50.73 ± 1.09
	1	1835.21 ± 87.21 ^{*#}	-912.12 ± 84.37	73.12 ± 4.23 ^{*#}
	30	1206.03 ± 98.21 ^{*#§}	-749.13 ± 73.47 ^{*#§}	45.09 ± 2.94 [§]
верапамил	С	1531.67 ± 56.03	-1157.67 ± 80.70	50.27 ± 1.70
	Л	1110.75 ± 71.05 [*]	-746.82 ± 96.19 [*]	35.35 ± 3.09 [*]
	1	1485.71 ± 136.87 ^{#a}	-840.45 ± 123.32 [*]	54.92 ± 4.17 ^{#a}
	30	1569.96 ± 185.84 ^{#a}	-1076.77 ± 81.21 ^{#§a}	44.63 ± 4.12 [#]
		DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (ml/min)
контрола	С	4.07 ± 0.50	310.12 ± 28.36	9.52 ± 0.94
	Л	4.12 ± 0.23	307.89 ± 33.01	9.46 ± 0.84
	1	5.10 ± 0.31 ^{*#}	286.54 ± 24.11	8.64 ± 1.06
	30	5.54 ± 0.41 ^{*#}	231.12 ± 20.01 ^{*#§}	7.40 ± 1.44 ^{*#§}
верапамил	С	4.08 ± 0.50	289.78 ± 32.05	9.83 ± 0.62
	Л	2.62 ± 0.21 [*]	254.02 ± 28.01	10.27 ± 0.62
	1	2.89 ± 0.25 [*]	246.28 ± 21.12	10.80 ± 0.70 ^a
	30	3.00 ± 0.4 ^{*a}	236.38 ± 26.73	8.30 ± 1.19 ^{*#§}

Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

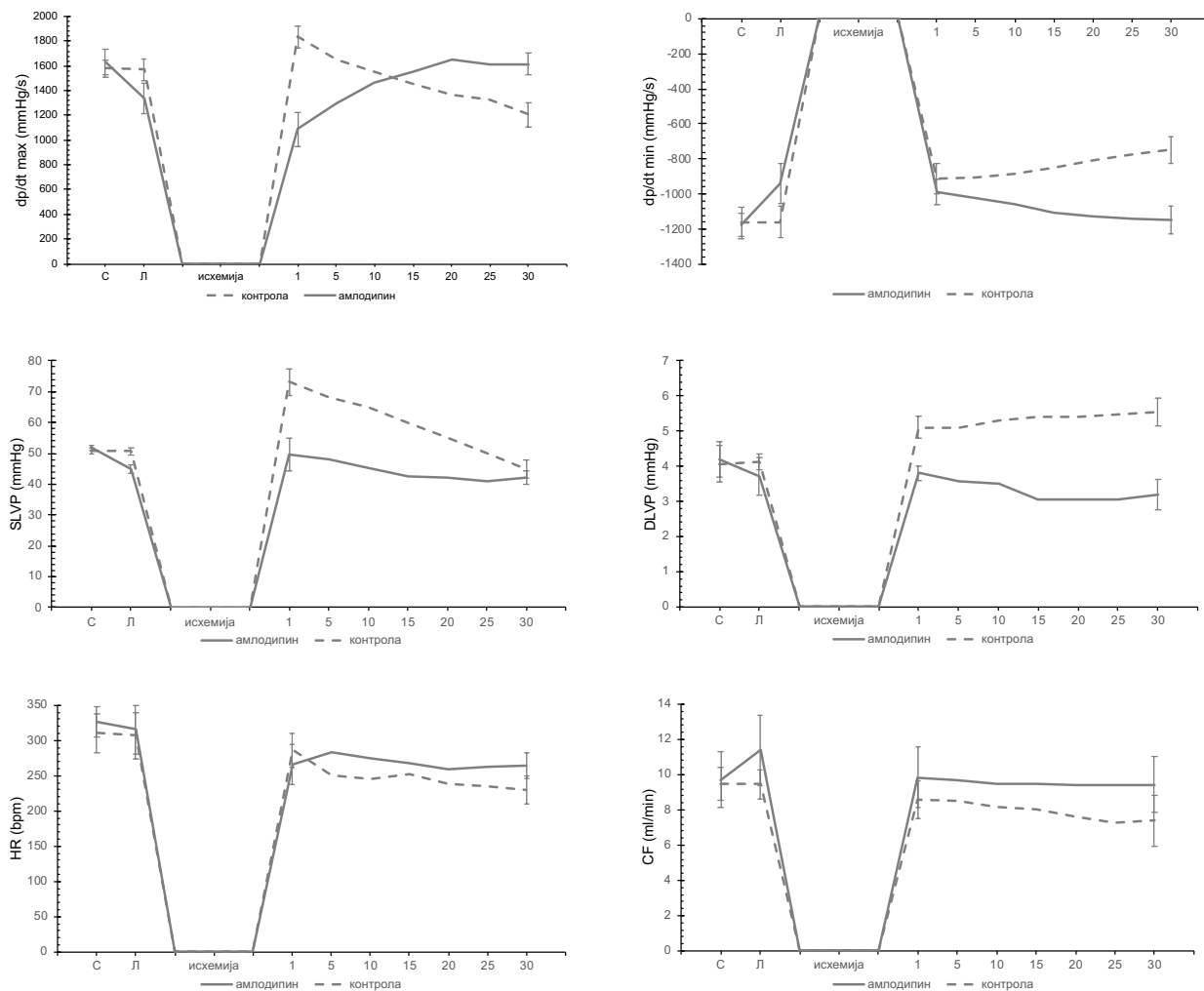
*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи (#p < 0.05); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§p < 0.05); ^aСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^ap < 0.05).

4.1.2. Ефекти прекондиционарања амлодипином

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између контролне и групе у којој су срца прекондиционарана амлодипином, приказане су на **графикону 2**. У **табели 2** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

Вредности $dp/dt \min$ и SLVP су биле значајно ниже након администрације амлодипина (Л) у односу на тачку стабилизације. Иако је дошло до повећања вредности $dp/dt \min$ и у првом минуту реперфузије, овај параметар је био значајно нижи у односу на тачку стабилизације. Сви остали параметри сем систолног притиска и фреквенце су се до последњег минута реперфузије вратили на почетне вредности.

Значајне разлике између контролне и амлодипин групе забележене су у свим праћеним параметрима, сем у фреквенци срца где су вредности биле приближно исте. Прекондиционарање амлодипином довело је до повећања протока у односу на групу која није била подвргнута прекондиционарању. У првом минуту реперфузије вредности $dp/dt \max$ и SLVP су биле значајно ниже код групе која је прекондиционарана амлодипином, у односу на контролну групу, док су у последњем минуту реперфузије вредности $dp/dt \max$, $dp/dt \min$ и CF биле значајно више у амлодипин у односу на контролну групу. Супротно томе, дијастолни притисак у левој комори је био значајно нижи у последњем минуту реперфузије код групе у којој су срца прекондиционарана амлодипином.



Графикон 2. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у контролној и амлодипин групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционирања амлодипином (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 2. Ефекти прекондиционирања амлодипином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

		dp/dt max (mmHg)	dp/dt min (mmHg)	SLVP (mmHg)
контрола	С	1580.02 ± 67.32	-1163.21 ± 90.73	50.80 ± 0.95
	Л	1571.99 ± 65.48	-1159.93 ± 90.33	50.73 ± 1.09
	1	1835.21 ± 87.21 ^{*#}	-912.12 ± 84.37	73.12 ± 4.23 ^{*#}
	30	1206.03 ± 98.21 ^{*#§}	-749.13 ± 73.47 ^{*#§}	45.09 ± 2.94 [§]
нишлупин	С	1635.08 ± 102.45	-1175.02 ± 67.43	51.87 ± 0.88
	Л	1337.43 ± 123.74	-937.75 ± 114.91 [*]	44.75 ± 1.41 ^{*b}
	1	1087.35 ± 136.74 ^a	-987.32 ± 74.41 [*]	49.52 ± 5.23 ^a
	30	1614.25 ± 89.21 ^{§a}	-1147.17 ± 76.62 ^{#a}	42.15 ± 2.03 [*]
		DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (ml/min)
контрола	С	4.07 ± 0.50	310.12 ± 28.36	9.52 ± 0.94
	Л	4.12 ± 0.23	307.89 ± 33.01	9.46 ± 0.84
	1	5.10 ± 0.31 ^{*#}	286.54 ± 24.11	8.64 ± 1.06
	30	5.54 ± 0.41 ^{*#}	231.12 ± 20.01 ^{*#§}	7.40 ± 1.44 ^{*#§}
нишлупин	С	4.18 ± 0.49	325.55 ± 21.58	9.70 ± 1.58
	Л	3.72 ± 0.54	315.45 ± 34.36	11.40 ± 1.99 ^a
	1	3.80 ± 0.19	266.32 ± 28.90	9.83 ± 1.72
	30	3.20 ± 0.43 ^a	264.18 ± 18.87 [*]	9.43 ± 1.58 ^a

Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

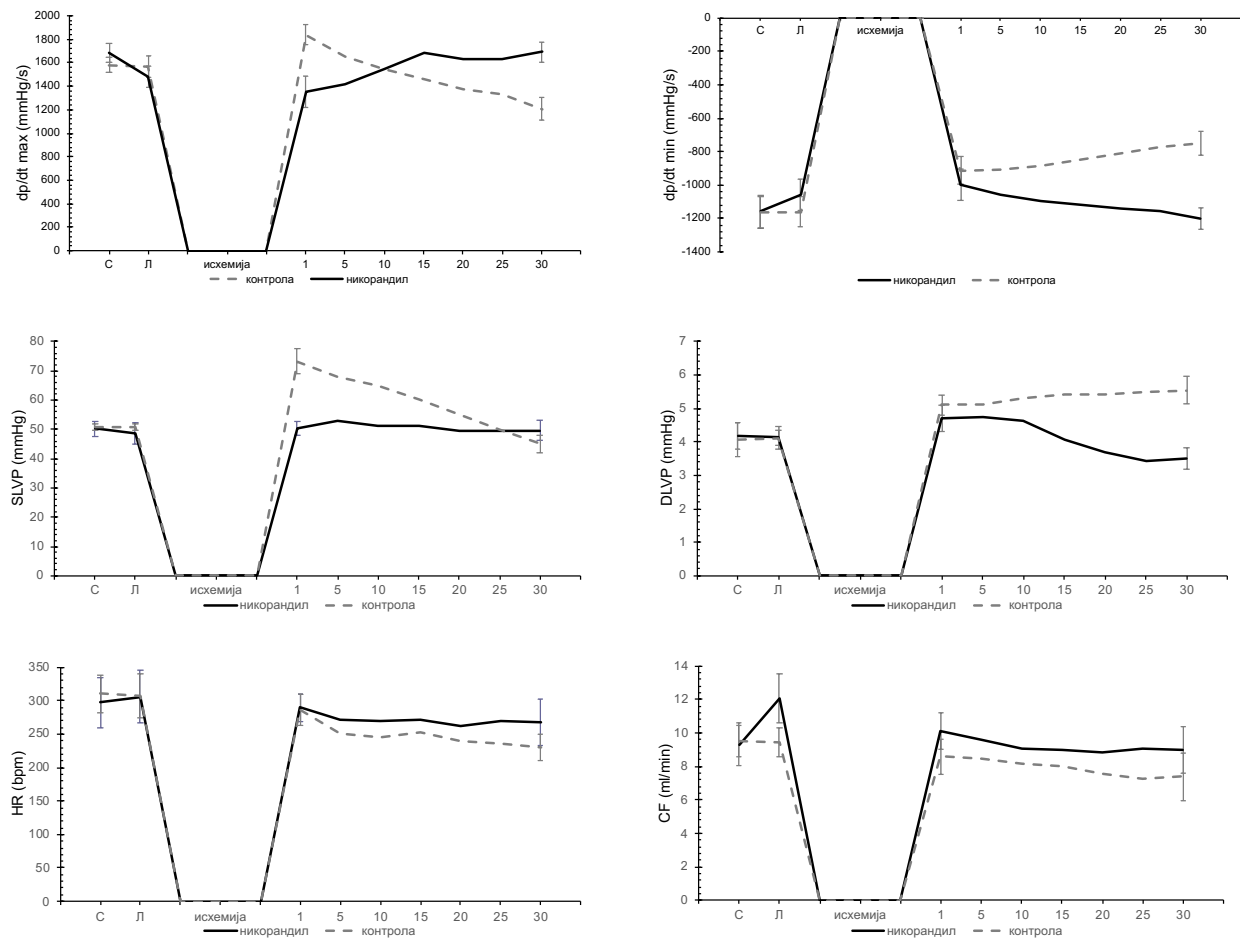
*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи (#p < 0.05); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§p < 0.05); ^aСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^ap < 0.05).

4.1.3. Ефекти прекондиционарања никорандилом

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између контролне и групе у којој су срца прекондиционарана никорандилом, приказане су на **графикону 3**. У **табели 3** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

Вредност $dp/dt \max$ у групи која је подвргнута прекондиционарању никорандилом у последњем минуту реперфузије била је слична као и у тачки стабилизације, али статистички значајно виша од вредности која је забележена у првом минуту реперфузије. Дијастолни притисак био је значајно виши у првом минуту реперфузије у односу на тачку стабилизације и након петоминутне администрације никорандила, али су се до краја реперфузије дијастолни притисак се вратио на почетне вредности.

Значајне разлике између контролне и никорандил групе забележене су у свим праћеним параметрима, сем у фреквенци срца где су вредности биле приближно исте. Прекондиционарање никорандилом довело је до повећања протока у односу на групу која није била подвргнута прекондиционарању. У првом минуту реперфузије вредности $dp/dt \max$ и SLVP су биле значајно ниже код групе која је прекондиционарана никорандилом, у односу на контролну групу, док су у последњем минуту реперфузије вредности $dp/dt \max$, $dp/dt \min$ и DLVP биле значајно више у никорандил у односу на контролну групу.



Графикон 3. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у контролној и никорандил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекодиционарања никорандилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 3. Ефекти прекондиционирања никорандилом на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

		dp/dt max (mmHg)	dp/dt min (mmHg)	SLVP (mmHg)
контрола	С	1580.02 ± 67.32	-1163.21 ± 90.73	50.80 ± 0.95
	Л	1571.99 ± 65.48	-1159.93 ± 90.33	50.73 ± 1.09
	1	1835.21 ± 87.21 ^{*#}	-912.12 ± 84.37	73.12 ± 4.23 ^{*#}
	30	1206.03 ± 98.21 ^{*#§}	-749.13 ± 73.47 ^{*#§}	45.09 ± 2.94 [§]
никорандил	С	1682.60 ± 77.14	-1157.97 ± 97.74	50.18 ± 2.59
	Л	1480.83 ± 90.36	-1056.07 ± 95.34	48.52 ± 3.61
	1	1351.01 ± 135.02 ^а	-996.52 ± 94.38	50.32 ± 2.52 ^а
	30	1691.31 ± 86.80 ^{§а}	-1201.01 ± 61.73 ^а	49.62 ± 3.41
		DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (ml/min)
контрола	С	4.07 ± 0.50	310.12 ± 28.36	9.52 ± 0.94
	Л	4.12 ± 0.23	307.89 ± 33.01	9.46 ± 0.84
	1	5.10 ± 0.31 ^{*#}	286.54 ± 24.11	8.64 ± 1.06
	30	5.54 ± 0.41 ^{*#}	231.12 ± 20.01 ^{*#§}	7.40 ± 1.44 ^{*#§}
никорандил	С	4.18 ± 0.39	297.21 ± 37.19	9.33 ± 1.29
	Л	4.13 ± 0.34	305.78 ± 39.74	12.07 ± 1.44 ^а
	1	4.70 ± 0.39 ^{*#с}	289.45 ± 21.06	10.13 ± 1.09
	30	3.50 ± 0.31 ^а	268.17 ± 34.62	9.03 ± 1.39

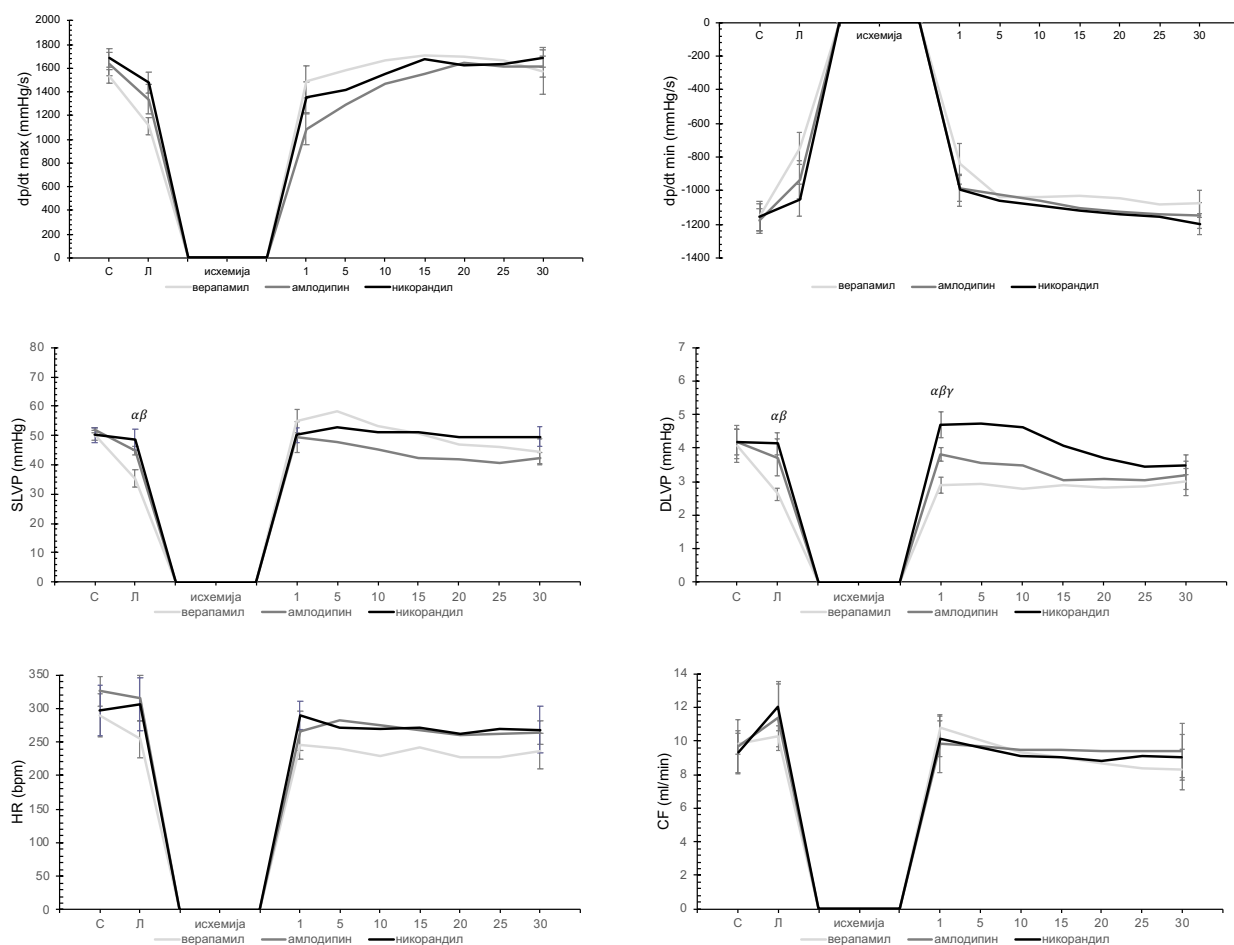
Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи (#p < 0.05); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§p < 0.05); ^аСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^аp < 0.05).

4.1.4. Промене кардиодинамских параметара и коронарног протока у односу на акутно примењен фармаколошки агенс

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између верапамил, амлодипин и никорандил групе, приказане су на **графикону 4.**

Након петоминутне администрације верапамила (Л) вредност систолног притиска у левој комори била је значајно нижа у односу на друге две групе у којима су срца прекондиционирана амлодипином или никорандилом. Такође, дијастолни притисак у левој комори након администрације верапамила био је значајно нижи у односу на никорандил групу. DLVP био је значајно различит у првом минуту реперфузије, при чему је највиша вредност била у никорандил, затим у амлодипин, а најнижа у верапамил групи.



Графикон 4. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у верапамил, амлодипин и никорандил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционирања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. α Статистички значајна разлика између верапамил и амлодипин групе ($\alpha p < 0.05$); β Статистички значајна разлика између верапамил и никорандил групе ($\beta p < 0.05$); γ Статистички значајна разлика између амлодипин и никорандил групе ($\gamma p < 0.05$).

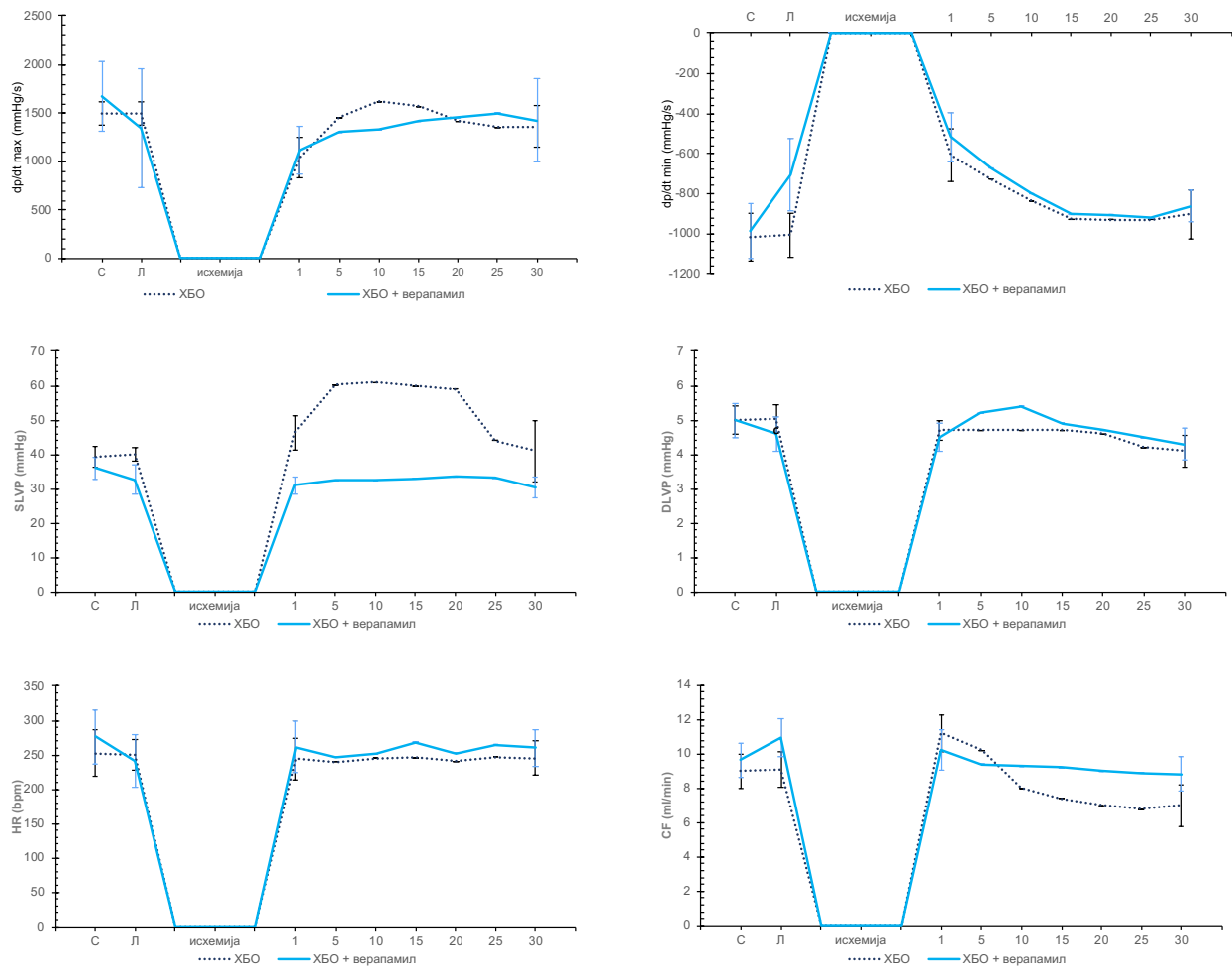
4.2. Ефекти комбиновања два маневра прекондиционарања на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

4.2.1. Ефекти комбинованог прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и верапамилом

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између ХБО и групе у којима је након прекондиционарања ХБО изолованим срцима апликован верапамил, приказане су на **графикону 5**. У **табели 4** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

У ХБО + верапамил групи, вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ биле су значајно ниже у првом минуту реперфузије у односу на остале тачке од интереса, док је фреквенца срца била нижа непосредно након прекондиционарања верапамилом у односу на почетну вредност.

Значајне разлике између ХБО и ХБО + верапамил групе забележене су само у систолном притиску леве коморе. Наиме, током тридесетоминутне реперфузије SLVP је био значајно нижи у експерименталној групи у односу на групу пацова која су подвргнута само прекондиционарању у хипербаричној комори.



Графикон 5. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у ХБО и ХБО + верапамил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционирања верапамилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 4. Ефекти комбиннованог прекодиционирања ХБО и верапамилом на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

		dp/dt max (mmHg)	dp/dt min (mmHg)	SLVP (mmHg)
ХБО	С	1502.01 ± 121.23	-1016.97 ± 121.03	39.32 ± 3.05
	Л	1502.99 ± 123.01	-1006.97 ± 110.97	39.91 ± 2.11
	1	1048.11 ± 211.11*#	-606.01 ± 132.21*#	46.31 ± 4.78*#
	30	1364.05 ± 213.10	-902.94 ± 121.19§	41.06 ± 4.45§
ХБО + верапамил	С	1673.42 ± 358.87	-987.52 ± 138.97	35.87 ± 3.21
	Л	1344.02 ± 271.56*	-705.21 ± 177.78*	32.58 ± 4.28
	1	1118.01 ± 242.42*#	-516.59 ± 121.92*#	31.02 ± 2.47 ^a
	30	1423.99 ± 403.21§	-861.62 ± 80.91§	30.41 ± 3.21 ^a
		DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (ml/min)
ХБО	С	5.01 ± 0.40	252.11 ± 34.06	9.12 ± 0.98
	Л	5.02 ± 0.42	249.91 ± 22.11	9.14 ± 1.06
	1	4.68 ± 0.29	243.86 ± 31.21	11.21 ± 1.09
	30	4.15 ± 0.47	245.12 ± 25.02	7.12 ± 1.21§
ХБО + верапамил	С	5.01 ± 0.50	276.18 ± 39.59	9.64 ± 1.03
	Л	4.61 ± 0.21	241.22 ± 37.64*	10.92 ± 1.98
	1	4.49 ± 0.25	261.39 ± 37.56	10.24 ± 1.17
	30	4.32 ± 0.41	260.04 ± 26.15	8.84 ± 1.03

Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

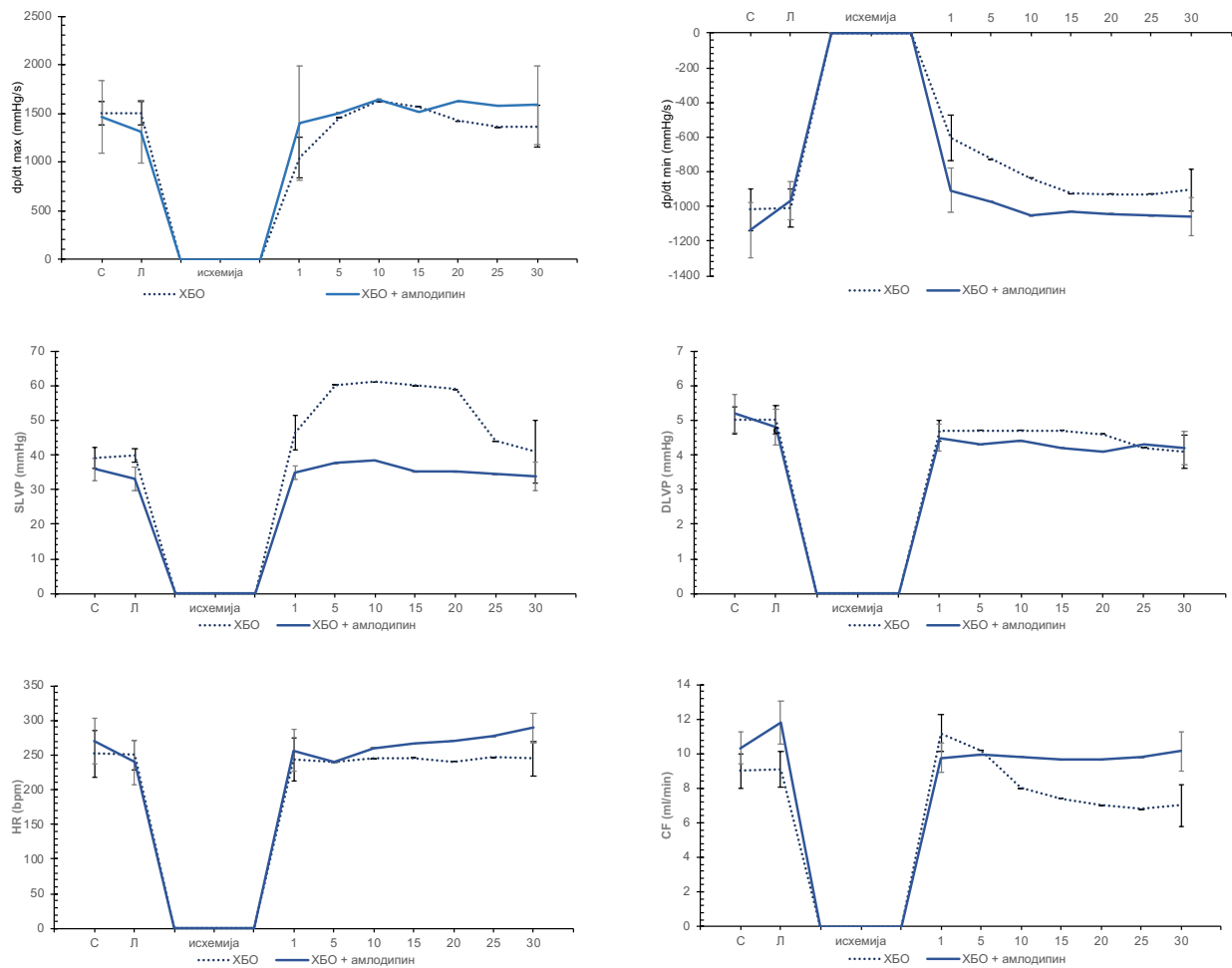
*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи (#p < 0.05); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§p < 0.05); ^aСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^ap < 0.05).

4.2.2. Ефекти комбинованог прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и амлодипином

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између ХБО и групе у којима је након прекондиционарања ХБО изолованим срцима апликован амлодипин, приказане су на **графикону 6**. У **табели 5** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

У ХБО + амлодипин групи максимална стопа промене притиска у левој комори значајно је снижена након прекондиционарања амлодипином у односу на последњи минут реперфузије. Вредности минималне стопе промене притиска у левој комори биле су статистички значајно ниже након администрације амлодипином (Л) и првог минута реперфузије у односу на тачку стабилизације. Такође, DLVP је био статистички значајно нижи у последњем минуту реперфузије (30) у односу на почетне вредности (С). Фреквенца срца била је статистички значајно нижа непосредно након прекондиционарања верапамилом и у првом минуту реперфузије (1), у односу на почетне вредности (С) и послењи минут реперфузије (30).

Значајне разлике између ХБО и ХБО + амлодипин групе забележене су у вредностима $dp/dt \min$ (у 1. минуту реперфузије значајно виши у односу на ХБО групу), SLVP (у 1. минуту реперфузије значајно ниши у односу на ХБО групу) и коронарног протока (у тачкама Л и 30 значајно више у односу на ХБО групу).



Графикон 6. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у ХБО и ХБО + амлодипин групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционирања верапамилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 5. Ефекти комбинованог прекондиционирања ХБО и амлодипином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

		dp/dt max (mmHg)	dp/dt min (mmHg)	SLVP (mmHg)
ХБО	С	1502.01 ± 121.23	-1016.97 ± 121.03	39.32 ± 3.05
	Л	1502.99 ± 123.01	-1006.97 ± 110.97	39.91 ± 2.11
	1	1048.11 ± 211.11 ^{*#}	-606.01 ± 132.21 ^{*#}	46.31 ± 4.78 ^{*#}
	30	1364.05 ± 213.10	-902.94 ± 121.19 [§]	41.06 ± 4.45 [§]
ХБО + амлодипин	С	1463.21 ± 369.38	-1136.92 ± 158.91	35.81 ± 3.11
	Л	1308.58 ± 321.54	-967.86 ± 111.85 [*]	33.02 ± 3.42
	1	1398.67 ± 391.23	-902.21 ± 126.20 ^{*а}	35.03 ± 2.02 ^а
	30	1587.22 ± 403.68 [#]	-1057.02 ± 109.75	33.79 ± 4.01
		DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (ml/min)
ХБО	С	5.01 ± 0.40	252.11 ± 34.06	9.12 ± 0.98
	Л	5.02 ± 0.42	249.91 ± 22.11	9.14 ± 1.06
	1	4.68 ± 0.29	243.86 ± 31.21	11.21 ± 1.09
	30	4.15 ± 0.47	245.12 ± 25.02	7.12 ± 1.21 [§]
ХБО + амлодипин	С	5.21 ± 0.49	270.05 ± 33.15	10.33 ± 0.91
	Л	4.78 ± 0.54	240.15 ± 31.84 [*]	11.80 ± 1.27 ^а
	1	4.48 ± 0.19	256.67 ± 29.77 [*]	9.77 ± 0.85
	30	4.20 ± 0.43 [*]	289.01 ± 21.09 ^{#§}	10.13 ± 1.11 ^а

Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

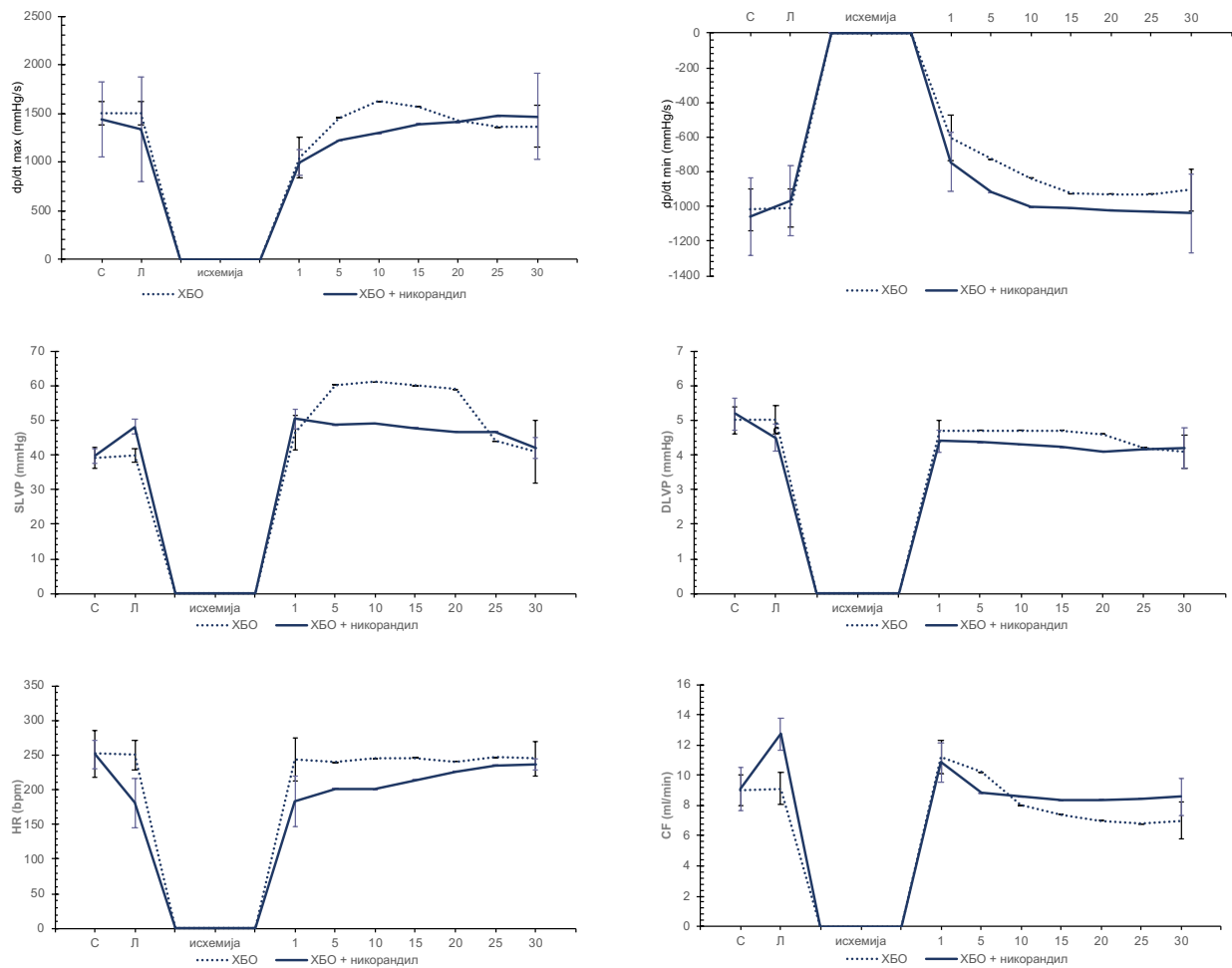
*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи (#p < 0.05); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§p < 0.05); ^аСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^аp < 0.05).

4.2.3. Ефекти комбинованог прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и никорандилом

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између ХБО и групе у којима је након прекондиционарања ХБО изолованим срцима апликован никорандил, приказане су на **графикону 7**. У **табели 6** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

У ХБО + никорандил групи максимална стопа промене притиска у левој комори значајно је снижена након прекондиционарања никорандилом у односу на вредности које су забележене у осталим тачкама од интереса. Вредности минималне стопе промене притиска у левој комори биле су статистички значајно ниже у првом минуту реперфузије у односу на тачку стабилизације и последњи минут реперфузије. Систолни притисак у левој комори био је значајно виши непосредно након апликације никорандила (Л) и у првом минуту реперфузије у односу на почетне вредности (С). Такође, DLVP је био статистички значајно нижи у последњем минуту реперфузије (30) у односу на почетне вредности (С). Фреквенца срца била је статистички значајно нижа непосредно након прекондиционарања верапамилом и у првом минуту реперфузије (1), у односу на почетне вредности (С) и послењи минут реперфузије (30). Након петоминутног прекондиционарања никорандилом дошло је до значајног повећања коронарног протока у односу на стабилизацију и последњи минут реперфузије (30).

Значајних разлика између ХБО и ХБО + никорандил групе није било, сем у случају коронарног протока који је био виши након прекондиционарања никорандилом.



Графикон 7. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у ХБО и ХБО + нифедил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционирања верапамилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 6. Ефекти комбинованог прекондиционарања ХБО и никорандилом на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

		dp/dt max (mmHg)	dp/dt min (mmHg)	SLVP (mmHg)
ХБО	С	1502.01 ± 121.23	-1016.97 ± 121.03	39.32 ± 3.05
	Л	1502.99 ± 123.01	-1006.97 ± 110.97	39.91 ± 2.11
	1	1048.11 ± 211.11 ^{*#}	-606.01 ± 132.21 ^{*#}	46.31 ± 4.78 ^{*#}
	30	1364.05 ± 213.10	-902.94 ± 121.19 [§]	41.06 ± 4.45 [§]
ХБО + никорандил	С	1437.33 ± 380.31	-1060.25 ± 224.23	39.69 ± 2.01
	Л	1334.03 ± 535.61	-964.83 ± 202.09	48.21 ± 1.97 [*]
	1	996.33 ± 134.98 ^{*#}	-743.51 ± 167.99 [*]	50.31 ± 2.98 [*]
	30	1467.51 ± 442.21 [§]	-1040.63 ± 225.48 [§]	42.02 ± 3.01
		DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (ml/min)
ХБО	С	5.01 ± 0.40	252.11 ± 34.06	9.12 ± 0.98
	Л	5.02 ± 0.42	249.91 ± 22.11	9.14 ± 1.06
	1	4.68 ± 0.29	243.86 ± 31.21	11.21 ± 1.09
	30	4.15 ± 0.47	245.12 ± 25.02	7.12 ± 1.21 [§]
ХБО + никорандил	С	5.18 ± 0.39	251.13 ± 20.16	9.10 ± 1.38
	Л	4.50 ± 0.34	180.67 ± 35.78 [*]	12.73 ± 1.06 [*]
	1	4.42 ± 0.39	183.04 ± 36.18 [*]	10.87 ± 1.29
	30	4.21 ± 0.31 [*]	236.17 ± 7.96 ^{#§}	8.57 ± 1.19 [#]

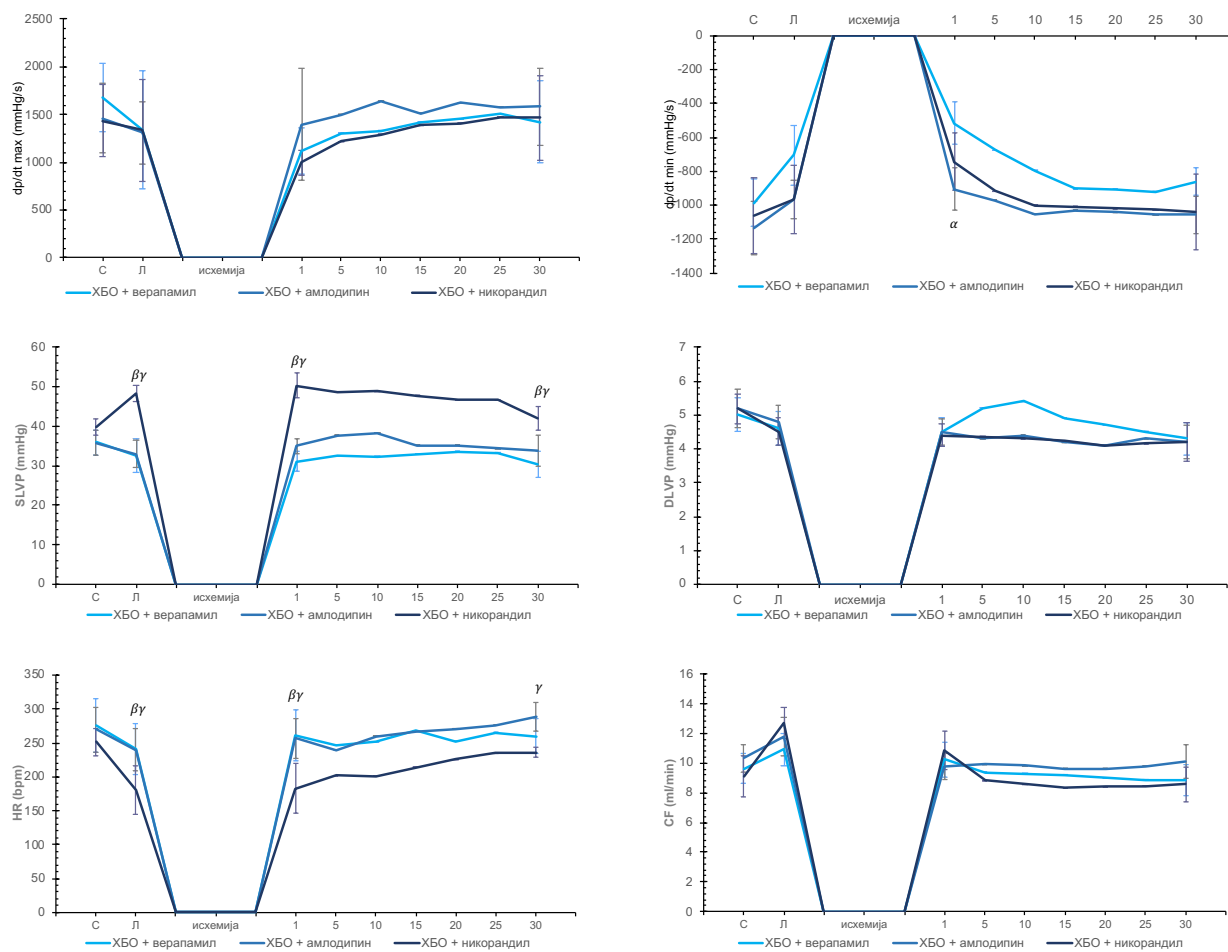
Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи (#p < 0.05); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§p < 0.05); ^aСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^ap < 0.05).

4.2.4. Промене кардиодинамских параметара и коронарног протока у ХБО групи у односу на акутно примењен фармаколошки агенс

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока у групи пацова који су током две недеље били изложени 100% кисеонику у хипербаричној комори у односу на акутно примењен фармаколошки агенс верапамил, амлодипин или никорандил, приказане су на **графикону 8**.

Минимална стопа промене притиска у левој комори у првом минуту реперфузије била је значајно нижа у групи којој је акутно апликован верапамил у односу на групу којој је акутно апликован амлодипин. Вредност систолног притиска у левој комори била је значајно виша у ХБО + никорандил групи у односу на друге две експерименталне групе у тачкама Л, првом и последњем минуту реперфузије. Фреквенца срца била је значајно нижа у ХБО + никорандил групи у односу на ХБО + верапамил групи у Л и у првом минуту реперфузије, као и у односу на ХБО + амлодипин групи у Л, у првом и у последњем минуту реперфузије.



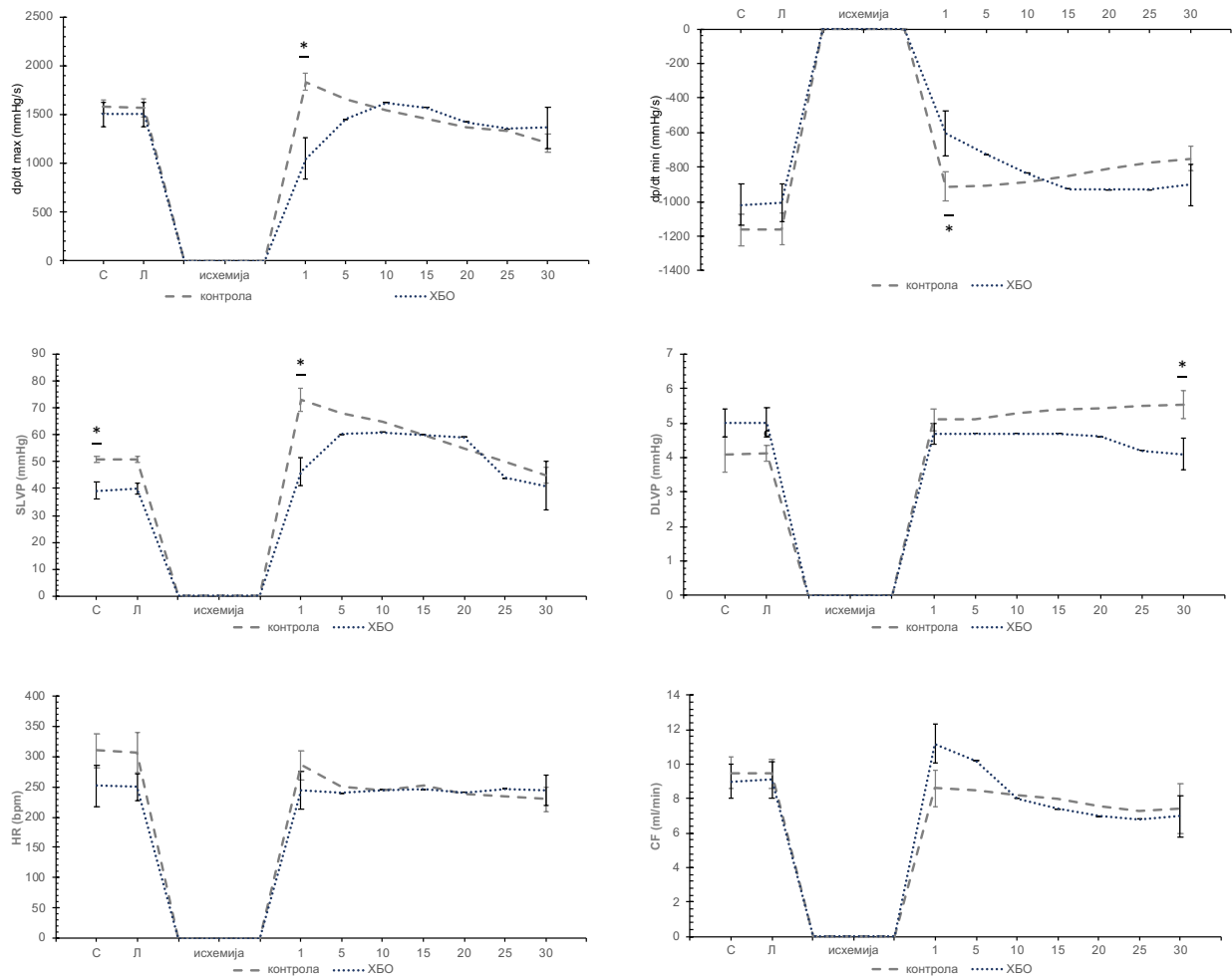
Графикон 8. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у ХБО + верапамил, ХБО + амлодипин и ХБО + никорандил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног преконачионирања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. α Статистички значајна разлика између ХБО + верапамил и ХБО + амлодипин групе ($\alpha p < 0.05$); β Статистички значајна разлика између ХБО + верапамил и ХБО + никорандил групе ($\beta p < 0.05$); γ Статистички значајна разлика између ХБО + амлодипин и ХБО + никорандил групе ($\gamma p < 0.05$).

4.3. Компарација кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца пацова између фармаколошког и комбинованог прекондиционирања

4.3.1. Поређење ефеката прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и контролне групе

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између групе пацова која није била изложена прекондиционирању и групе пацова која је била изложена прекондиционирању у хипербаричној комори, приказане су на **графикону 9**.

Максимална и минимална стопа промене притиска у левој комори у првом минуту реперфузије била је значајно виша у групи која није била подвргнута прекондиционирању (контрола). Вредност систолног притиска у левој комори била је значајно виша у контролној групи у односу на ХБО групу у тачки стабилизације (С), као и у првом минуту реперфузије (1), док је вредност дијастолног притиска била значајно виша само у последњем минуту реперфузије (30).

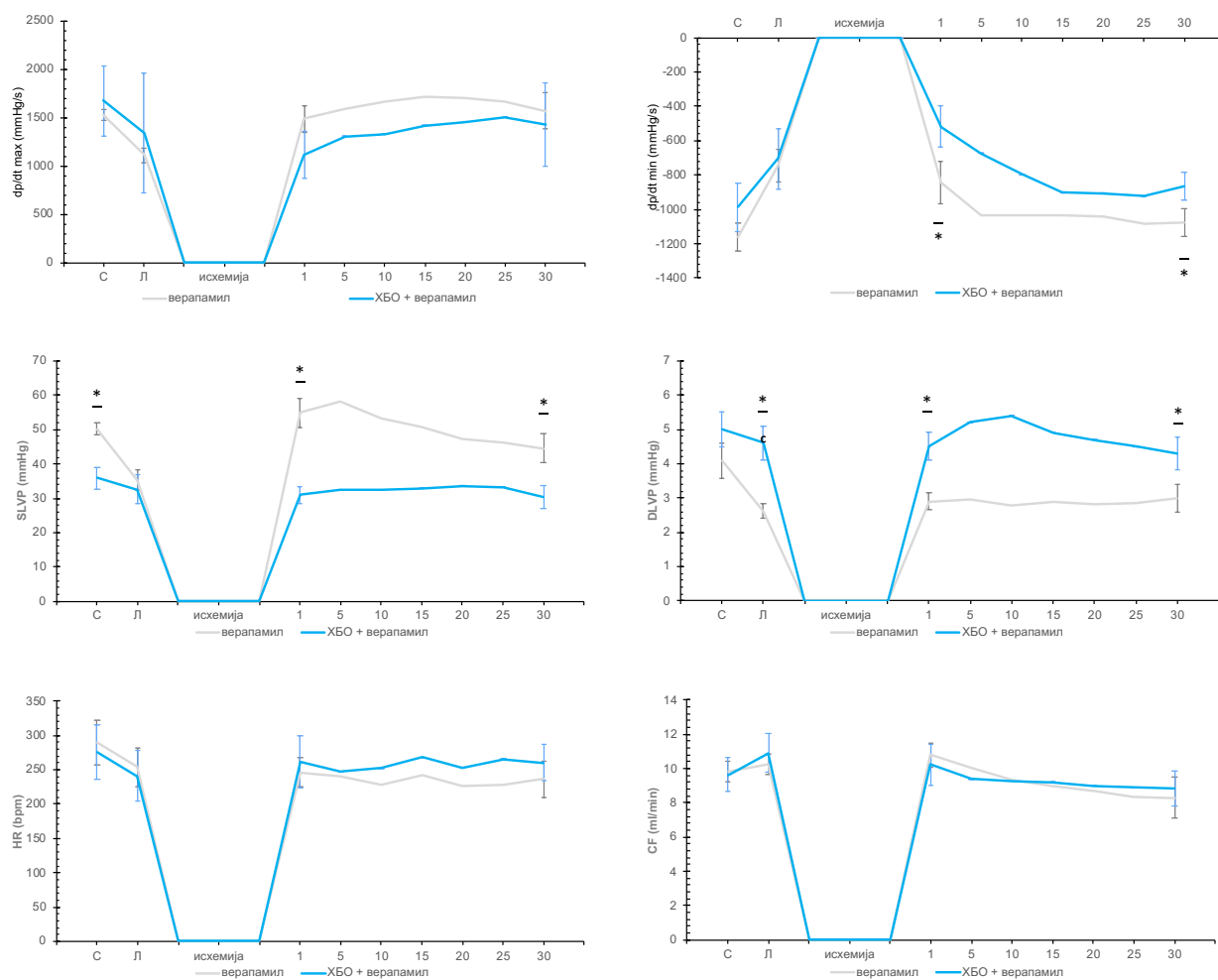


Графикон 9. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у контролној и ХБО групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекодиционирања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. *Статистички значајна разлика између контролне и ХБО групе (* $p < 0.05$).

4.3.2. Поређење ефеката прекондиционарања верапамилом и комбинованог прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и верапамилом

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између групе пацова која је била изложена прекондиционарању верапамилом и групе пацова која је била изложена прекондиционарању и у хипербаричној комори и верапамилом (акутно, у срце), приказане су на **графикону 10**.

Минимална стопа промене притиска у левој комори у првом и последњем минути реперфузије била је значајно виша у групи која је била подвргнута само акутном прекондиционарању верапамилом. Вредност систолног притиска у левој комори била је значајно виша у верапамил у односу на ХБО + верапамил групу у тачки стабилизације (С), као и у првом и последњем минути реперфузије, док је вредност дијастолног притиска била значајно нижа у верапамил групи током читавог експерименталног периода.

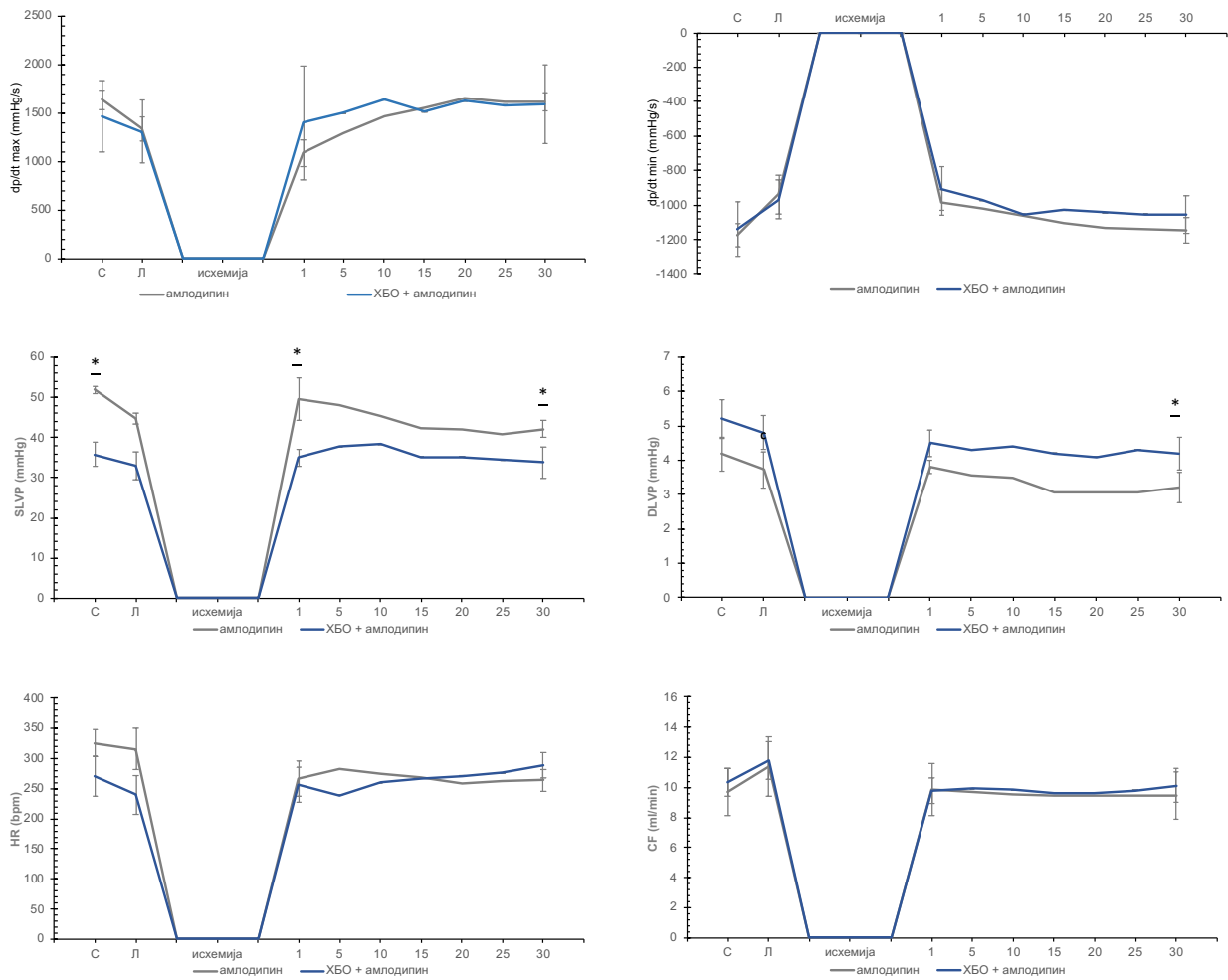


Графикон 10. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у верапамил и ХБО + верапамил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекодиционарања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. *Статистички значајна разлика између верапамил и ХБО + верапамил групе (* $p < 0.05$).

4.3.3. Поређење ефеката прекондиционарања амлодипином и комбинованог прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и амлодипином

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између групе пацова која је била изложена прекондиционарању амлодипином и групе пацова која је била изложена прекондиционарању и у хипербаричној комори и амлодипином (акутно, у срце), приказане су на **графикону 11**.

Вредност систолног притиска у левој комори била је значајно виша у амлодипин у односу на ХБО + амлодипин групу током читавог експерименталног периода, док је вредност дијастолног притиска била значајно нижа у амлодипин групи у последњем минути реперфузије (30).

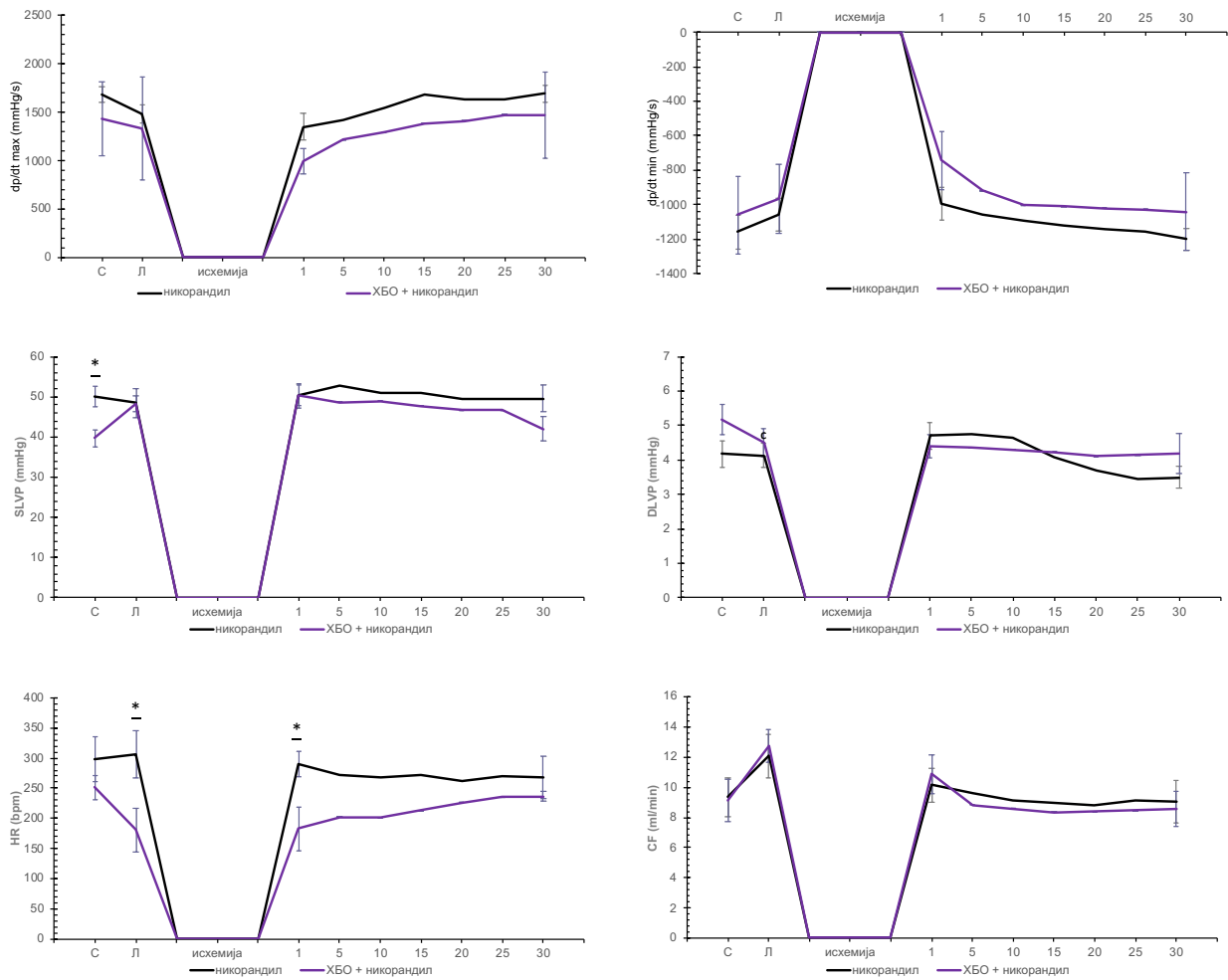


Графикон 11. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у амлодипин и ХБО + амлодипин групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекодиционарања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. *Статистички значајна разлика између амлодипин и ХБО + амлодипин групе (* $p < 0.05$).

4.3.4. Поређење ефеката прекондиционарања никорандилом и комбинованог прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и никорандилом

Разлике у вредностима испитиваних кардиодинамских параметара и коронарног протока између групе пацова која је била изложена прекондиционарању никорандил и групе пацова која је била изложена прекондиционарању и у хипербаричној комори и никорандилом (акутно, у срце), приказане су на **графикону 12**.

Вредност систолног притиска у левој комори била је значајно виша у никорандил у односу на ХБО + никорандил групу у првом минуту реперфузије, као и фреквенца срца која је била значајно виша у никорандил групи у тачкама од интереса Л и 1.



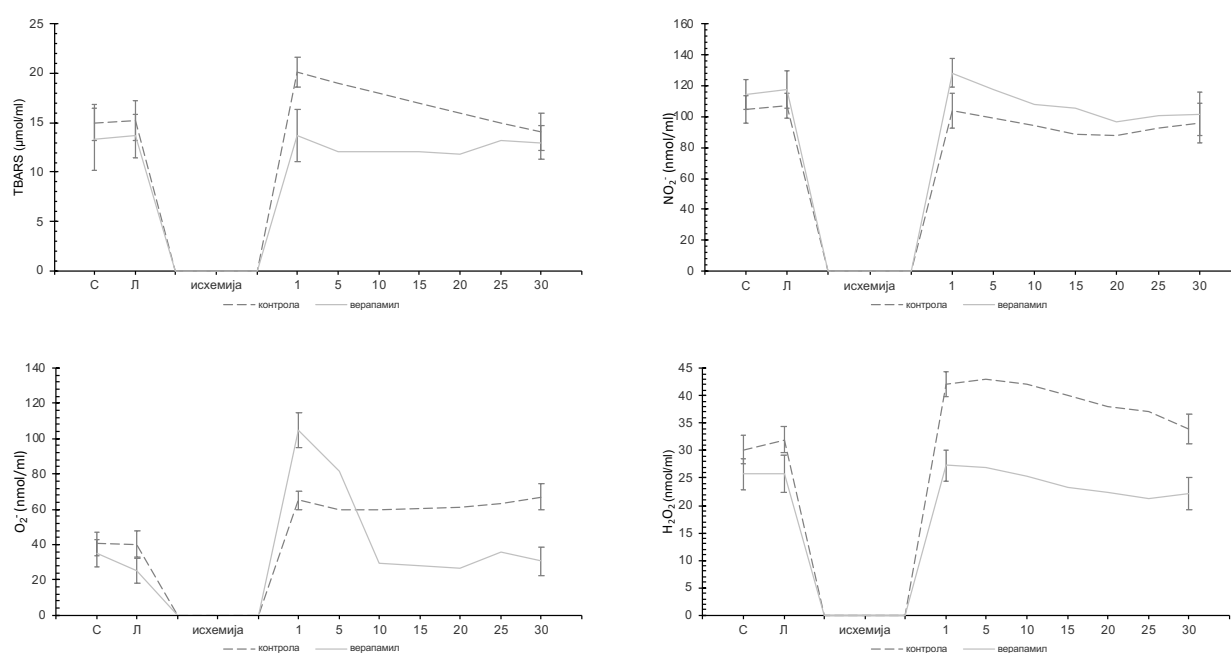
Графикон 12. Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока у ниторандил и ХБО + ниторандил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекодиционирања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. *Статистички значајна разлика између ниторандил и ХБО + ниторандил групе (* $p < 0.05$).

4.4. Ефекти фармаколошког прекондиционарања на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца пацова

4.4.1. Ефекти прекондиционарања верапамилом

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између контролне и групе у којој су срца прекондиционирана верапамилом, приказане су на **графикону 13**. У **табели 7** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

Прекондиционарање верапамилом није довело до промена вредности прооксидационих параметара током експерименталног протокола, сем у случају O_2^- који је био значајно виши у првом минуту реперфузије у односу на остале тачке од интереса (С, Л, 30). Значајне разлике између контролне и верапамил групе забележене су у 1. минуту реперфузије, где су вредности TBARS и H_2O_2 биле ниже у верапамил групи, као и у 30. минуту реперфузије, где су вредности O_2^- и H_2O_2 такође биле ниже у верапамил групи.



Графикон 13. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у контролној и верапамил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционарања верапамилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током 30-реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 7. Ефекти прекондиционирања верапамилом на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца пацова

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO₂⁻ (nmol/ml)	O₂⁻ (nmol/ml)	H₂O₂ (nmol/ml)
контрола	С	15.02 ± 1.81	105.02 ± 8.85	40.30 ± 6.72	30.15 ± 2.54
	Л	15.21 ± 2.01	107.12 ± 8.14	43.23 ± 7.12	32.02 ± 2.32
	1	20.11 ± 1.50 ^{*#}	104.11 ± 11.37	65.01 ± 5.03 ^{*#}	42.12 ± 2.32 ^{*#}
	30	14.12 ± 1.89 [§]	95.97 ± 13.08	66.80 ± 7.40 ^{*#}	33.97 ± 2.70
верапамил	С	13.28 ± 3.13	114.28 ± 9.39	35.24 ± 7.67	25.72 ± 2.84
	Л	13.65 ± 2.19	117.75 ± 11.82	25.25 ± 7.22 ^a	25.70 ± 3.37
	1	13.76 ± 2.65 ^a	128.40 ± 10.38	104.81 ± 10.03 ^{*#}	27.27 ± 2.77 ^a
	30	13.01 ± 1.69	101.88 ± 13.88	30.45 ± 7.84 ^{§a}	22.17 ± 2.97 ^a

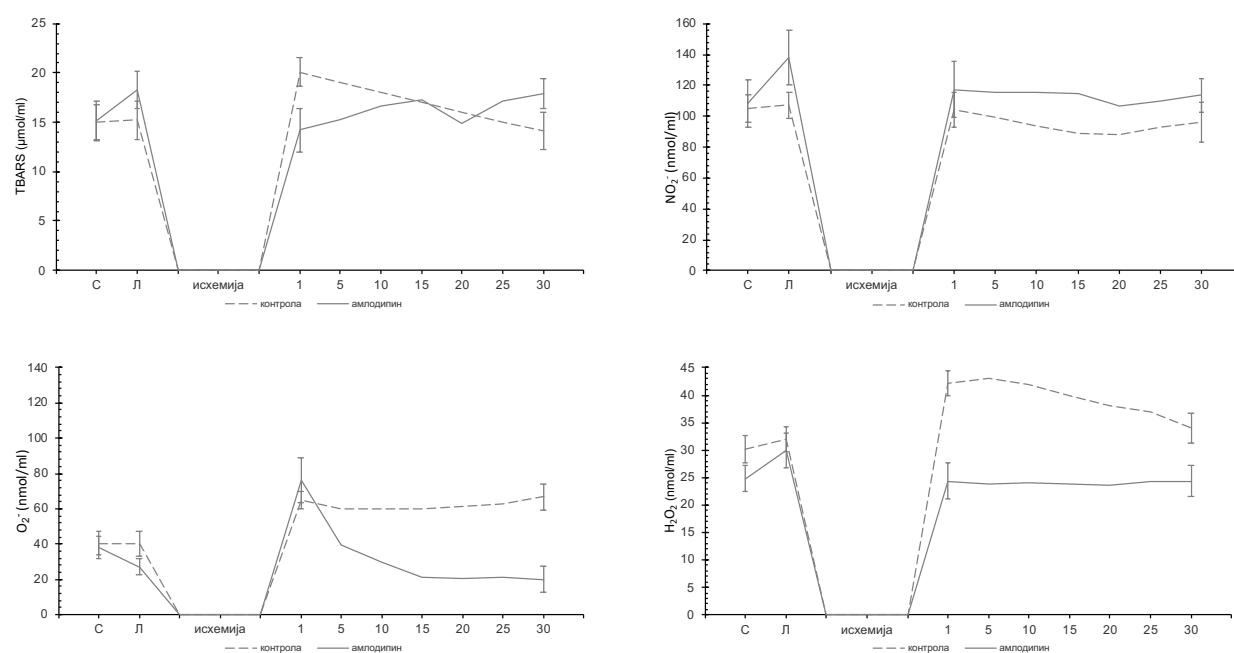
Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Лу групи (#p < 0.05); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§p < 0.05); ^aСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^ap < 0.05).

4.4.2. Ефекти прекондиционарања амлодипином

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између контролне и групе у којој су срца прекондиционарана амлодипином, приказане су на **графикону 14**. У **табели 8** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

Прекондиционарање амлодипином није довело до промена вредности прооксидационих параметара током експерименталног протокола, сем у случају супероксид анјон радикала, где су вредности O_2^- биле значајно више у првом минуту реперфузије у односу на остале тачке од интереса (С, Л, 30). Значајне разлике између контролне и амлодипин групе забележене су у 1. минуту реперфузије, где су вредности TBARS и H_2O_2 биле ниже у амлодипин групи, као и у 30. минуту реперфузије, где је вредност O_2^- такође била нижа у амлодипин групи.



Графикон 14. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у контролној и амлодипин групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционарања амлодипином (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током 30-реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 8. Ефекти прекондиционарања амлодипином на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца пацова

Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи ($p < 0.05$); #Статистички

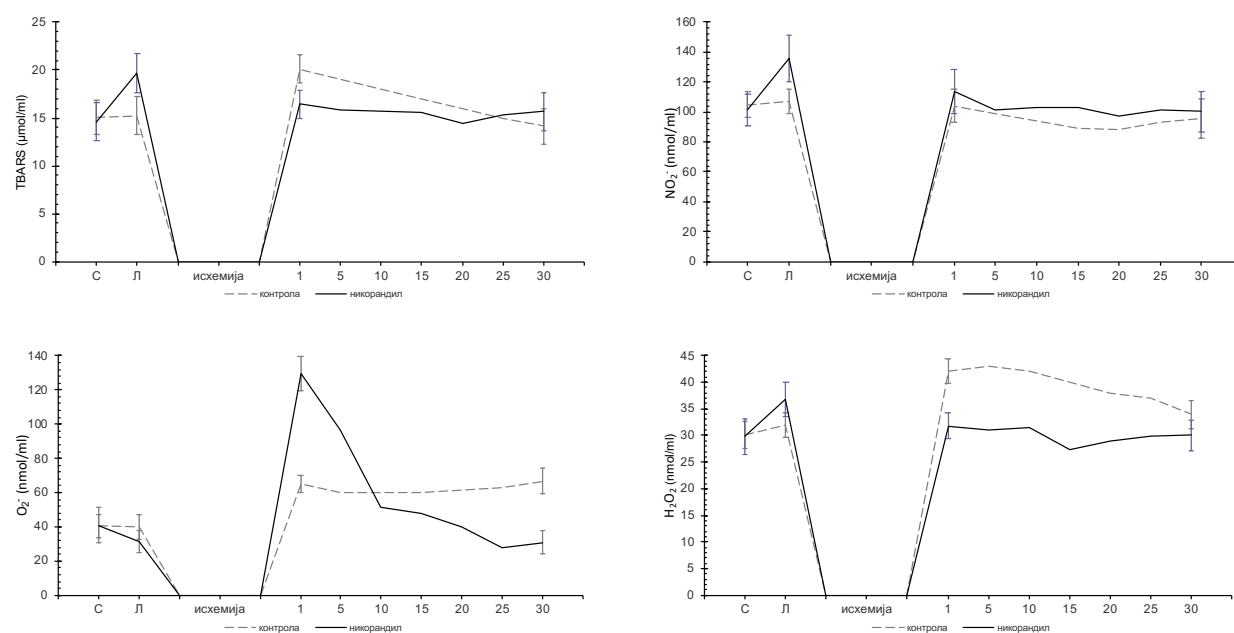
		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO₂⁻ (nmol/ml)	O₂⁻ (nmol/ml)	H₂O₂ (nmol/ml)
КОНТРОЛА	С	15.02 ± 1.81	105.02 ± 8.85	40.30 ± 6.72	30.15 ± 2.54
	Л	15.21 ± 2.01	107.12 ± 8.14	43.23 ± 7.12	32.02 ± 2.32
	1	20.11 ± 1.50*#	104.11 ± 11.37	65.01 ± 5.03*#	42.12 ± 2.32*#
	30	14.12 ± 1.89§	95.97 ± 13.08	66.80 ± 7.40*#	33.97 ± 2.70
АНГЛОДИНИН	С	15.12 ± 1.98	108.40 ± 15.33	38.05 ± 6.25	24.77 ± 2.39
	Л	18.30 ± 1.89	138.10 ± 17.66	27.11 ± 4.87	29.97 ± 3.23
	1	14.20 ± 2.15 ^a	117.49 ± 17.91	76.16 ± 12.60*#	24.36 ± 3.36 ^a
	30	17.96 ± 1.50	113.50 ± 11.00	19.80 ± 7.43 ^{§a}	24.37 ± 2.92

значајна разлика у односу на тачку Лу групи (# $p < 0.05$); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§ $p < 0.05$); ^aСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^a $p < 0.05$).

4.4.3. Ефекти прекондиционарања никорандилом

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између контролне и групе у којој су срца прекондиционарана никорандилом, приказане су на **графикону 15**. У **табели 9** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

Прекондиционарање никорандилом није довело до значајних промена вредности прооксидационих параметара током експерименталног протокола, сем у случају супероксид анјон радикала, где су вредности O_2^- биле значајно више у првом минуту реперфузије у односу на остале тачке од интереса (С, Л, 30). Значајне разлике између контролне и амлодипинин групе забележене су у 1. минуту реперфузије, где су вредности TBARS и H_2O_2 биле ниже, а вредност O_2^- била виша у никорандил групи. У 30. минуту реперфузије вредност O_2^- је била нижа у никорандил групи, док је након петоминутног прекондиционарања никорандилом дошло до значајног повећања H_2O_2 у односу на контролну групу.



Графикон 15. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у контролној и никорандил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционарања никорандилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током 30-реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 9. Ефекти прекондиционарања никорандилом на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца пацова

Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

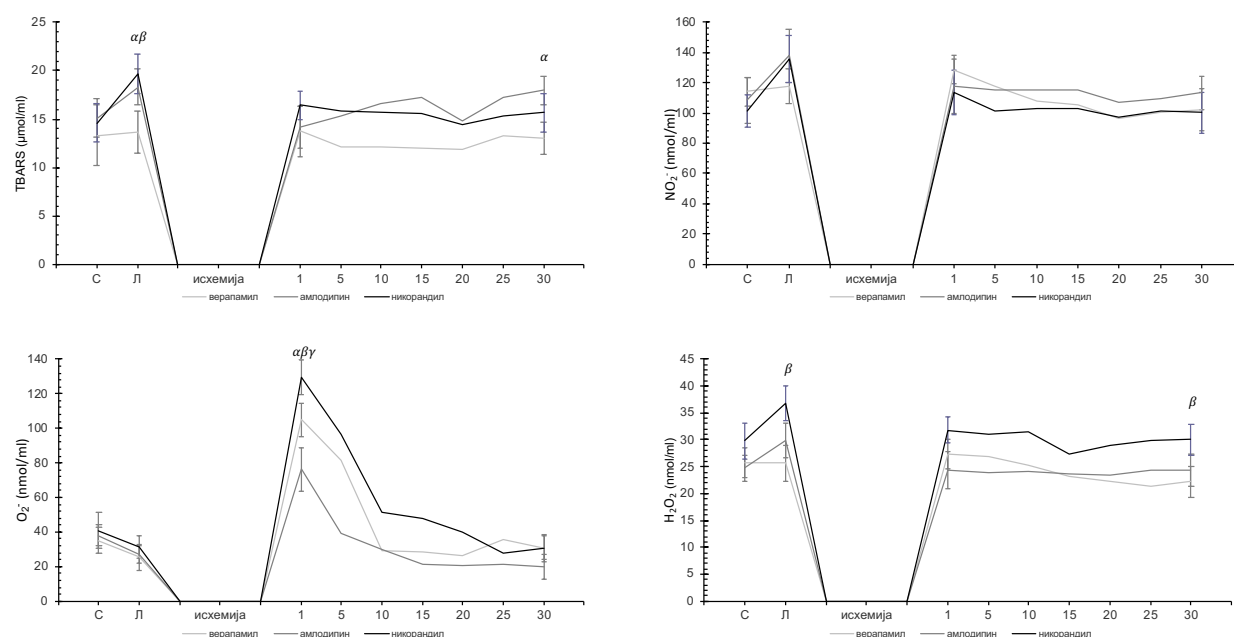
		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO₂⁻ (nmol/ml)	O₂⁻ (nmol/ml)	H₂O₂ (nmol/ml)
контрола	С	15.02 ± 1.81	105.02 ± 8.85	40.30 ± 6.72	30.15 ± 2.54
	Л	15.21 ± 2.01	107.12 ± 8.14	43.23 ± 7.12	32.02 ± 2.32
	1	20.11 ± 1.50 ^{*#}	104.11 ± 11.37	65.01 ± 5.03 ^{*#}	42.12 ± 2.32 ^{*#}
	30	14.12 ± 1.89 [§]	95.97 ± 13.08	66.80 ± 7.40 ^{*#}	33.97 ± 2.70
никорандил	С	14.60 ± 2.01	101.41 ± 10.59	40.98 ± 10.14	29.83 ± 3.30
	Л	19.67 ± 2.02	135.67 ± 15.50	31.28 ± 6.53	36.81 ± 3.20 ^a
	1	16.42 ± 1.53 ^a	113.59 ± 14.58	129.57 ± 10.10 ^{*#a}	31.82 ± 2.37 ^a
	30	15.67 ± 1.98	100.13 ± 13.46	30.65 ± 6.77 ^{§a}	30.01 ± 2.94

Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи ($p < 0.05$); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Лу групи (# $p < 0.05$); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§ $p < 0.05$); ^aСтатистички значајна разлика у односу на контролну групу у истој тачки (^a $p < 0.05$).

4.4.4. Промене прооксидационих параметара у односу на акутно примењен фармаколошки агенс

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара у ефлуенту изолованог срца пацова у односу на акутно примењен фармаколошки агенс верапамил, амлодипин или никорандил, приказане су на **графикону 16**.

Вредности TBARS су биле значајно ниже непосредно након перфундовања верапамила, него након амлодипина или никорандила. Исти параметар је такође био нижи у верапамил у односу на амлодипин групу у 30. минути реперфузије. Значајне разлике у 1. минути реперфузије у вредностима O_2^- забележене су у свим испитиваним групама при чему је највиша вредност забележена у никорандил, а најнижа у амлодипин групи. Вредности H_2O_2 биле су више у никорандил у односу на верапамил групу у тачкама Л и 30.



Графикон 16. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) мерени у тачки стабилизације (С), након прекодиционарања (Л), као и на сваких пет минута током 30. минутне реперфузије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. α Статистички значајна разлика између верапамил и амлодипин групе ($\alpha p < 0.05$); β Статистички значајна разлика између верапамил и никорандил групе ($\beta p < 0.05$); γ Статистички значајна разлика између амлодипин и никорандил групе ($\gamma p < 0.05$).

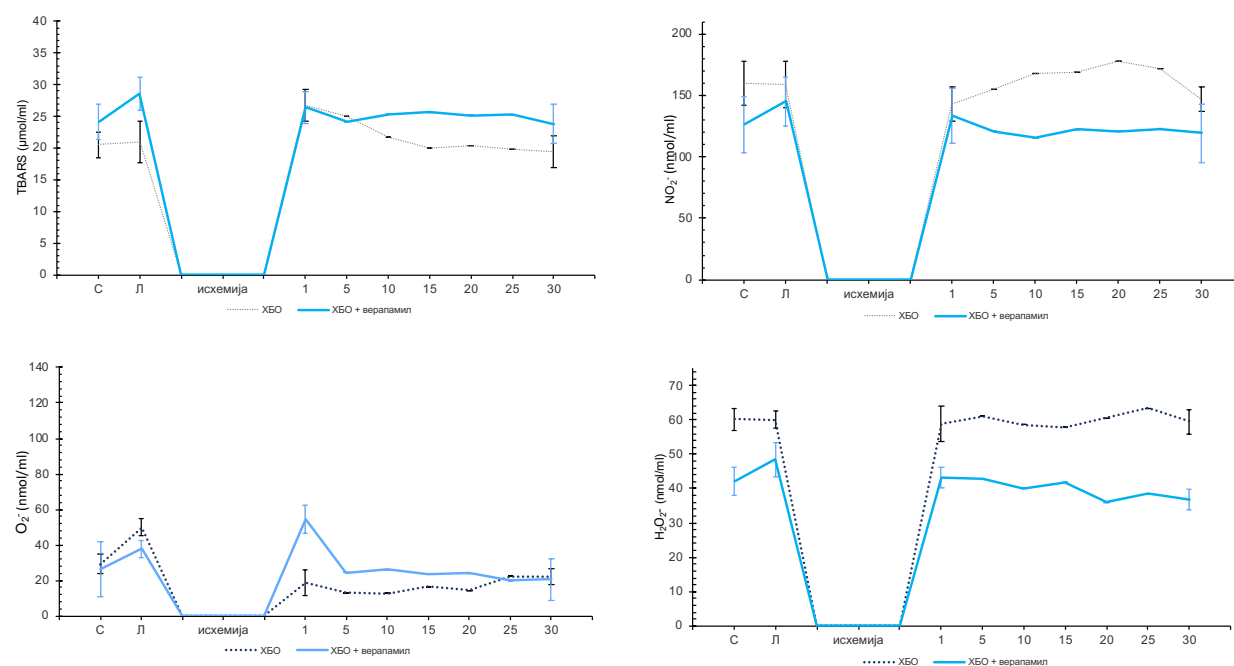
4.5. Ефекти комбиновања два маневра прекондиционирања на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца пацова

4.5.1. Ефекти комбинованог прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и верапамилом

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између ХБО и ХБО + верапамил групе, приказане су на **графикону 17**. У **табели 10** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

Вредности мерених прооксидационих параметара биле су сличне у свим испитиваним тачкама од интереса у ХБО + верапамил групи, сем у случају O_2^- који је био значајно виши у првом минуту реперфузије у односу на С и 30. минут реперфузије.

Вредности O_2^- у 1. минуту реперфузије биле су статистички значајно више у ХБО + верапамил у односу на ХБО групу, док је H_2O_2 током експеримента био виши у ХБО групи.



Графикон 17. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻, H₂O₂) у ХБО и ХБО + верапамил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционирања верапамилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током 30. минутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 10. Ефекти комбиннованог прекодиционирања ХБО и верапамилом на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца пацова

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO₂⁻ (nmol/ml)	O₂⁻ (nmol/ml)	H₂O₂ (nmol/ml)
ХБО	С	20.48 ± 2.08	159.98 ± 18.05	29.34 ± 5.58	60.12 ± 3.21
	Л	21.03 ± 3.32	158.97 ± 19.01	49.98 ± 5.01	59.97 ± 2.50
	1	26.79 ± 2.55 ^{*#}	143.10 ± 14.01	18.79 ± 7.04	58.80 ± 5.09
	30	19.45 ± 2.56 ^{*#}	146.74 ± 10.05 [§]	22.03 ± 4.59	59.41 ± 3.45
ХБО + верапамил	С	24.86 ± 2.81	126.16 ± 22.76	26.54 ± 15.57	42.21 ± 4.04 ^a
	Л	28.66 ± 2.60	145.38 ± 19.84	37.73 ± 5.02	48.38 ± 5.01 ^a
	1	26.39 ± 2.46	133.40 ± 22.35	54.79 ± 8.03 ^{*a}	43.10 ± 2.97 ^a
	30	23.80 ± 3.05	119.60 ± 23.92	20.49 ± 11.94 [§]	36.72 ± 3.12 ^a

Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

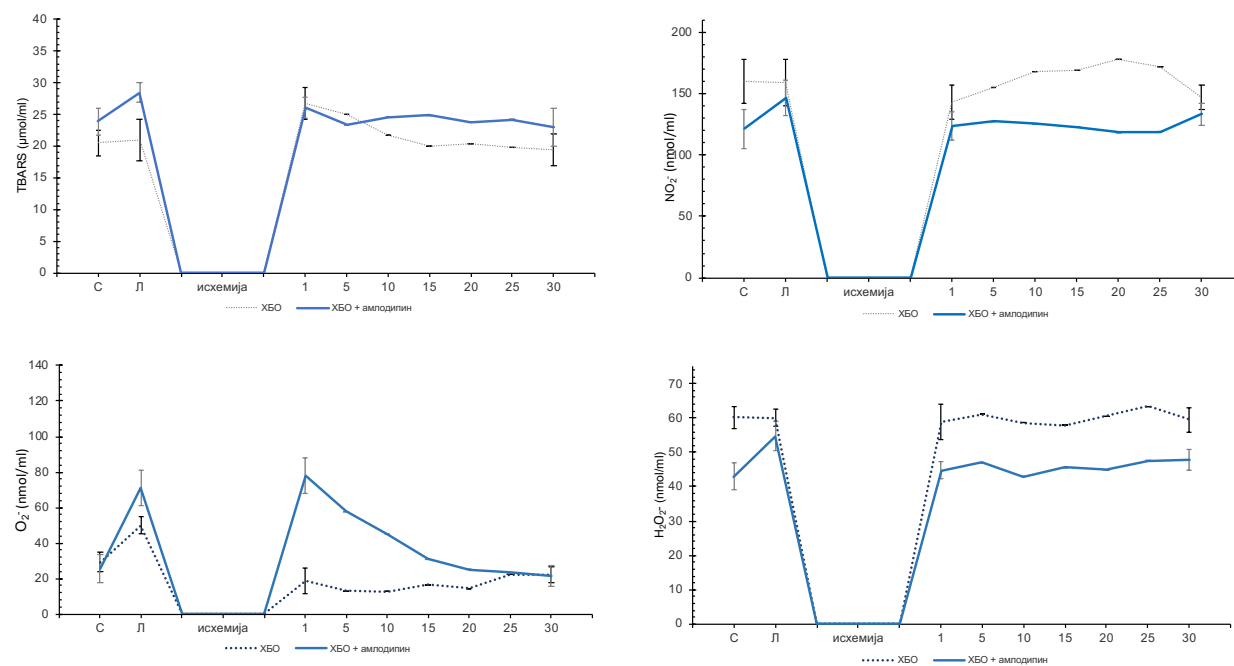
Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи ($p < 0.05$); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи (# $p < 0.05$); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§ $p < 0.05$); ^aСтатистички значајна разлика у односу на ХБО групу у истој тачки (^a $p < 0.05$).

4.5.2. Ефекти комбинованог прекоксидационог хипербаричног оксигенацијом и амлодипином

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између ХБО и ХБО + амлодипин групе, приказане су на **графикону 18**. У **табели 11** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

Вредности мерених прооксидационих параметара биле су сличне у свим испитиваним тачкама од интереса у ХБО + амлодипин групи, сем у случају O_2^- који је био значајно виши у тачкама Л и 1 у односу на С и 30.

Вредности O_2^- у 1. минуту реперфузије биле су статистички значајно више у ХБО + амлодипин у односу на ХБО групу, док је H_2O_2 током читавог експерименталног протокола био виши у ХБО групи.



Графикон 18. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у ХБО и ХБО + амлодипин групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекоксидационог верапамилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током 30. минутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 11. Ефекти комбиннованог прекодиционирања ХБО и амлодипином на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца пацова

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO₂⁻ (nmol/ml)	O₂⁻ (nmol/ml)	H₂O₂ (nmol/ml)
ХБО	С	20.48 ± 2.08	159.98 ± 18.05	29.34 ± 5.58	60.12 ± 3.21
	Л	21.03 ± 3.32	158.97 ± 19.01	49.98 ± 5.01	59.97 ± 2.50
	1	26.79 ± 2.55 ^{*#}	143.10 ± 14.01	18.79 ± 7.04	58.80 ± 5.09
	30	19.45 ± 2.56 ^{*#}	146.74 ± 10.05 [§]	22.03 ± 4.59	59.41 ± 3.45
нишлдогити + ХБО	С	23.95 ± 2.13	121.16 ± 15.93	25.82 ± 8.04	42.99 ± 3.96 ^a
	Л	28.43 ± 1.56	146.56 ± 14.26	71.82 ± 9.97 [*]	54.66 ± 4.21 ^a
	1	26.04 ± 1.65	123.42 ± 11.22	78.15 ± 10.07 ^{*#a}	44.73 ± 2.49 ^a
	30	22.95 ± 3.04	133.26 ± 9.02	21.56 ± 6.13 [§]	47.69 ± 3.02 ^a

Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

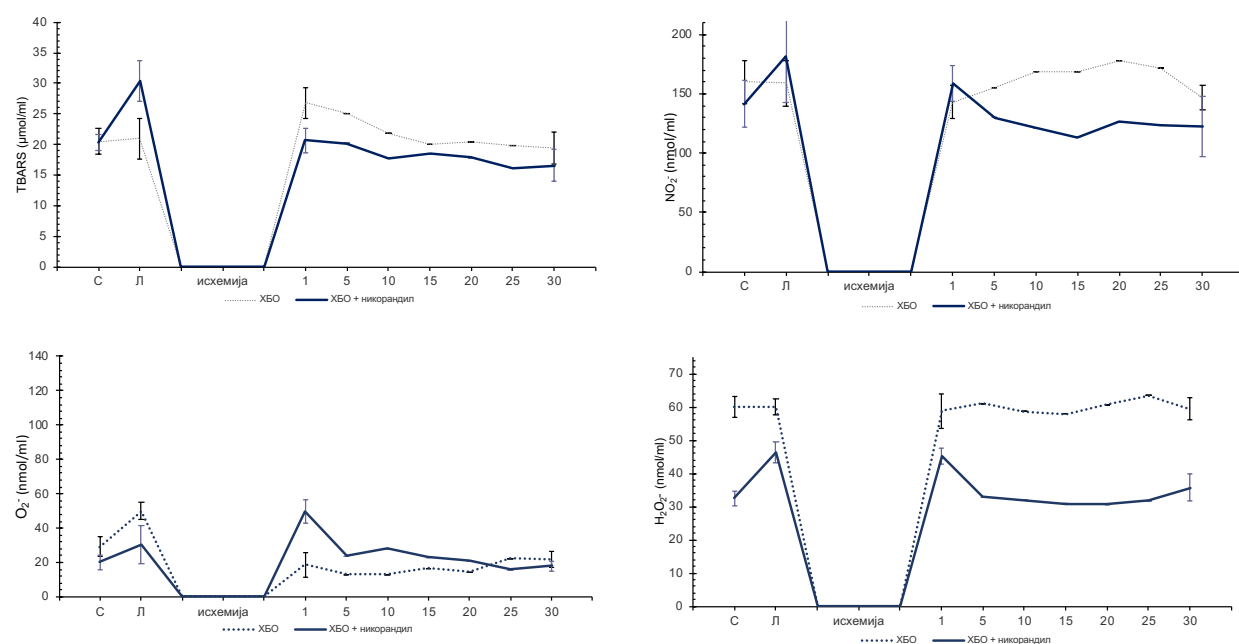
*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); #Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи (#p < 0.05); §Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи (§p < 0.05); ^aСтатистички значајна разлика у односу на ХБО групу у истој тачки (^ap < 0.05).

4.5.3. Ефекти комбинованог прекодиционирања хипербаричном оксигенацијом и никорандилом

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између ХБО и ХБО + никорандил групе, приказане су на **графикону 19**. У **табели 12** представљене су статистички значајне разлике између тачки од интереса у групи и између ове две групе.

Вредности TBARS биле су статистички значајно више након перфундовања никорандила у односу на остале тачке од интереса у ХБО + никорандил групи. NO_2^- су били значајно виши у Л тачки и значајно нижи на самом крају експеримента у односу на остале тачке од интереса, док је O_2^- био значајно виши у 1. минути реперфузије и значајно нижи у 30. минути. Вредности H_2O_2 биле су статистички значајно ниже у тачкама С и 30 у односу на преостале две тачке од интереса.

Вредност TBARS у Л тачки, као и O_2^- у 1. минути реперфузије биле су статистички значајно више у ХБО + никорандил групи у односу на ХБО групу, док је H_2O_2 током читавог експерименталног протокола био виши у ХБО групи.



Графикон 19. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у ХБО и ХБО + никорандил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекодиционирања верапамилом (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током 30. минутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије.

Табела 12. Ефекти комбиннованог прекодиционирања ХБО и никорандилом на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца пацова

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO₂⁻ (nmol/ml)	O₂⁻ (nmol/ml)	H₂O₂ (nmol/ml)
ХБО	С	20.48 ± 2.08	159.98 ± 18.05	29.34 ± 5.58	60.12 ± 3.21
	Л	21.03 ± 3.32	158.97 ± 19.01	49.98 ± 5.01	59.97 ± 2.50
	1	26.79 ± 2.55* [#]	143.10 ± 14.01	18.79 ± 7.04	58.80 ± 5.09
	30	19.45 ± 2.56* [#]	146.74 ± 10.05 [§]	22.03 ± 4.59	59.41 ± 3.45
никорандил + ХБО	С	20.36 ± 1.25	141.55 ± 20.02	20.26 ± 4.40	32.49 ± 2.11 ^a
	Л	30.32 ± 3.29* ^a	181.40 ± 38.89 [*]	30.25 ± 11.12 [*]	46.46 ± 2.98* ^a
	1	20.69 ± 1.99 [#]	158.60 ± 15.01 [#]	49.89 ± 6.63* ^{#a}	45.20 ± 2.39* ^a
	30	16.59 ± 2.56 [#]	122.46 ± 25.58* ^{#§}	18.05 ± 2.97 ^{#§}	35.69 ± 4.04 ^{#§a}

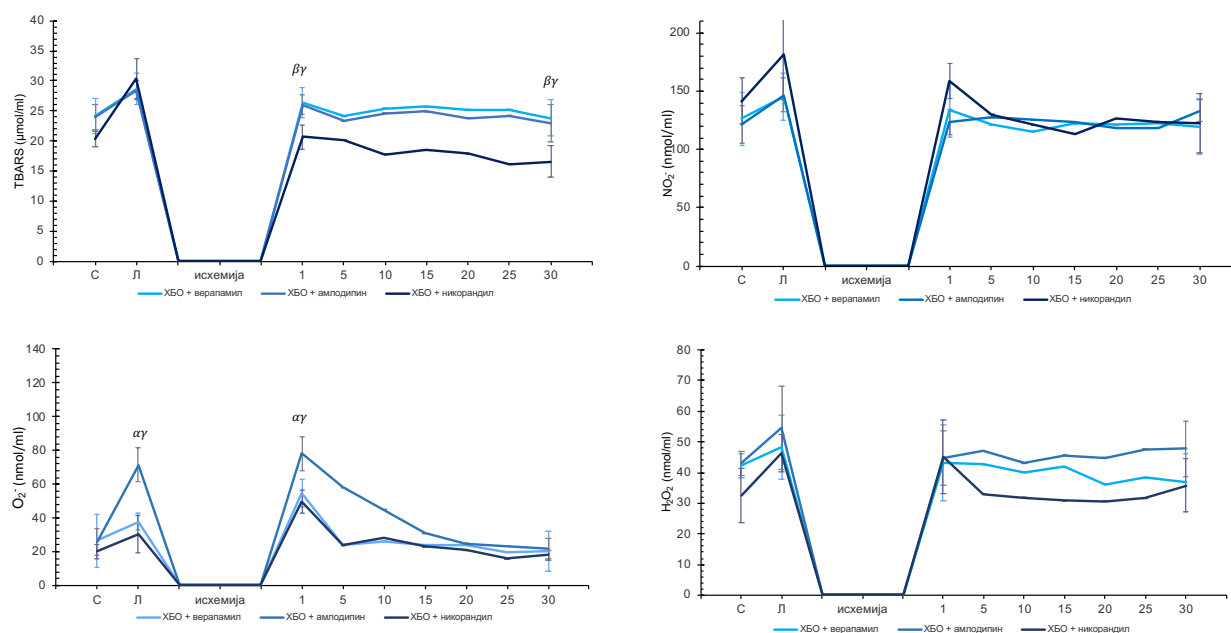
Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација.

*Статистички значајна разлика у односу на тачку С у групи (*p < 0.05); [#]Статистички значајна разлика у односу на тачку Л у групи ([#]p < 0.05); [§]Статистички значајна разлика у односу на тачку 1 у групи ([§]p < 0.05); ^aСтатистички значајна разлика у односу на ХБО групу у истој тачки (^ap < 0.05).

4.5.4. Промене прооксидационих параметара у ХБО групи у односу на акутно примењен фармаколошки агенс

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара у ефлуенту изолованог срца пацова у у групи пацова која је била изложена ХБО у односу на акутно примењен фармаколошки агенс верапамил, амлодипин или никорандил, приказане су на **графикону 20**.

Вредности TBARS су биле значајно ниже у ХБО + никорандил групи, током периода реперфузије. Са друге стране вредности O_2^- биле су значајно више након перфундовања амлодипина и у првом минуту реперфузије, али су се до краја реперфузије вредности изједначиле са друге две групе.



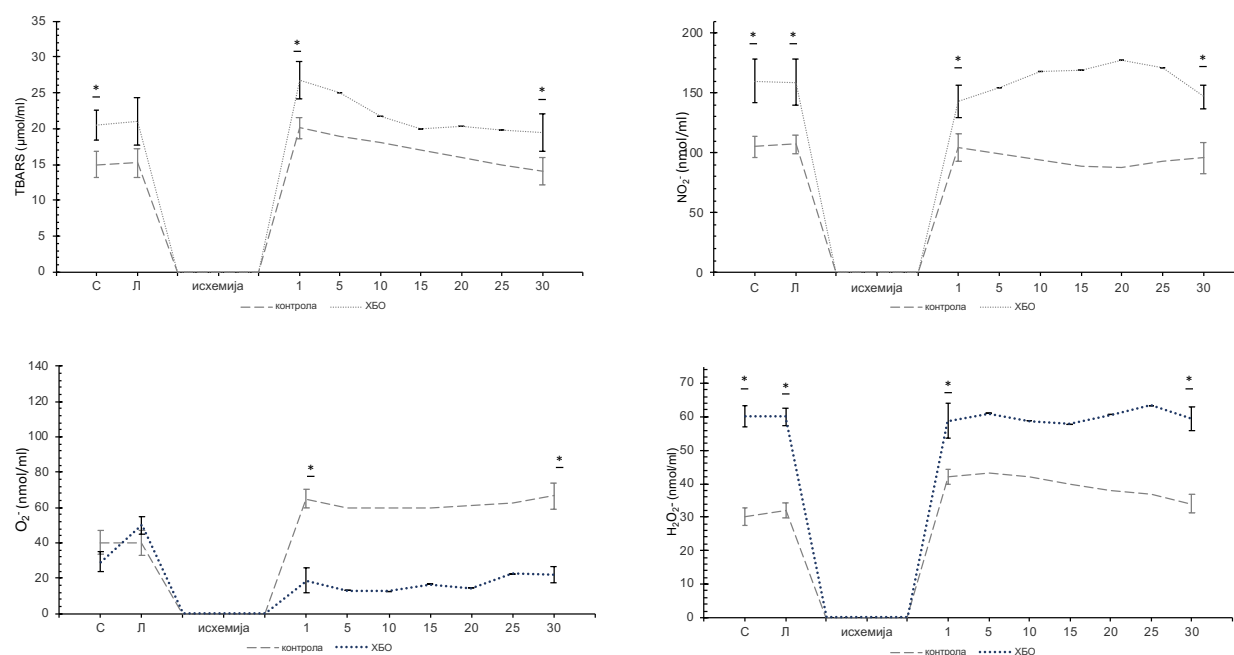
Графикон 20. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻, H₂O₂) мерени у тачки стабилизације (С), након прекодиционарања (Л), као и на сваких пет минута током 30. минутне реперфузије. Вредности су приказане као X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. α Статистички значајна разлика између ХБО + верапамил и ХБО + амлодипин групе ($\alpha p < 0.05$); β Статистички значајна разлика између ХБО + верапамил и ХБО + никорандил групе ($\beta p < 0.05$); γ Статистички значајна разлика између ХБО + амлодипин и ХБО + никорандил групе ($\gamma p < 0.05$).

4.6. Компарација прооксидационих параметара у ефлуенту изолованог срца пацова између фармаколошког и комбинованог прекондиционирња

4.6.1. Поређење ефеката прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и контролне групе

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између групе пацова која није била изложена прекондиционарању и групе пацова која је била изложена прекондиционарању у хипербаричној комори, приказане су на **графикону 21**.

Вредности TBARS, NO_2^- и H_2O_2 биле су статистички значајно више у ХБО у односу на контролну групу током *ex vivo* експерименталног периода. Супротно томе O_2^- је био нижи у ХБО групи током периода реперфузије.

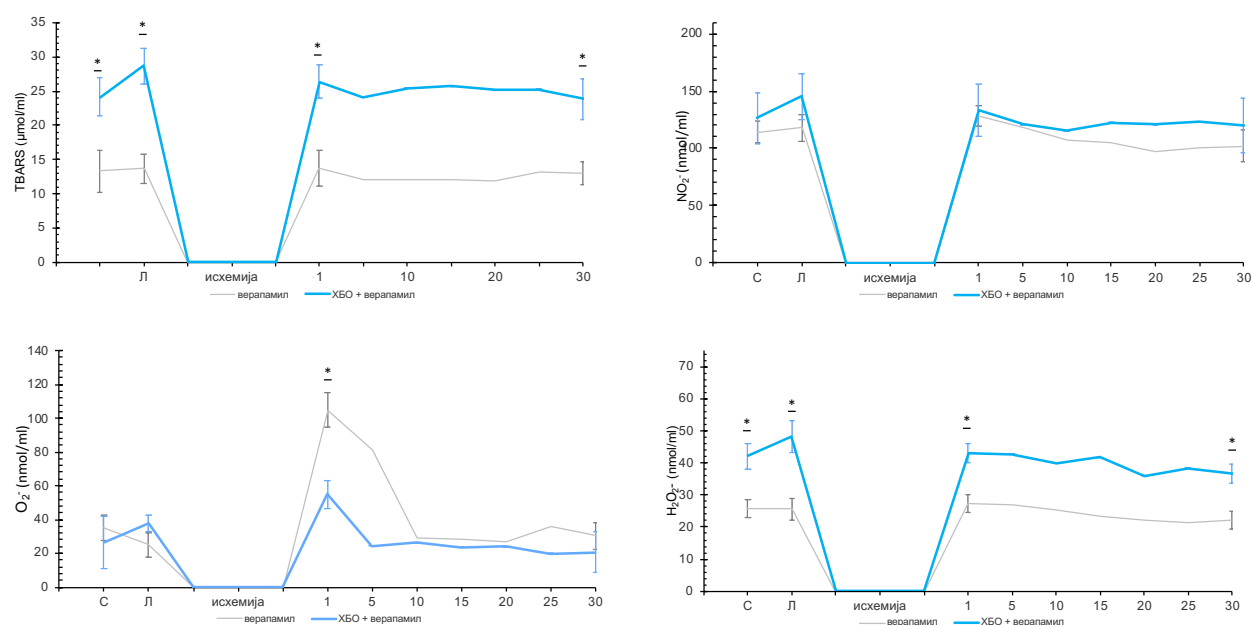


Графикон 21. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у контролној и ХБО групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционарања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. *Статистички значајна разлика између контролне и ХБО групе (* $p < 0.05$).

4.6.2. Поређење ефеката прекондиционарања верапамилом и комбинованог прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и верапамилом

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између групе пацова која је била изложена прекондиционарању верапамилом и групе пацова која је била изложена прекондиционарању и у хипербаричној комори и верапамилом, приказане су на **графикону 22**.

Вредности TBARS и H_2O_2 биле су статистички значајно више у ХБО + верапамил у односу на верапамил групу током акутног протокола на *Langendorff*-у. Супротно томе O_2^- је био виши у верапамил групи у 1. минути реперфузије.

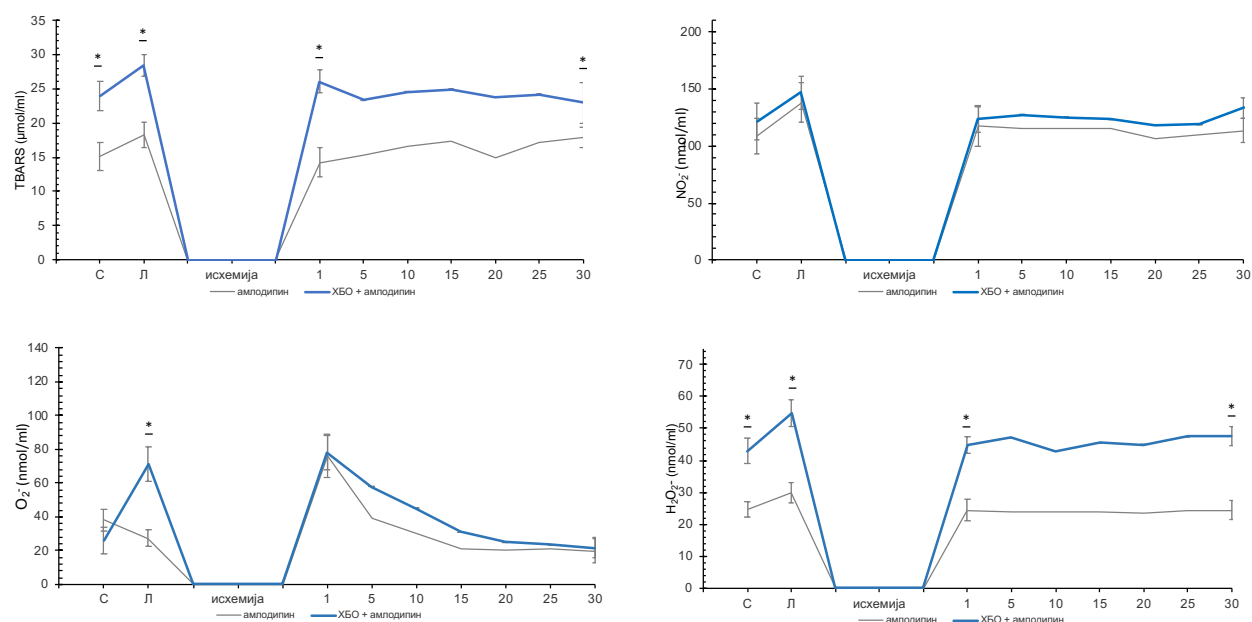


Графикон 22. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у верапамил и ХБО + верапамил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционарања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. *Статистички значајна разлика између верапамил и ХБО + верапамил групе (* $p < 0.05$).

4.6.3. Поређење ефеката прекондиционирања амлодипином и комбинованог прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом и амлодипином

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између групе пацова која је била изложена прекондиционирању амлодипином и групе пацова која је била изложена прекондиционирању и у хипербаричној комори и амлодипином, приказане су на **графикону 23**.

Вредности TBARS и H_2O_2 биле су статистички значајно више у ХБО + амлодипин у односу на амлодипин групу током акутног протокола на *Langendorff*-овом апарату такође, O_2^- је био виши у ХБО + амлодипин групи непосредно након перфундовања амлодипина.

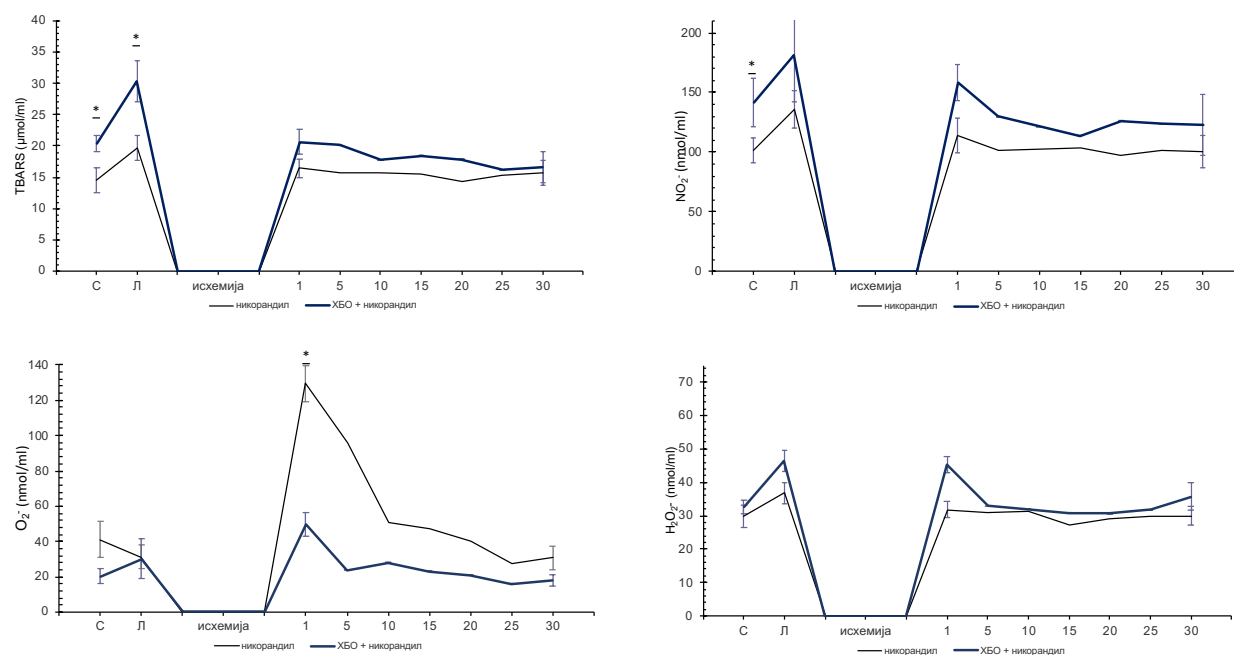


Графикон 23. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у амлодипин и ХБО + амлодипин групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекондиционирања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. *Статистички значајна разлика између амлодипин и ХБО + амлодипин групе (* $p < 0.05$).

4.6.4. Поређење ефеката прекоиндиционарања никорандилом и комбинаваног прекоиндиционарања хипербаричном оксигенацијом и никорандилом

Разлике у вредностима испитиваних прооксидационих параметара између групе пацова која је била изложена прекоиндиционарању никорандилом и групе пацова која је била изложена прекоиндиционарању и у хипербаричној комори и никорандилом, приказане су на **графикону 24**.

Вредности TBARS биле су статистички значајно више у ХБО + никорандил у односу на никорандил групу у тачкама С и Л, док су вредности нитрита биле више само у тачки стабилизације. O_2^- је био нижи у ХБО + никорандил групи у првом минуту реперфузије.



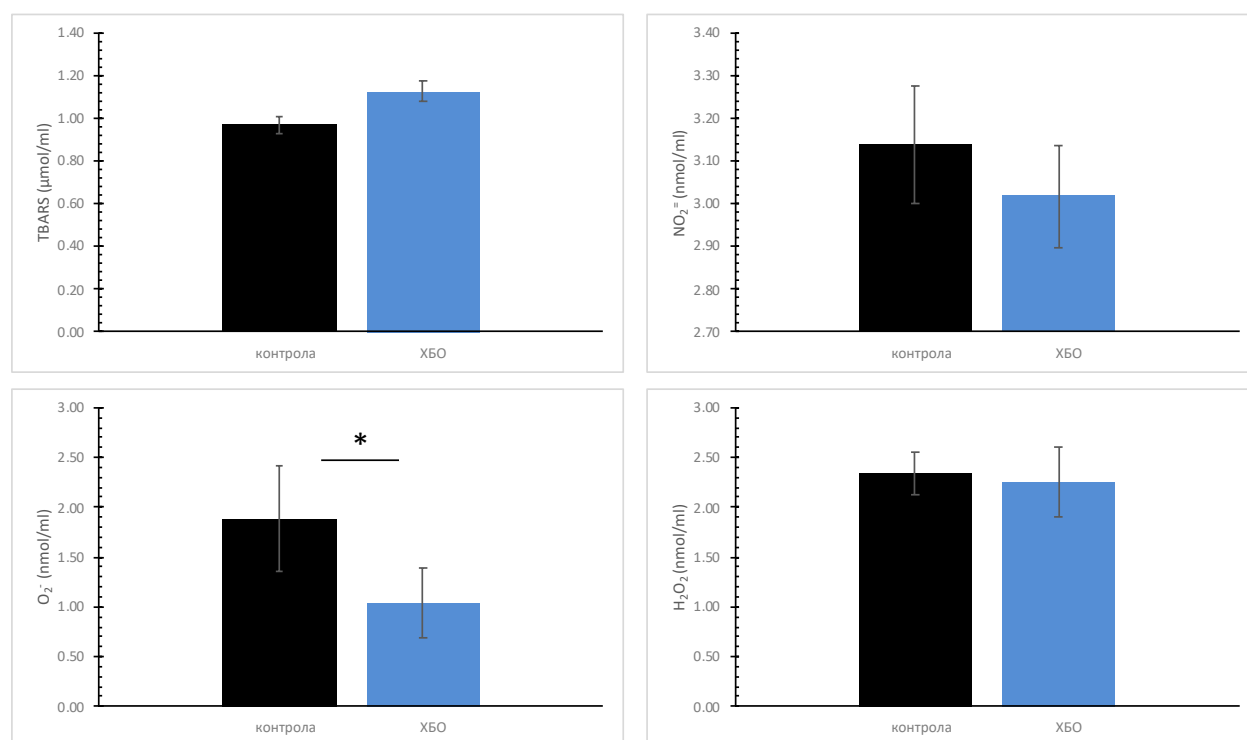
Графикон 24. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у никорандил и ХБО + никорандил групи мерени у тачки стабилизације (С), након петоминутног прекоиндиционарања (Л), у првом (1), као и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије, а након двадесетоминутне исхемије. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. *Статистички значајна разлика између никорандил и ХБО + никорандил групе (* $p < 0.05$).

4.7. Ефекти ХБО на системске параметре оксидационог стреса

4.7.1. Ефекти ХБО на прооксидационе маркере мерене у крви пацова

На **графикону 25** приказани су нивои прооксидационих маркера (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) мерени у плазми контролне групе пацова и пацова који су били изложени четворо-недељном третману у хипербаричној комори.

Концентрације мерених параметара прооксидационих маркера биле су сличне у обе групе, сем супероксид анјон радикала који је био статистчки значајно нижи у групи пацова који су били изложени ХБО у односу на групу пацова која није била изложена овом виду прекондиционирања.

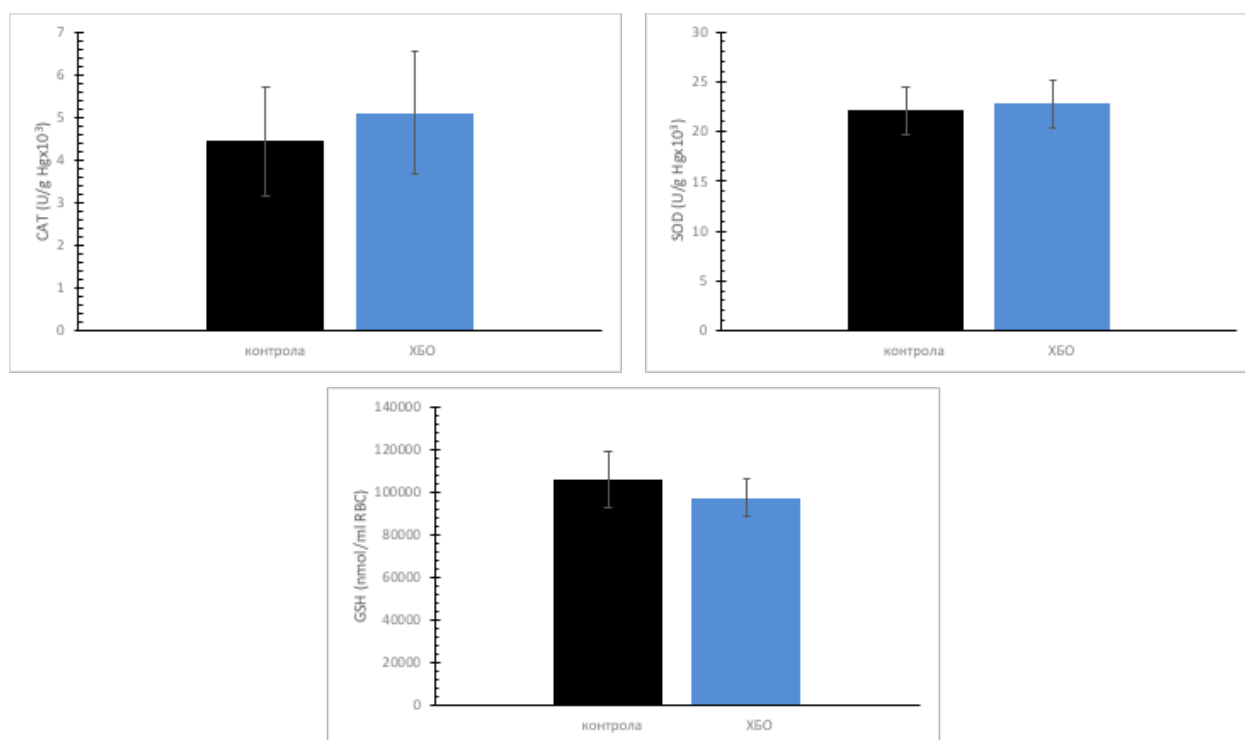


Графикон 25. Нивои параметара оксидационог стреса (TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) у контролној и групи пацова који су били изложени ХБО. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, $*p < 0,05$.

4.7.2. Ефекти ХБО на антиоксидационе маркере мерене у крви пацова

На **графикону 26** приказани су нивои анти-оксидационих маркера (CAT, SOD, GSH) мерени у плазми контролне групе пацова и пацова који су били изложени четворо-недељном третману у хипербаричној комори.

Вредности мерених антиоксидационих маркера нису биле статистички значајно промењене у групи пацова који су били изложени тронедељном третману ХБО и контролној групи пацова.



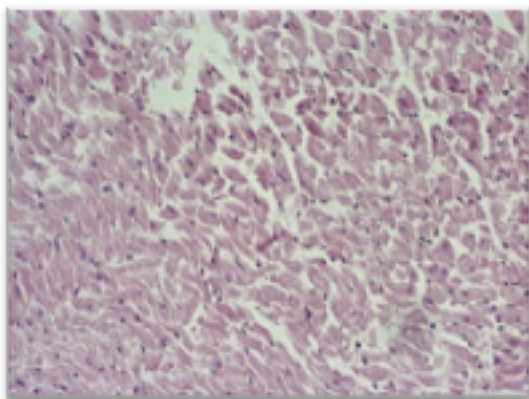
Графикон 26. Нивои антиоксидационих параметара (CAT, SOD, GSH) у контролној и групи пацова који су били изложени ХБО. Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, $*p < 0,05$.

4.8. Ефекти различитих маневара прекондиционарања на грађу миокарда пацова

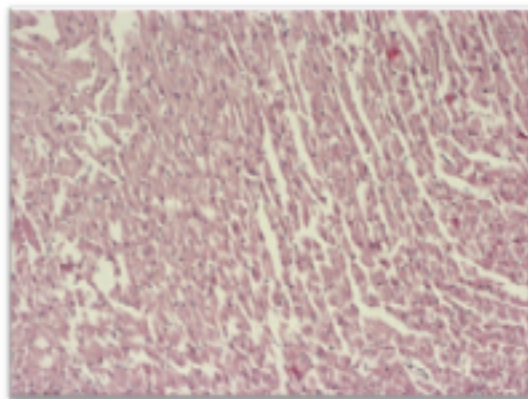
4.8.1. Ефекти фармаколошког прекондиционарања

Очуваност грађе миокарда пацова након фармаколошког прекондиционарања верапамилом, амлодипином или никорандилом, као и у контролној групи (чија срца нису прекондиционарана, али су била подвргнута исхемији и реперфузији) испитивани су Н&Е бојењем ћелија, при чему је увећање било 400 x (бар = 50µm).

Грађа миокарда у контролној групи пацова приказана је на **сликама 2 и 3**. На овим сликама јасно се уочава присуство едема, фрагментација влакана, хиперезинофилија цитоплазме и некроза. Такође, умерено су присутне и хиперемije, промене на једрима, таласаста влакна као и запаљенска инфилтрација. Пикноза једара је присутна, али у нешто лакшем облику у овој групи.

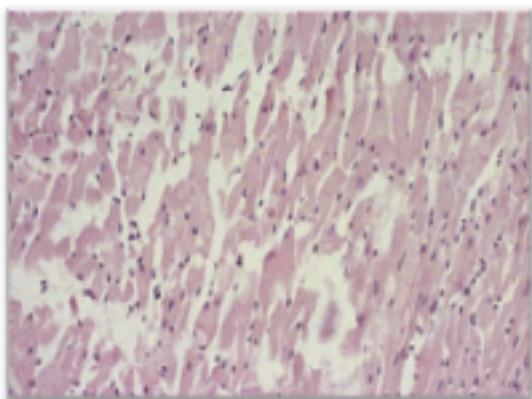


Слика 2. Контролна група

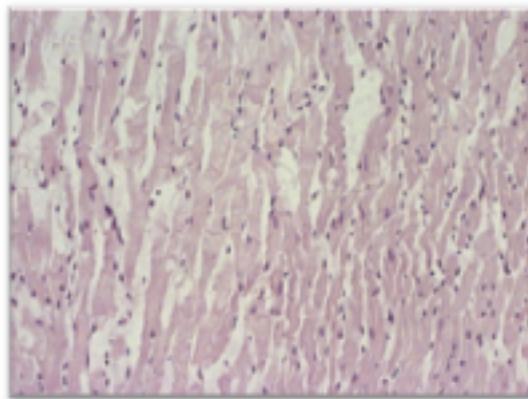


Слика 3. Контролна група

Грађа миокарда у верапамил групи пацова приказана је на **сликама 4 и 5**. На овим сликама уочава се присуство фрагментације влакана и некрозе. Такође, умерено су присутни едеми, хиперемија, хипереозинофилија, контракционе траке као и запаљенска инфилтрација. У лакшем облику у верапамил групи се запажају и промене једара, као и таласаста влакна.

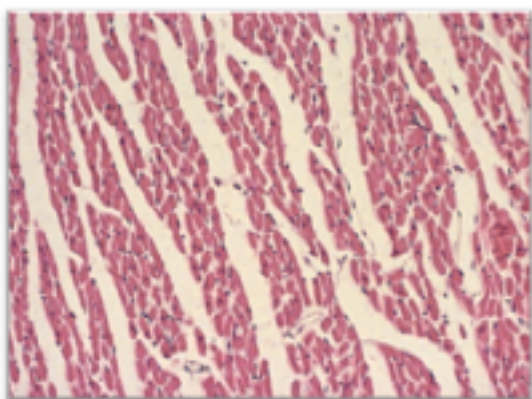


Слика 4. Верапамил група

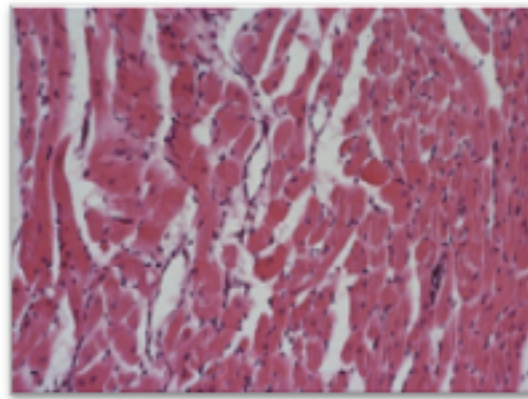


Слика 5. Верапамил група

Грађа миокарда у амлодипин групи пацова приказана је на **сликама 6 и 7**. На овим сликама најкарактеристичније је присуство хипереозинофилије цитоплазме и запаљенска инфилтрација. Такође, умерено је присутна фрагментација влакана и некроза, као и едеми, хиперемије и промене једара.

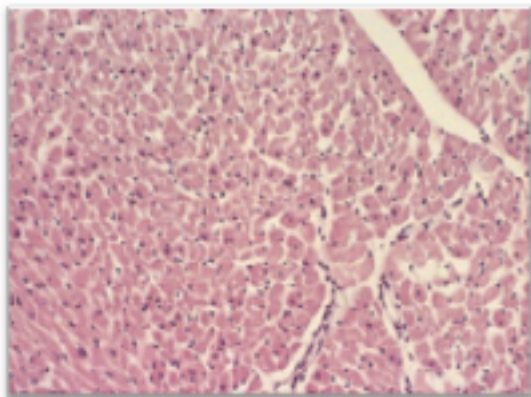


Слика 6. Амлодипин група

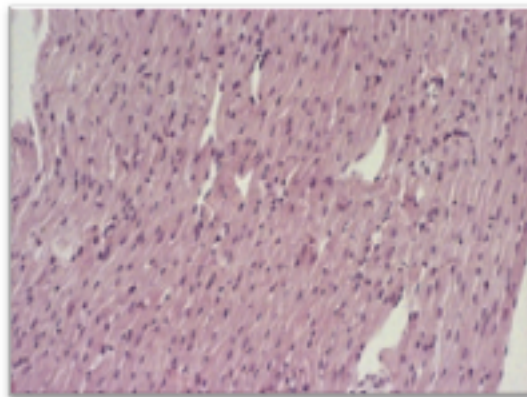


Слика 7. Амлодипин група

Грађа миокарда у никорандил групи пацова приказана је на **сликама 8 и 9**. На овим сликама најкарактеристичније је присуство некрозе, а у мањој мери су присутне вакуоларне дегенерације и хипереозинофилија цитоплазме као и едеми, хиперемије, таласаста и фрагментисана влакна.



Слика 8. Никорандил група



Слика 9. Никорандил група

На основу Н&Е бојења процењивано је оштећење миокарда. Параметри за оцену оштећења миокарда су били: едем, хиперемија, промене на једру, пикноза, вакуоларна дегенерација, таласаста влакна, фрагментација влакана, хипереозинофилија цитоплазме, контракционе траке, некроза, запањенска инфилтрација, екстравазација. На основу присуства ових параметара даване су оцене према следећим критеријумима: 0 – без промена; 1 – благе (лаке) промене; 2 – умерене промене; 3 – тешке промене. Просечна оцена на основу присуства патоморфолошких промена у миокарду пацова у групама пацова чија су срца прекондиционирана неким од испитиваних фармаколошких агенаса (верапамил, амлодипин, никорандил) приказана је у **табели 13**.

Табела 13. Нивои патохистолошких промена на миокарду у контролној, верапамил, амлодипин и никорандил групи.

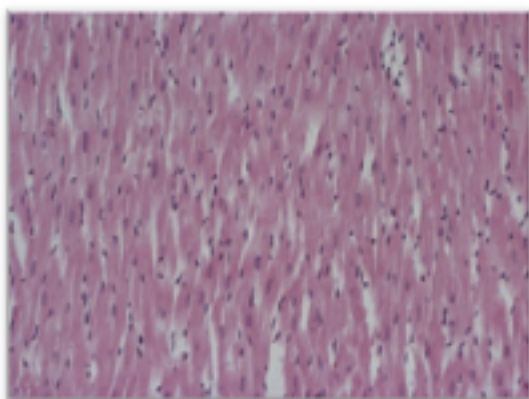
Патохистолошке промене	Контрола	Верапамил	Амлодипин	Никорандил
Едем	3,0	2,0	1,5	1,5
Хиперемија	2,0	2,0	1,5	1,5
Промене на једру	2,0	1,0	1,5	0,5
Пикноза	1,5	1,0	1,0	1,0
Вакуоларна дегенерација	0	0,5	1,0	2,0
Таласаста влакна	2,0	1,0	1,0	1,5
Фрагментација влакана	3,0	2,5	2,0	1,5
Хипереозинофилија цитоплазме	3,0	1,5	2,5	2,0
Контракционе траке	0	1,5	0	0
Некроза	3,0	2,5	2,0	2,5
Запаљенска инфилтрација	2,0	2,0	2,5	1,0
Екстравазација	1,0	0	0	0
Збир	22,5	17,5	16,5	15,0

Патохистолошке промене су оцењиване од 0-3 према споменутим критеријумима, а у табели су приказане средње вредности, заокружене на 0,5.

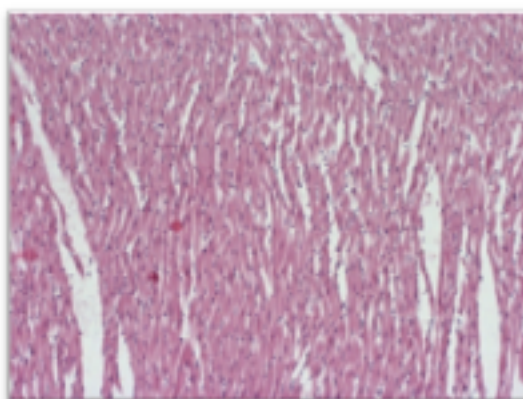
4.8.2. Ефекти комбинованог преконачионирања (ХБО + фармаколошки агенс)

Очуваност грађе миокарда пацова након ХБО и фармаколошког преконачионирања верапамилом, амлодипином или никорандилом, као и у ХБО групи испитивани су Н&Е бојењем ћелија, при чему је увећање било 400 x (бар = 50µm).

Грађа миокарда у ХБО групи пацова приказана је на **сликама 10 и 11**. На овим сликама јасно се уочава присуство едема. Такође, умерено су присутне и хиперемије, хипереозинофилија цитоплазме и запаљенска инфилтрација.

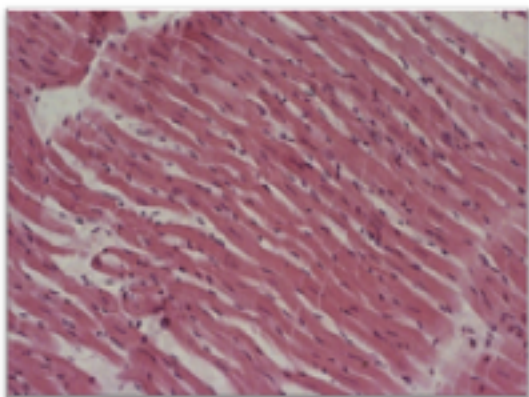


Слика 10. ХБО група

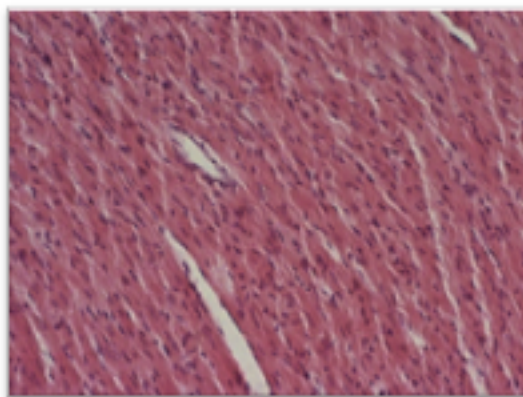


Слика 11. ХБО група

Грађа миокарда у ХБО + верапамил групи пацова приказана је на **сликама 12 и 13**. На овим сликама јасно се уочава да нема јасно изражених патохистолошких промена. Умерено су присутни едеми и хипереозинофилија цитоплазме.

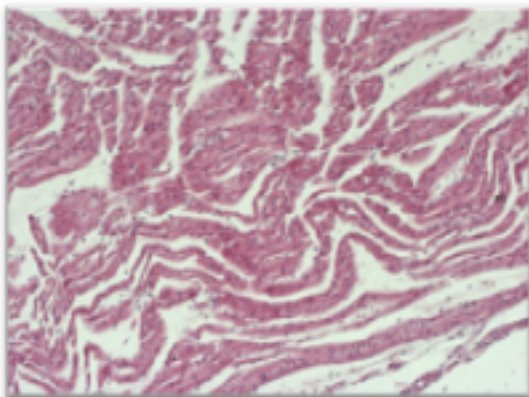


Слика 12. ХБО + верапамил група

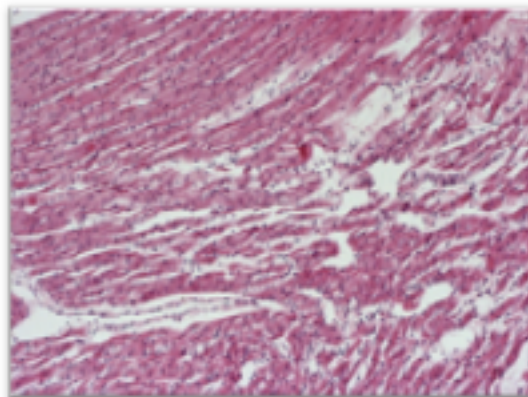


Слика 13. ХБО + верапамил група

Грађа миокарда у ХБО + амлодипин групи пацова приказана је на **сликама 14 и 15**. На овим сликама јасно се уочава да нема изражених патохистолошких промена. Умерено су присутна таласаста влакна, некроза и запаљенска инфилтрација.

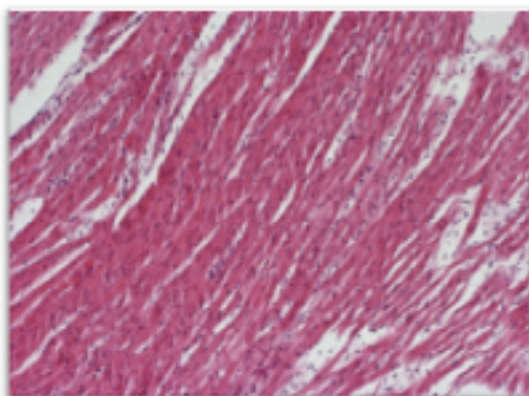


Слика 14. ХБО + амлодипин група

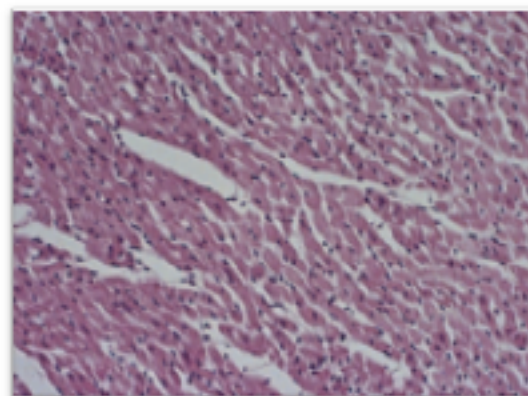


Слика 15. ХБО + амлодипин група

Грађа миокарда у ХБО + никорандил групи пацова приказана је на **сликама 16 и 17**. На овим сликама јасно се уочава да нема изражених патохистолошких промена. Умерено су присутни едеми, хиперемije, вакуоларна дегенерација и некроза.



Слика 16. ХБО + никорандил група



Слика 17. ХБО + никорандил група

На основу Н&Е бојења процењивано је оштећење миокарда. Параметри за оцену оштећења миокарда су били: едем, хиперемија, промене на једру, пикноза, вакуоларна дегенерација, таласаста влакна, фрагментација влакана, хипереозинофилија цитоплазме, контракционе траке, некроза, запаљенска инфилтрација, екстравазација. На основу присуства ових параметара даване су оцене према следећим критеријумима: 0 – без промена; 1 – благе (лаке) промене; 2 – умерене промене; 3 – тешке промене. Просечна оцена на основу присуства патоморфолошких промена у миокарду пацова у групама пацова чија су срца прекондиционирана неким од испитиваних фармаколошких агенаса (верапамил, амлодипин, никорандил) приказана је у **табели 14**.

Табела 14. Нивои патохистолошких промена на миокарду у ХБО, ХБО + верапамил, ХБО + амлодипин и ХБО + никорандил групи.

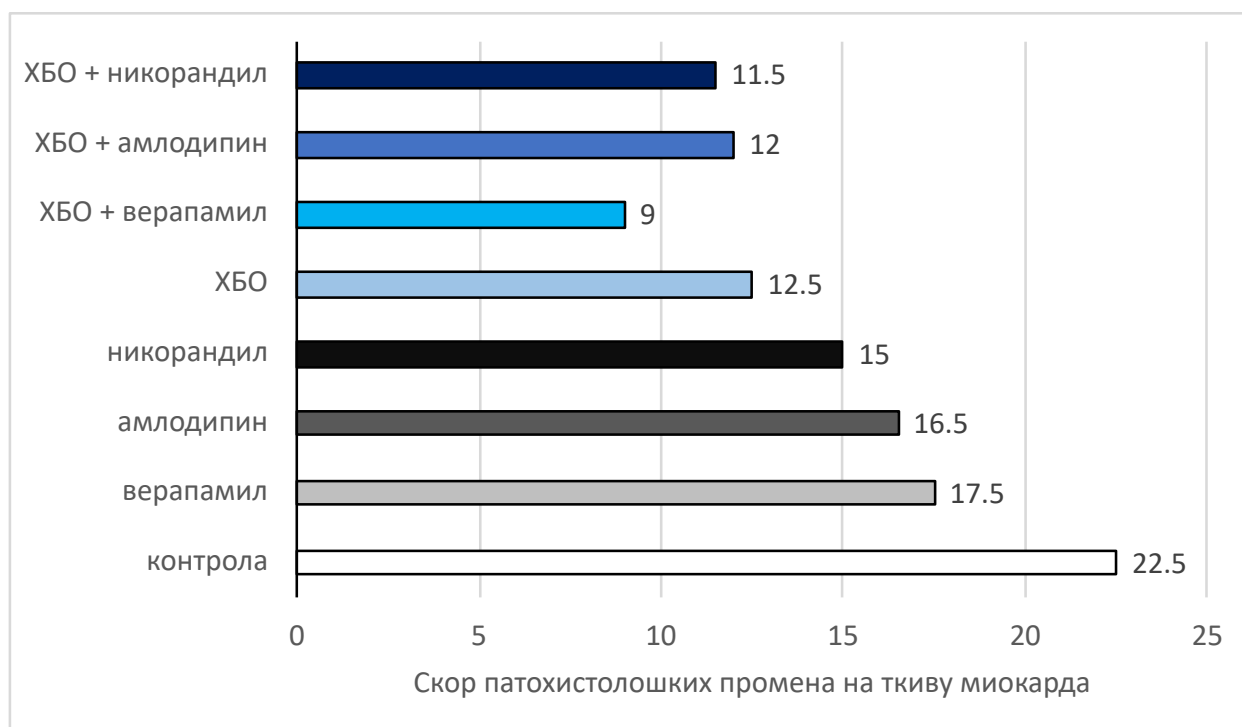
Патохистолошке промене	ХБО	ХБО + верапамил	ХБО + амлодипин	ХБО + никорандил
Едем	2,5	1,5	1,0	1,5
Хиперемија	2,0	1,0	1,0	1,5
Промене на једру	1,0	0,5	1,0	0,5
Пикноза	0,5	0,5	0,5	0,5
Вакуоларна дегенерација	0	0,5	0,5	2,0
Таласаста влакна	1,0	0,5	2,0	1,0
Фрагментација влакана	1,0	1,0	1,0	1,0
Хипереозинофилија цитоплазме	2,0	1,5	1,0	1,0
Контракционе траке	0	0	0	0
Некроза	1,0	1,0	2,0	1,5
Запаљенска инфилтрација	1,5	1,0	2,0	1,0
Екстравазација	0	0	0	0
Збир	12,5	9,0	12,0	11,5

Патохистолошке промене су оцењиване од 0-3 према споменутим критеријумима, а у табели су приказане средње вредности, заокружене на 0,5.

4.8.3. Поређење различитих маневара прекондиционарања на грађу миокарда

На основу установљених патохистолошких промена на ткиву миокарда и оцењивања истих, ниво повреде ткива миокарда у различитим групама приказани су на **графикону 27**.

На основу установљених патохистолошких промена можемо приметити да је највиши скор патохистолошких промена у контролној групи пацова (22,5), а потом у групама пацов чија су срца прекондиционрана испитиваним фармаколошким агенсима (скор од 17,5 до 15). Нижи скор патохистолошких промена забележен је у ХБО групи, а још нижи у групама у која су била подвргнута комбинованом прекондиционарању ХБО и фармаколошким агенсима (скор од 12 до 9).



Графикон 27. Скор патохистолошких променама на ткиву миокарда у контролној, верапамил, амлодипин, никорандил, ХБО, ХБО + верапамил, ХБО + амлодипин, ХБО + никорандил групи. Патохистолошке промене су оцењиване од 0-3 према споменутиим критеријумима, а у графикону су приказане средње вредности, заокружене на 0,5.

5. ДИСКУСИЈА

Продужена срчана исхемија (хипоксија) праћена реперфузијом (реоксигенацијом) подразумева неповратно оштећење кардиомиоцита, васкуларних глатких мишића, као и ендотела, што последично доводи и до оштећења коронарне циркулације (127-129). Сматра се да постоји неколико фактора који су одговорни за дисфункцију срца која је изазвана И/Р повредом (128). Међутим, досадашња сазнања из ове области сугеришу да су кључни фактори који доприносе развоју срчане инсуфицијенције током И/Р повреде повећана производња ROS и поремећај јонске хомеостазе тј. неравнотеже јона Ca^{2+} , Na^{+} и K^{+} (129). Током реперфузије, реоксигенација исхемијског ткива доводи до преоптерећења митохондријалног Ca^{2+} , акумулације екстрацелуларног K^{+} и враћања интрацелуларних рН вредности на физиолошке, али и до прекомерне производње ROS-а (130,131). Вишеструки механизми укључени су у објашњење интрацелуларног преоптерећења Ca^{2+} . Неки аутори истичу улогу повећаног прилива Ca^{2+} кроз калцијумске канале или $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ јоноизмењивач, као и прекомерно ослобађање Ca^{2+} из саркоплазматског ретикулума путем рианодин 2 типа рецептора (132,133). Узимајући у обзир дисфункцију саркоплазматског ретикулума, индуковану И/Р повредом, срце губи способност одржавања интрацелуларних Ca^{2+} јона и долази до погоршања контрактилне функције (134). Постоје два објашњења за екстрацелуларну акумулацију K^{+} : повећана проводљивост мембране за K^{+} помоћу активације K^{+} канала, најчешће *mitoK_{ATP}* и ефлукс K^{+} (135). Познато је да губитак K^{+} у срцу узрокује скраћивање плато фазе акционог потенцијала, што доводи до аритмија током периода исхемије али и реперфузије (136).

Повреда срца узрокована И/Р, као што је већ напоменуто, може се смањити исхемијским предкондиционирањем или употребом различитих егзогених кардиопротективних средстава у ту сврху. Имајући у виду да исхемијско прекондиционирање најчешће није могуће у клиничкој пракси, пажња научне јавности последњих деценија је фокусирана на фармаколошке и нефармаколошке методе које би се користиле пре коронарне оклузије или глобалне исхемије како би се смањила величина инфаркта миокарда (132).

Узимајући у обзир механизме којима И/Р повреда настаје, јасно је да примена антагониста калцијумских канала или активатора *mitoK_{ATP}* канала пре исхемије има позитивне ефекте на миокард током реперфузије (137,138). Међутим, из досадашњих

литературних података, још увек није могуће одредити која од ове две групе лекова је ефикаснија за очување миокарда у И/Р условима. Стога, један од циљева ове студије био је да испита и упореди ефеката акутне примене верапамила или амлодипина као представника антагониста калцијумских канала или никорандила као представника активатора *mitoK_{ATP}* канала на И/Р повреду изолованог срца пацова.

Такође, у овој студији смо се бавили и ефектима комбиновања два маневра прекондиционарања, при чему је као нефармаколошко прекондиционарање изабрана хипербарична оксигенација. Досадашњи литературни подаци указују да ХБО смањује стопу смртности и остварује протективну улогу на исхемични миокард (53). Међутим, јако је мало студија које су се бавиле комбиновањем два различита маневра прекондиционарања. Стога, основни циљ овог истраживања био је да испита ефекте хипербаричне оксигенације и фармаколошког прекондиционарања модулаторима јонских канала (верапамилем, амлодипином или никорандилом) на кардиодинамске параметре, коронарни проток и оксидациони стрес изолованог срца пацова.

5.1. Утицај различитих маневара прекондиционарања на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Иако се убрајају у исту групу лекова, антагонисти калцијумских канала се разликују не само структурно, већ и према месту везивања за калцијумски канал. Управо због другачијих везивних места, лекови из ове групе се међусобно разликују према механизму деловања и крајњим дејствима у организму. Због тога смо, за потребе овог истраживања изабрали два лека из групе дугоделујућих антагониста калцијумских канала. Наиме, оба лека су ефикасна у лечењу хипертензије, али велики број студија истиче да се верапамил и амлодипин требају прописивати различитим типовима хипертензивних пацијената. Амлодипин се препоручује за лечење тешке хипертензије са повећаним укупним васкуларним отпором, док верапамил треба бити лек избора код блажих облика хипертензије. Механизми деловања ових лекова су прилично различити. Амлодипин (као представник дихидропиридина) индукује периферну вазодилатацију и има мали утицај на контрактилност миокарда и синусни чвор, с друге стране, верапамил (као представник фенилалкиламина) има мали утицај на периферну васкуларну глатку мускулатуру и директне ефекте на срчану инотропију и хронотропију (139-141).

Као што је раније напоменуто, за проучавање ефеката прекондиционарања коришћен је *Langendorff*-ов модел ретроградне перфузије изолованог срца, а директно у срце су аликовани верапамил, амлодипин или никорандил. Иако *in vivo* модели И/Р повреде пружају корисне резултате, они нису толико ефикасни за проучавање функционалних ефеката повреде у реалном времену (142,143). Функција комора у већини случајева се испитује у погледу контрактилности, а као најчешће коришћени индекси контрактилности издвајају се максимална и минимална промена притиска у комори. Наиме, како се повећава контрактилна сила која делује, расте и стопа повећања притиска у левој комори (144).

Резултати овог истраживања сугеришу да прекондиционарање фармаколошким агенсима, као што су верапамил, амлодипин или никорандил, побољшава опоравак контрактилне функције (на основу вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$) током реперфузије. Упоређујући вредности параметара срчане контрактилности, можемо да закључимо да не постоје значајне разлике између експерименталних група, односно да је сваки од

акутно примењених лекова, самостално или у комбинацији са ХБО, значајно допринео побољшању контрактилности миокарда након глобалне исхемије. Оно што је још значајније, испитивана прекондиционарања одржавају вредности ових параметара, за разлику од контролне групе где током реперфузије долази до значајног пада (**графикони 1-6, табеле 1-6**). Упоредјујући групе које су биле подвргнуте и ХБО прекондиционарању можемо да приметимо да су вредности $dp/dt \max$ биле сличне у свим групама, али да су вредности $dp/dt \min$ биле значајно другачије између група, посебно у првом минуту реперфузије (**графикони 5-8, табеле 4-6**). Иако је прекондиционарање верапамилем иницијално довело до значајног смањења $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, током реперфузије ови параметри су повећани и достигли су вредности сличне онима у периоду стабилизације (**графикон 1, табела 1**). У ХБО + верапамил групи ово снижење је још израженије, посебно код $dp/dt \min$ (**графикон 5, табела 4**). Такође, у ранијем истраживању из наше лабораторије, на другачијем моделу изолованог срца пацова, показано је да акутна администрација верапамила у дози од 3 $\mu\text{mol/l}$ значајно смањује параметре контрактилности (145). Имајући у виду да верапамил блокира прилив калцијума и остварује директне негативне инотропне ефекте, добијени резултати су у складу са његовим механизмом деловања (146). Наши резултати су у корелацији и са резултатима истраживања које је спровео *Tang* и његови сарадници. Они су показали да перорално ординирани верапамил у дозама од 0, 3, 10 и 30 mg/kg смањује $dp/dt \max$ у испитивањима телеметрије код пацова (147). Слични резултати контрактилне функције су добијени у групи у којој су срца предкондиционирана амлодипином. Срцима из ове групе било је потребно мало више времена током реперфузије да би се вредности параметара контрактилности (првенствено $dp/dt \max$) вратиле у почетне (**графикон 2, табела 2**). У случају комбинованог прекондиционарања (ХБО + амлодипин), најзначајније је што није било значајних флукуација у вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ током *ex vivo* протокола (**графикон 6, табела 5**). Потенцијалне разлике између прекондиционарања амлодипином и верапамилем су вероватно узроковане различитим механизмом деловања ових лекова. Наиме, амлодипин је дугоделујући, липофилни, антагониста калцијумских канала који спада у другу генерацију 1,4-дихидропиридинских деривата. Везује се за дихидропиридинско али и за нондихидропиридинско везивно место са цитоплазматске стране калцијумских канала. Дихидропиридини селективно инхибирају прилив јона калцијума у ћелије васкуларних глатких мишића и ћелије миокарда, при чему значајније дејство остварују на ћелије васкуларних глатких

мишића (137,148). Са друге стране, најмање флукуације у контрактилној функцији примећене су у групи где су срца предкондиционирана никорандилом (**графикон 3, табела 3**), а са друге стране приликом комбиновања са ХБО, било је потребно неколико минута у реперфузији да би се вредности вратиле на почетне вредности (**графикон 7, табела 6**). Претходно објављени радови такође су подразумевали да никорандил, као активатор *mitoK_{ATP}* канала и донор азот-моноксида, побољшава опоравак контрактилне функције срца након исхемије (149,150). Предкондиционирање никорандилом утиче на потенцијал митохондријалне мембране и не дозвољава настанак митохондријалне дисфункције која би директно допринела настанку и развоју ремоделовања и смањењу контрактилности срца (151).

Примена испитаних лекова, пре глобалне исхемије, значајно је допринела побољшању SLVP и DLVP током реперфузије (**графикони 1-4, табеле 1-3**). Вредности SLVP су биле сличне у свим експерименталним групама са фармаколошким прекондиционирањем, осим у тачки Л, у којој је верапамил изазвао значајно смањење SLVP. За разлику од SLVP, вредности DLVP су биле значајно различите између експерименталних група током првих минута реперфузије. Највише вредности су примећене у никорандил групи, затим амлодипин, а најниже вредности биле су у верапамил групи. У случају комбинованог прекондиционирања вредности SLVP и DLVP се нису значајно мењале током експерименталног протокола (**графикони 5-7, табеле 4-6**). Упоредивајући експерименталне групе међусобно, приметили смо да је тренд исти као и код самостално фармаколошког прекондиционирања, највише вредности су биле у ХБО + никорандил групи, затим ХБО + амлодипин, а најниже вредности биле су у ХБО + верапамил групи (**графикон 8**). Предкондиционирање верапамилом у обе експерименталне групе (верапамил и ХБО + верапамил) довело је до значајног смањења вредности DLVP у односу на контролу при чему су ове смањене вредности одржане и током реперфузије (**графикон 1 и 5, табела 1 и 4**). У групи са комбинованим прекондиционирањем (ХБО + амлодипин и ХБО + верапамил), вредности SLVP су биле значајно ниже у односу на ХБО групу (**графикон 5 и 6, табела 4 и 5**). Опште је познато да се антагонисти калцијумских канала употребљавају за лечење хипертензије. Без обзира на групу којој припадају, сви антагонисти калцијумских канала се везују за алфа-1ц подјединицу Л-типа калцијумског канала и блокирају улаз екстрацелуларног Ca²⁺, што резултира смањење контрактилности, систолног и дијастолног притиска и опуштања васкуларних глатких мишића (152). Резултати ове студије су у корелацији са резултатима Davitt-а и коаутора, који су

такође приметили да долази до смањења DLVP у срцу пацова након 5-минутне примене верапамил (300 nM/L) (153). У клиничкој студији коју је са својим сарадницима спровео *Okamura* показано је да никорандил, као антиангинални лек, побољшава коронарну циркулацију без промене системског крвног притиска (154).

Иако није било значајних разлика између контролне и експерименталних група (верапамил, амлодипин и никорандил), јасно је да се фреквенца срца смањивала у контролној групи током времена (**графикони 1-3, табеле 1-3**). Узимајући у обзир ниске дозе, као и кратку дужину прекондиционарања испитиваним лековима, резултати добијени у нашој студији су очекивани. У претходно поменутој студији која је спроведена у нашој лабораторији, верапамил, примењен у вишој дози индукује значајно смањење фреквенце срца (145). У експерименталној студији из 2008. године, показано је да никорандил током акутне глобалне исхемије смањује појаву вентрикуларних тахикардија код паса (155). Такође је показано да интравенски примењен никорандил смањује QT дисперзију код људи након перкутане транслуминалне коронарне ангиопластике десне коронарне артерије или након акутног инфаркта миокарда (156,157). Након примене амлодипина или никорандила, коронарни проток је значајно повећан у поређењу са контролном групом (**графикони 2 и 3, табеле 2 и 3**). Код комбинованог прекондиционарања најзначајније је то што се вредности коронарног протока одржавају током тридесетоминутне реперфузије, што није случај са контролном, али ни са ХБО групом (**графикони 5-7, табеле 4-6**). До повећања коронарног протока највероватније долази услед повећане количине азот-моноксида и слабљења прилива Ca^{2+} у ћелије глатких мишића васкуларних органа (158,159). *Serizawa* и *Chen* су у својим засебним студијама показали да никорандил може спречити ендотелну дисфункцију регулисањем нивоа азот-моноксида и смањењем нивоа ендотелина-1 (160,161). Посебну пажњу у нашем истраживању посветили смо упоређивајући самостално и комбиновано прекондиционарање. Наиме, у ХБО + верапамил и ХБО + амлодипин групи дошло је до значајног снижења SLVP и значајног повећања DLVP у односу на верапамил и амлодипин групу (**графикони 10 и 11**). Наши резултати су донекле у корелацији са резултатима *Chen* и сарадника. Наиме, они су испитивали ефекте комбиновања ХБО и дилтиазема на сличном моделу код пацова и закључили да комбиновање ова два маневра прекондиционарања не доводе до значајних промена у вредностима $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, али да се значајне разлике примећују у вредностима систолног и дијастолног притиска у левој комори (115). У случају комбинованог прекондиционарања са никорандилом вредности HR су биле

значајно ниже у односу на групу у којој су срца самостално прекондиционирана никорандилом (**графикон 12**). Овај резултат нам указује да је комбиновано прекондиционирање у случају ХБО и никорандила, смањило потребе срца за кисеоником, што је и потребно у условима исхемије.

У недавној студија коју су спровели *Yin* и његови сарадници на *in situ* моделу И/Р код мишева испитивани су механизми одговорни за кардиопротекцију ХБО. Ови аутори су приметили да осим хемодинамских и хистолошких предности које ХБО остварује, такође долази и до повећане експресије HSP32, највероватније преко Nrf2 и P13K HO-1 (53). Иако су слични резултати добијени и у другим студијама, уз то су пронађени и други протеини који играју значајну улогу у кардиопротективном механизму ХБО предкондиционирања (162), на основу досадашњих литературних података се још увек не може потпуно разјаснити овај механизма.

5.2. Утицај различитих маневара прекондиционарања на прооксидационе параметре у ефлуенту изолованог срца и системски оксидациони стрес пацова

Реперфузиона повреда миокарда, као што је и више пута напоменуто, настаје услед поновног успостављања протока и реоксигенације, након периода исхемије. Сматра се да управо у периоду реперфузије долази до повећане продукције слободних радикала и настанка оксидационог стреса који је и један од главних узрочника И/Р повреде. Иако се велики број научника бави овом проблематиком, о самој повезаности оксидационог стреса и И/Р повреде још увек се не знају сви детаљи (113).

Праћењем нивоа маркера оксидационих оштећења (TBARS) и прооксидационих молекула (азот-мооксида у форми нитрита, супероксид анјон радикала и водоник пероксида) у коронарном венском ефлуенту, желели смо да детаљније проучимо ефекте прекондиционарања лековима из различитих група модулатора јонских канала. Испитивање промена параметара оксидационог стреса омогућило нам је да добијемо свеобухватнију слику и да донесемо закључак о томе да ли добијени кардиодинамски ефекти могу да буду посредовани оксидационим оштећењем или су у питању неки други механизми.

Наши резултати показују да самостално предкондиционарање амлодипином и никорандилом доводи до значајног повећања нивоа TBARS, при чему су непосредно након предкондиционарања највише вредности овог параметра биле у амлодипин групи (**графикон 16**). У случају комбинованог прекондиционарања резултати су нешто другачији. Наиме, током реперфузије вредности TBARS су више у ХБО + верапамил и ХБО + амлодипин у односу на ХБО + никорандил групу (**графикон 20**). На основу резултата можемо приметити да у верапамил, ХБО + верапамил и ХБО + амлодипин групи не долази до промена нивоа TBARS током експерименталног протокола, док су никорандил, амлодипин и ХБО + никорандил довели до значајног повећања TBARS концентрације након њихове примене (**графикони 13-19, табеле 7-12**). Током реперфузије концентрација TBARS се вратила на вредности сличне стабилизацији у никорандил, ХБО + верапамил и ХБО + амлодипин групи (**графикон 15, 17 и 18, табела 9-11**), док је у амлодипин и ХБО + никорандил групи до самог краја реперфузије концентрација TBARS остала повишена (**графикон 14 и 19, табела 8 и 12**). Ниједан од испитиваних лекова, самостално или у комбинацији са ХБО није довео

до повећања концентрације TBARS у првом минуту реперфузије, као што је то био случај у контролној групи (**графикони 13-15, табеле 7-9**). *Allah* и коаутори су у својој студији показали да истовремени третман верапамилом и феросульфатима доводи до повећања укупног антиоксидационог капацитета и смањења укупног пероксида у серуму, за разлику од групе која је била на третману само феросульфатима (163). У корелацији са овим резултатима су и резултати претходног истраживања наше лабораторије, у ком верапамил такође није изазвао значајне промене у вредностима TBARS (145). *Alam* и сарадници су у својој студији спроведеној на *Swiss* албино мишевима показали да амлодипин дозно-зависно смањује нивое TBARS (164). Литературни подаци показују да антагонисти калцијумских канала могу инхибирати пероксидацију липида ако се акумулирају у мембранама миокарда у већим концентрацијама него у серуму *in vivo* (165). С обзиром на то да су дихидропиридински деривати, у нашем случају амлодипин, високо васкуларно-селективни, а са друге стране да је верапамил релативно селективан за миокард, то би уједно могао бити и разлог за већу концентрацију TBARS непосредно након предкондиционарања амлодипином у односу на концентрацију након прекондиционарања верапамилом (166). *Abdel-Raheem* и сарадници су испитивали кардиопротективне ефекте никорандила, на кардиотоксичност изазвану доксорубицином код пацова. Они су показали да никорандил спречава повећање нивоа TBARS изазваног доксорубицином (167). Иако литературни подаци указују да ХБО доводи до снижења нивоа TBARS, у нашој студији то није био случај, а резултати су другачији највероватније због различитих експерименталних протокола (115).

У испитиваним групама није дошло до промена нивоа NO_2^- током *ex vivo* експерименталног протокола. Док су вредности NO_2^- током биле сличне током целокупног протокола, нивои O_2^- су се значајно разликовали између група, посебно током првих минута реперфузије (**графикони 16 и 20**). Наиме, вредности супероксид анјон радикала биле су највише у групи у којој су срца прекондиционирана никорандилом, затим верапамилом, а најниже вредности забележене су у амлодипин групи. Међутим, у свим експерименталним групама током периода реперфузије, тачније током последњих минута реперфузије, нивои O_2^- су се вратили на почетне вредности. У групама које су биле подвргнуте и ХБО прекондиционарању, у првом минуту реперфузије, значајно су више вредности O_2^- у односу на ХБО групу. У групама где су срца прекондиционирана ХБО, значајно је да до краја реперфузије вредности O_2^- падају и бивају чак и ниже од оних које су забележене у стабилизацији,

док са друге стране у контролној групи вредности се нису снижавале током реперфузије.

Као најзначајнији ефекат фармаколошког предкондиционарања у нашем истраживању је смањење вредности H_2O_2 у односу на контролну групу (**графикони 13-15, табеле 7-9**). Побољшана функција срца могла је настати услед способности испитиваних модулатора јонских канала да "сакупи" (енгл. *scavenging*) слободне радикале који настају током првих минута реперфузије. Претходно публиковане студије показале су да прекондиционарање верапамилом смањује ћелијску смрт индуковану H_2O_2 смањењем експресије каспазе-3 (168). *Da Hyun Lee* и његови коаутори су показали да верапамил активира нуклеозни фактор 2 и да штити ћелије од оксидационог оштећења у људском и ткиву зеца (169). Неколико претходно објављених радова су у корелацији са нашим резултатима и сугеришу да амлодипин, као високо липофилни антагониста калцијумских канала, смањује оксидациони стрес. Антиоксидациона активност амлодипина се приписује високој липофилности и хемијској структури која олакшава донацију протона и стабилизује реакцију слободних радикала (170). За никорандил је показано да кардиопротекцију највероватније изазива инхибицијом кардиомиоцитне апоптозе индуковане оксидационим стресом и хипоксијом у срчаним миоцитима механизмом зависним од азот-моноксид/cGMP, као и активирањем *mitoK_{ATP}* канала (171). У групама које су подвргнуте комбинованом прекондиционарању, вредности H_2O_2 биле су више од контролне групе, али ниже од ХБО групе, што значи да су модулатори јонских канала и у овом случају довели до побољшања (**графикони 17-20, табеле 10-12**).

Приликом упоређивања вредности мерених параметара оксидационог стреса између група, можемо приметити да су у ХБО групама, у већини случајева вредности више, али оно што је значајније је да у овим групама не долази до повећања оксидационог стреса након исхемије. Антагонисти калцијумских канала своје протективне ефекте на срце највероватније остварују инхибирањем спорог уласка Ca^{2+} кроз L-тип Ca^{2+} канала у срчаним ћелијама. Верапамил смањује потребу за кисеоником смањујући накнадно оптерећење, *preload* и контрактилност, затим, побољшава допремање кисеоника у зону исхемије, чува структуру и функцију митохондрија, смањује доступност калцијума за стимулацију АТР-азе, протеазе и липазе (172,173). С друге стране, активатор *mitoK_{ATP}* канала, никорандил, имитира ефекте исхемијског прекондиционарања и остварује заштитне ефекте на срцу, смањујући величину

инфаркта миокарда, чиме деполаризује митохондријалну мембрану и спречава преоптерећење Ca^{2+} (174,149).

С обзиром да у медицинским круговима постоје ставови да примена кисеоника у концентрацијама већим од оних који се налазе у ваздуху могу имати токсичне ефекте управо због повећане продукције ROS (175), један од циљева нашег истраживања је био да утврдимо утицај хипербаричне оксигенације на параметре оксидационог стреса у крви након двонедељног излагања пацова у хиперббаричној комори. Бројне експерименталне студије су показале контроверзне резултате о утицају терапије хиперббаричним кисеоником на оксидациони стрес и ензиме антиоксидационе заштите у различитим моделима. Сматра се да управо због оксидационог стреса долази до апоптозе, смрти ћелије и митохондријалне дисфункције (176). Наши резултати указују да су вредности TBARS, нитрита и водоник пероксида, као и свих мерених параметара антиоксидационе заштите биле сличне као и у контролној групи пацова. Позитивни ефекти ХБО огледају се и у снижењу нивоа супероксид анјон радикала у крви пацова (**графикони 25 и 26**). Ови резултати су у сагласности са бројним студијама чији резултати сведоче да ХБО не доводи до повећања оксидационог стреса (177). Такође, наши резултати су у складу и са бројним клиничким истраживањима, чији резултати иду у прилог томе да ХБО не изазива повећану продукцију слободних радикала (178). Литературни подаци такође указују да су прооксидациони и антиоксидациони ефекти ХБО временски зависни, посебно код здравих пацова (179-181). Па то може бити и разлог што су у неким студијама добијени другачији резултати. Наиме, када говоримо о оксидационом стресу и ХБО морамо да напоменемо да постоје бројни адаптациони механизми на ХБО који се првенствено огледају у повећању антиоксидационих ензима. SOD и редуковани GSH су главни ендогени параметри антиоксидационог система. Веома су значајни за сакупљање слободних радикала, при чему SOD убрзава конверзију супероксид анјон радикала у водоник пероксид, а редуковани GSH смањује липидне хидропероксиде преведећи их до одговарајућих алкохола и слободног водоник пероксида, а потом у воду. MDA је попут TBARS индиректни маркер липидне пероксидације, јер настаје као крајњи производ пероксидације липида. Стога, инхибиција оксидационог стреса може допринети и смањењу И/Р повреде миокарда (182). Резултати наших студија јасно показују да ХБО не показује прооксидациони ефекат, за шта је често оптуживан. Параметри оксидационог стреса, које смо у овом истраживању пратили, не само да се нису повећали, него су и благо снижени у ХБО групи.

5.3. Утицај различитих маневара прекондиционирања на очуваност грађе миокарда пацова

У ранијим истраживањима која су се бавила И/Р повредом, показано је да исхемија и реперфузија доводе до апоптозе, некрозе и аритмија, али и до бројних и значајних хистопатолошких промена у ткиву миокарда (183).

У нашој студији исхемија и реперфузија је изазвана *ex vivo* на *Langendorff*-овом апарату. Током периода исхемије, када АТФ прогресивно нестаје, јонске пумпе не могу функционисати. У таквим условима долази до пораста интрацелуларног и митохондријског Ca^{2+} , што даље убрзава АТФ деплецију и доводи до митохондријалне дисфункције и руптуре плазма мембране, као и смрти ћелије (184). Na^+ - K^+ -АТФ-аза је интегрални мембрански протеин, а транспорт Na^+ и K^+ се постиже АТФ хидролизом. Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФ-аза је доминантно активни транспортни протеин који регулише интрацелуларни ниво калцијума и одржавати хомеостатски градијент катјона. Поред тога кључан је за контрактилност и ексцитабилност мишића (185). Повећана интрацелуларна концентрација јона Ca^{2+} (од енгл. *calcium overload*) доводи до оштећења митохондрија и промене ћелијске функције (186). Услед високе концентрације јона Ca^{2+} унутар ћелије долази до константних контракција ћелија, што може уједно да буде и разлог настанка некрозе, али и феномена који се назива контракционе траке (енгл. *contraction band*). Ови феномени су и уочени хистопатолошком анализом миокарда (табеле 13 и 14). Контракционе траке су најкарактеристичније у верапамил групи (слике 4 и 5). Овај веома занимљив феномен се описује као карактеристични оразац за некрозу миокарда, а представља хиперконтракцију и лизу мале групе ћелија у миокарду (187). Карактеристичне су за акутни модел И/Р па су због тога и веома значајне за наш протокол. Ови резултати су у складу и са кардиодинамским параметрима јер су управо у верапамил групи забележене највише вредности за снагу срчане контракције.

Највиши степен некрозе забележен је у контролној групи (слике 2 и 3), док је најмањи забележен у ХБО и ХБО + верапамил групи (слике 10-13). Ови резултати су у складу и са, претходно описаним кардиодинамским параметрима. Услед неадекватне хомеостазе калцијума смањује се снага срчане контракције (188) и долази до депресије контрактилности, што је и забележено у контролној групи. У контролној групи и у нешто мањој мери и у ХБО групи јасно се уочава појава едема у виду проширења

међућелијског простора и раслојености мишићних влакана (слике 2,3 и 10,11). Са друге стране најблажи облици едема примећени су у ХБО + амлодипин групи (слике 14 и 15). Бројна истраживања показују да појава едема директно утиче и на смањење контрактилне способности миокарда (189,190) тако да је и овај хистопатолошки налаз у складу са добијеним резултатима. Појам хиперемиа односи се на дилатацију крвних судова, а њени најближи облици присуни су у ХБО + верпамил, односно ХБО + амлодипин групи (слике 12-15).

Умерена вакуоларна дегенерација је забележена у никорандил и ХБО + никорандил групи (слике 8,9 и 16,17), док је у осталим групама примећена у много блажем облику. Досадашњи литературни подаци указују да до ове промене долази услед поремећаја респирације на нивоу ћелије деловањем слободних радикала (191). Наиме, услед поремећаја аеробне респирације ћелије долази до успоравања или потпуног прекида синтезе аденозин три фосфата, што условљава поремећај Na^+/K^+ пумпе која је зависна од АТФ-а. Поремећај у функционисању ове пумпе условљава настанак дисбаланса у концентрацији јона, тако да долази до накупљања јона Na^+ у ћелији и изласка јона K^+ ван ћелије. Изоосмотским путем вода улази у ћелију што доводи до бубрења ћелија и губитка микровила, при чему се оштећује плазмалема и долази до неконтролисаног инфлуksа јона Ca^{2+} . Ћелија прелази на анаеробни метаболизам, при чему се смањује количина гликогена, док уједно расте концентрација млечне киселине. Ови процеси условљавају оток митохондрија и ендоплазматског ретикулума, при чему долази до одвајања рибозома од ендоплазматског ретикулума где се полизоми распадају у монозоми због чега се смањује синтеза протеина. На површини ћелије се стварају мехурићи који се називају вакуоле. Ако се присетимо механизма деловања испитиваних модулатора јонских канала, овај резултат нам је потпуно јасан. Наиме, антагонисти калцијумских канала спречавају да дође до неконтролисаног инфлуksа калцијума и спречавају настанак вакуоларних дегенерација. Са друге стране никорандил, који отвара канале за АТФ-зависне канале за калијум, директно потпомаже самом механизму настанка вакуоларних дегенерација (191, 192).

У контролној групи у којој су срца била изложена исхемији и реперфузији, а нису била изложена прекондиционарању дошло је до највећег броја патохистолошких промена и већина њих се јавила у тешком облику, са друге стране приликом прекондиционарања модулаторима јонских канала патохистолошке промене су биле изражене у нешто лакшем облику (верапамил > амлодипин > никорандил).

Кардиопротекција комбинованог прекондиционарања ХБО и испитиваним модулаторима јонских канала може бити условљена одржавању интегритета мембране ћелија миокарда. Наши резултати показују да је приликом комбинованог прекондиционарања дошло да снижења појединих патохистолошких промена на срцу због чега је у овим групама и забележен мањи скор промена у ткиву миокарда (ХБО > ХБО + никорандил > ХБО + амлодипин > ХБО + верапаимил).

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата који су добијени и приказани у овом истраживања, као и њиховог поређења са резултатима других аутора може се закључити следеће:

1. Употреба антагониста калцијумских или активација *mitoK_{ATP}* канала у циљу прекондиционирања миокарда, остварила је заштитне ефекте од исхемијско/реперфузионе повреде миокарда.
2. Сви испитивани модулатори јонских канала (верапамил, амлодипин и никорандил) имају значајну улогу у кардиопротекцији након исхемије и реперфузије изолованог срца пацова. На основу динамике кардиодинамских параметара и патохистолошке анализе, можемо да закључимо да су добијени ефекти најзначајнији применом никорандила.
3. Комбиновано прекондиционирање модулаторима јонских канала и хипербаричном оксигенацијом, доводи до мањих оштећења ткива миокарда, што је најизраженије у групи ХБО + верапамил.
4. Употреба свих испитиваних фармаколошких агенаса је повезана са снижењем вредности најважнијих прооксидационих молекула што директно указује на то да постигнути ефекти могу бити, барем делимично, последица њихових антиоксидационих својстава.
5. Прекондиционирање испитиваним модулаторима јонских канала, као и њихова комбинована употреба са ХБО показала је позитивне ефекте на функционални опоравак миокарда након исхемије, с тим што је тај утицај у случају самосталног прекондиционирања фармаколошким агенсима био доминантнији на очување контрактилних параметара и коронарног протока, док је у комбинованом прекондиционирању позитиван ефекат био фокусиран на очување ткива миокарда.
6. С обзиром да, испитујући биохемијске маркере оксидационог оштећења, нисмо уочили да је дошло до појачане продукције вредности било ког параметра, резултати наших студија јасно показују да хипербарична оксигенација не показује прооксидациони ефекат, за шта је често оптуживана.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. McTigue K, Kuller L. Cardiovascular risk factors, mortality, and overweight. *JAMA*. 2008;299:1260-1263.
2. Koopman LP, Mertens LL. Impact of childhood obesity on cardiac structure and function. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2014;16:345.
3. Савезни завод за заштиту здравља. Међународна класификација болести, X ревизија. Београд: Савремена администрација; 1996.
4. Ballew SH, Matsushita K. Cardiovascular Risk Prediction in CKD. *Semin Nephrol*. 2018;38(3):208-216.
5. Fuller RH, Perel P, Navarro-Ruan T, Nieuwlaat R, Haynes RB, Huffman MD. Improving medication adherence in patients with cardiovascular disease: a systematic review. *Heart*. 2018. pii: heartjnl-2017-312571. doi:10.1136/heartjnl-2017-312571. [Epub ahead of print].
6. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, et al. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation*. 2001;83:836-844.
7. Akhtar S. Ischemic heart disease. *Anesthesiology Clinics of North America*. 2006;24(3):461-485.
8. Mehta LS, Beckie TM, DeVon HA, et al. Acute myocardial infarction in women: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133:916-947.
9. Anda R, Williamson D, Jones D, et al. Depressed affect, hopelessness, and the risk of ischemic heart disease in a cohort of US adults. *Epidemiology*. 1993;12:285-294.
10. De Marchis P, Verso MG, Tramuto F, Amodio E, Picciotto D. Ischemic cardiovascular disease in workers occupationally exposed to urban air pollution - A systematic review. *Ann Agric Environ Med*. 2018;25(1):162-166.
11. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97:1837-1847.
12. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *Jama*. 2003;290(7):898-904.
13. McClelland RL, Jorgensen NW, Budoff M, et al. 10-year coronary heart disease risk prediction using coronary artery calcium and traditional risk factors: derivation in the

MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) with validation in the HNR (Heinz Nixdorf Recall) study and the DHS (Dallas Heart Study). *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;66:1643-1653.

14. Rosendorff C, Black HR, Cannon CP, et al. REPRINT Treatment of hypertension in the prevention and management of ischemic heart disease: A scientific statement from the American Heart Association Council for high blood pressure research and the Councils on clinical cardiology and epidemiology and prevention. *Hypertension*. 2007;50:e28-e55.
15. Linden MD, Furman MI, Frelinger AL, et al. Indices of platelet activation and the stability of coronary artery disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5(4):761-765.
16. Alkhulaifi AM, Yellon DM, Pugsley WB. Preconditioning the human heart during aorto-coronary bypass surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 1994;8(5):270-5.
17. Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int. Anesthesiol. Clin*. 1964;2:251–259.
18. Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon: a tool for the scientist or a clinical reality. *Circ. Res*. 2000;87:543–550.
19. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, et al. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovascular research*. 2001;52:181-198.
20. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-1136.
21. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003;285(2):H579-H588.
22. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel M, et al. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94(9):2193-2200.
23. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, et al. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circulation research*. 1990;66(4):1133-1142.
24. Ara J, Fekete S, Frank M, et al. Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia–ischemia in newborn piglet brain. *Neurobiology of disease*. 2011;43(2):473-485.

25. Cantagrel S, Krier C, Ducrocq S, et al. Hypoxic preconditioning reduces apoptosis in a rat model of immature brain hypoxia-ischaemia. *Neuroscience letters*. 2003;347(2):106-110.
26. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-1136.
27. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87(3):893-899.
28. Tyagi P, Tayal G. Ischemic preconditioning of myocardium. *Acta pharmacologica Sinica*. 2002;23(10):865-870.
29. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(20):2332-2336.
30. Vinod NK, Rupinder SM, Murugesan C. Myocardial ischaemic preconditioning. *Indian Journal of Anaesthesia*. 2004;48(2):93-93.
31. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, et al. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock (Augusta, Ga.)*. 1997;8(2):86-94.
32. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, et al. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(10):4666-4670.
33. Miki T, Miura T, Tsuchida A, et al. Cardioprotective mechanism of ischemic preconditioning is impaired by postinfarct ventricular remodeling through angiotensin II type 1 receptor activation. *Circulation*. 2000;102(4):458-463.
34. Schulz R, Gres P, Heusch G. Role of endogenous opioids in ischemic preconditioning but not in short-term hibernation in pigs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280(5):H2175-H2181.
35. Li D, Liu M, Tao TQ, et al. Panax quinquefolium saponin attenuates cardiomyocyte apoptosis and opening of the mitochondrial permeability transition pore in a rat model of ischemia/ reperfusion. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34:1413-1426.
36. Pike MM, Luo CS, Clark MD, et al. Nmr measurements of na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: Role of na⁽⁺⁾-h⁺ exchange. *Am J Physiol* 1993;265:2017- 2026.
37. Zhang JY, Wu F, Gu XM, et al. The blockade of transmembrane cl⁽⁻⁾ flux mitigates i/r-induced heart injury via the inhibition of calpain activity. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:2121-2134.

38. 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;301:1723-1741.
39. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123:92-100.
40. Dorsch M, Behmenburg F, Raible M, et al. Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151025.
41. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation*. 1998;97(24):2463-9.
42. Jeremic N, Petkovic A, Srejovic I, et al. Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015;30:266-275.
43. Kregel KC. Invited review: Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*. 2002;92:2177–2186.
44. Amsterdam EA, Schaefer S. Ischemic preconditioning in coronary heart disease: a therapeutic golden fleece? 2004;1515-1516.
45. Bennett MH, Lehm JP, Jepson N. Hyperbaric oxygen therapy for acute coronary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;23:4818.
46. Haque WA, Boehmer J, Clemson BS, Leuenberger UA, Silber DH, Sinoway LI. Hemodynamic effects of supplemental oxygen administration in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:353-7.
47. Zhai WW, Sun L, Yu ZQ, et al. Hyperbaric oxygen therapy in experimental and clinical stroke. *Medical Gas Research*. 2016;6(2):111-118.
48. Sun Q, Liu Y, Sun X, Tao H. Anti-apoptotic effect of hyperbaric oxygen preconditioning on a rat model of myocardial infarction. *J Surg Res*. 2011;171:41-46.
49. Yamakoshi K, Yagishita K, Tsuchimochi H, et al. Microvascular oxygen partial pressure during hyperbaric oxygen in diabetic rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309(12):R1512-520.
50. Wada K, Ito M, Miyazawa T, et al. Repeated hyperbaric oxygen induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *Brain Research*. 1996;740:15-20.
51. Kim CH, Choi H, Chun YS, et al. Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium. *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology*. 2001;442:519-525.

52. Hentia C, Rizzato A, Camporesi E, et al. An overview of protective strategies against ischemia/reperfusion injury: The role of hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Behav.* 2018 Mar 30;8(5):e00959.
53. Yin X, Wang X, Fan Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates myocardium ischemia-reperfusion injury through upregulation of heme oxygenase 1 expression: Pi3k/akt/ nrf2 pathway involved. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2015;20:428-438.
54. Cheng O, Ostrowski RP, Wu B, et al. Cyclooxygenase-2 mediates hyperbaric oxygen preconditioning in the rat model of transient global cerebral ischemia. *Stroke* 2011;42:484-490.
55. Kloner RA, Bolli R, Marban E, et al. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation.* 1998;97(18):1848-1867.
56. Loubani M, Galiñanes M. Pharmacological and ischemic preconditioning of the human myocardium: mitoK_{ATP} channels are upstream and p38MAPK is downstream of PKC. *BMC physiology.* 2002;2:10.
57. Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, et al. Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *British journal of anaesthesia.* 2002;89:486-491.
58. Das S, Alagappan VK, Bagchi D, et al. Coordinated induction of iNOS–VEGF–KDR–eNOS after resveratrol consumption: A potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascular pharmacology.* 2005;42:281-289.
59. Miyawaki H, Ashraf M. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res.* 1997;80: 790-799.
60. Smith GB, Stefenelli T, Wu ST, et al. Rapid adaptation of myocardial calcium homeostasis to short episodes of ischemia in isolated rat hearts. *Am Heart J.* 1996;131:1106-1112.
61. Braunwald E. Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. *New England Journal of Medicine.* 1982;307(26):1618-1627.
62. Brichard G, Zimmermann PE. Verapamil in cardiac dysrhythmias during anesthesia. *British Journal of anaesthesia.* 1970;42(11):1005-1012

63. Freher M, Challapalli S, Pinto JV, Schwartz J, Bonow RO, Gheorgiade M. Current status of calcium channel blockers in patients with cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol.* 1999;24:236-40.
64. Abernethy DR, Schwartz JB. Calcium-antagonist drugs. *N Engl J Med* 1999;341:1447-57.
65. Opie LH. Calcium channel blockers (calcium antagonists). In: Opie LH (ed). *Drugs for the Heart* (5th edition). Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 53-83.
66. Weir MR. Calcium channel blockers: differences between subclasses. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2007;7:5-15.
67. Frishman W.H. Calcium channel blockers: differences between subclasses. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2007;7:17-23.
68. Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;139:33-87.
69. Cleophas TJ, van Marun R. Meta-analysis of efficacy and safety of second-generation dihydropyridine calcium channel blockers in heart failure. *Am J Cardiol.* 2001;87:487-90.
70. Millar JA, McLean KA, Sumner DJ, et al. The effect of the calcium antagonist nifedipine on pressor and aldosterone responses to angiotensin II in normal man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1983;24:315-21.
71. Krishna GG, Riley LJ, Deuter G, et al. Natriuretic effect of calcium-channel blockers in hypertensives. *Am J Kidney Dis.* 1991;18:566-72.
72. Cutler JA. Calcium-channel blocker for hypertension-uncertainty continues. *N Engl J Med.* 1998; 338:679-81.
73. Psaty BM, Heckbert SR, Koepsell TD, et al. The risk of myocardial infarction associated with antihypertensive drug therapies. *JAMA.* 1995;274:620-5.
74. Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol.* 1972;67(3):417-40.
75. Kiowski W, Buhler FR, Fadayomi MO, et al. Age, race, blood pressure and renin: predictors for antihypertensive treatment with calcium antagonists. *Am J Cardiol.* 1985;56:81-5.
76. Sica DA. Pharmacotherapy review: calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2006;8(1):53-6.
77. Curt FD, Psaty MB, Meyer VJ. Nifedipine dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation.* 1995;92:1326-31.

78. Wallbridge DR, Schulz R, Braun C, Post H, Heusch G. No attenuation of ischaemic preconditioning by the calcium antagonist nisoldipine. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(8):1801-10.
79. Waters D. Proischemic complications of dihydropyridine calcium channel blockers. *Circulation.* 1991;84:2598-2600.
80. Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Meng X, Banerjee A, Harken AH. Clinical L-type Ca(2+) channel blockade prevents ischemic preconditioning of human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(12):2191-7.
81. Camara AK, Chen Q, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF. Negative inotropic drugs alter indexes of cytosolic [Ca(2+)]- left ventricular pressure relationships after ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(2):H667-80.
82. Sweetman SC (ed.) *Martindale The Complete Drug Reference*, 35th ed. 2007; Pharmaceutical Press.
83. Ananchenko G, Novakovic J, Lewis J. Amlodipine besylate, *Profiles Drug Subs. Excip. Related. Methodol.* 2012;37:31-77.
84. Meredith PA, Elliott HL. Clinical pharmacokinetics of amlodipine. *Clinical pharmacokinetics.* 1992;22(1):22-31.
85. Van Zwieten PA. Amlodipine: an overview of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Clinical cardiology.* 1994;17(9 Suppl 3):III3.
86. Halici Z, Suleyman H, Cadirci E. Effects of calcium channel blockers on hyaluronidase-induced capillary vascular permeability. *Arch Pharm Res.* 2008;31:891-899.
87. Halici Z, Karaca M, Keles ON, Borekci B, Odabasoglu F, Suleyman H, et al. Protective effects of amlodipine on ischemia-reperfusion injury of rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertil Steril.* 2008;90:2408-2415.
88. Coskun AK, Gunal A, Halici Z, et al. The effects of amlodipine on the biochemical and histopathological changes in the rabbit ileum subjected to ischemia-reperfusion. *The Eurasian journal of medicine.* 2011;43(1):33.
89. Umemoto S, Tanaka M, Kawahara S, et al. Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2004;27:877-885.
90. Kyselovic J, Krenek P, Wibo M, Godfraind T. Effects of amlodipine and lacidipine on cardiac remodelling and renin production in salt-loaded stroke-prone hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001;134:1516-1522.

91. Dilmac N, Hilliard N, Hockerman GH. Molecular determinants of frequency dependence and Ca²⁺ potentiation of verapamil block in the pore region of Cav1.2. *Mol Pharmacol*. 2004;66(5):1236-1247.
92. Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res*. 1996;79:137-146.
93. Henry PD. Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipine, verapamil and diltiazem. *The American journal of cardiology*. 1980;46(6):1047-58.
94. Yu W, Wang JJ, Gan WY, Lin GS, Huang CX. Effects of verapamil preconditioning on cardiac function in vitro and intracellular free Ca²⁺ and L-type calcium current in rat cardiomyocytes post ischemia-reperfusion injury. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2010;38(3):225-229.
95. Okuda K, Nohara R, Ogino M, et al. Limitation of infarct size with preconditioning and calcium antagonist (Diltiazem): Difference in ^{99m}Tc-PYP uptake in the myocardium. *Annals of nuclear medicine*. 1996;10(2):201-209.
96. De Jong JW, Harmsen E, De Tombe PP. Diltiazem administered before or during myocardial ischemia decreases adenine nucleotide catabolism. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(4):363-370.
97. Gojkovic-Bukarica L, Kazic T. Differential effects of pinacidil and levromakalim on the contractions elicited electrically or by noradrenaline in the portal vein of rabbit. *Fundam Clin Pharmacol*. 1999;13:527-534.
98. Kazic T, Gojkovic-Bukarica Lj. Ion channels and drug development focus on potassium channels and their modulators. *Medicine and Biology*. 1999;1:23-30.
99. Jahangir A, Terzic A. KATP channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:99-112.
100. Gojkovic-Bukarica Lj, Kanjuh V. Kalijumovi kanali u kardiovaskularnom sistemu: struktura, funkcija i farmakoloska modulacija. U: Ostojic M, Kanjuh V, Beleslin B. *Kardiologija*. 1. izd. Beograd: Zavod za udzbenike; 2011:1236-1242.
101. Protic D, Todorovic Z, Gojkovic-Bukarica Lj. Kalijumovi kanali kao ciljno mesto za delovanje lekova u terapiji kardiovaskularnih oboljenja: 25 godina kasnije. *Sanamed*. 2013;8:71-78.
102. Gojkovic Bukarica Lj, Kazic T. Jonski kanali i kanalopatije. U: Kazic T, Ostojic M. *Klinicka kardiovaskularna farmakologija*. 4. izd. Beograd: Inegra; 2004:37-58.

103. IONA Study Group. Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: The Impact of Nicorandil in Angina (IONA) randomised trial. *Lancet*. 2002;359:1269-1275.
104. Holmuhamedov EL, Jahangir A, Oberlin A, Komarov A, Columbini M, Terzic A. Potassium channel openers are uncoupling protonophores: implication in cardioprotection. *FEBS Lett*. 2004;568:167-170.
105. Patel DJ, Purcell HJ, Fox KM. Cardioprotection by opening of the KATP channel in unstable angina: Is this a clinical manifestation of myocardial preconditioning? Results of a randomized study with nicorandil. *European heart journal*. 1999;20:51-57.
106. Matsuo H, Watanabe S, Segawa T, et al. Evidence of pharmacologic preconditioning during PTCA by intravenous pretreatment with ATP-sensitive K⁺ channel opener nicorandil. *European heart journal*. 2003;24:1296-1303.
107. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*. 2014;94:909-950.
108. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*. 2014;224:164-175.
109. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, et al. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*. 2016;119:e39-e75.
110. He F, Zuo L. Redox roles of reactive oxygen species in cardiovascular diseases. *International journal of molecular sciences*. 2015;16:27770-27780.
111. Nowak WN, Deng J, Ruan XZ, et al. Reactive oxygen species generation and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2017;37:e41-e52.
112. Li X, Fang P, Li Y, et al. Mitochondrial reactive oxygen species mediate lysophosphatidylcholine-induced endothelial cell activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2016;ATVBAHA-115.
113. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular pharmacology*. 2017;100:1-19.
114. Zhang ZW, Kaneda T, Ku K, Otaki M, Oku H. Ischemic preconditioning and nicorandil pretreatment improve donor heart preservation. *Japanese circulation journal*. 2001;65:678-682.

115. Chen C, Chen W, Nong Z, et al. Cardioprotective Effects of Combined Therapy with Hyperbaric Oxygen and Diltiazem Pretreatment on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38:2015-2029.
116. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood Glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-888.
117. Li L, Jia Z, Xu L, Wu Y, Zheng Q. Expression Profile of Neuro-EndocrineImmune Network in Rats with Vascular Endothelial Dysfunction. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014:177-182.
118. Bhandari U, Pathan RA, Kumar V, Khanna N. Ameliorative role of atorvastatin on methionine-induced hyperhomocysteinemia and hematological changes in albino rats. *Indian J Exp Biol*. 2011:132-139.
119. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Meth*. 1980;38:161-170.
120. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126:131-138.
121. Beutler E. Catalase. In: Beutler E. *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton 1982;pp.105-106.
122. González RR, Puchades MJ, García RR, Saez G, Tormos MC, Miguel A. Effect of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Nefrol* 2006;26:218-225.
123. Zwart SR, Kala G, Smith SM. Body iron stores and oxidative damage in humans increased during and after a 10- to 12-day undersea dive. *J Nutr*. 2009;39:90-95.
124. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Edited by Beutler, E. Grune and Stratton, New York. 1975; pp.112-114.
125. Zhang JY, Cheng K, Lai D, et al. Cardiac sodium/calcium exchanger preconditioning promotes anti-arrhythmic and cardioprotective effects through mitochondrial calcium-activated potassium channel. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(9):10239.
126. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007;39:175-191.

127. Yang Q, He GW, Underwood MJ, Yu CM. Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection. *Am J Transl Res.* 2016;8:765.
128. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med.* 2018;117:76-89.
129. Kiselyov K, Muallem S. ROS and intracellular ion channels. *Cell calcium.* 2016;60:108-114.
130. Cao CM, Xia Q, Gao Q, Chen M, Wong TM. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312:644-650.
131. Kwong JQ, Molkentin JD. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* 2015;21:206-214.
132. Altamirano F, Wang ZV, Hill JA. Cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *J Physiol.* 2015;593:3773-3788.
133. Kojima A, Fukushima Y, Ito Y, Ding WG, Kitagawa H, Matsuura H. TRPC channel blockers improve ventricular contractile functions after ischemia/reperfusion in a Langendorff-perfused mouse heart model. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2018; Epub: <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000566>.
134. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:S644-S648.
135. Venkatesh N, Lamp ST, Weiss J-N. Sulfonylureas, ATP-sensitive K1 channels, and cellular K1 loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circ Res.* 1991;69:623-637.
136. Nichols CG. Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Currents in Heart Disease and Cardioprotection. *Card Electrophysiol Clin.* 2016;8:323-335.
137. Simonovic N, Jeremic J. Role of Calcium Channel Blockers in Myocardial Preconditioning. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18:281-287.
138. Gross GJ, Auchampach JA, Maruyama M, Warltier DC, Pieper GM. Cardioprotective effects of nicorandil. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20:S22-28.
139. Lefrandt JD, Heitmann J, Sevre K, et al. Contrasting effects of verapamil and amlodipine on cardiovascular stress responses in hypertension. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52:687-692.

140. Sahin I, Kosar F, Altuncan S, Gunaydin M. Comparison of the effects of amlodipine and verapamil on autonomic activity in hypertensive patients. *Eur J Case Rep Intern Med.* 2004;15:225-230.
141. Lorimer AR, Smedsrud T, Walker P, Tyler HM. A comparison of amlodipine, verapamil and placebo in the treatment of mild to moderate hypertension. Amlodipine Study Group *J Hum Hypertens.* 1989;3:191-196
142. Herr DJ, Aune SE, Menick DR. Induction and Assessment of Ischemia-reperfusion Injury in Langendorff-perfused Rat Hearts. *J Vis Exp.* 2015;101:e52908.
143. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelağ A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff - still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Meth.* 2007;55:113-126.
144. Kawai H, Yokota Y, Yokoyama M. Noninvasive evaluation of contractile state by left ventricular dP/dtmax divided by end-diastolic volume using continuous-wave doppler and M-mode echocardiography. *Clinical cardiology.* 1994;17:662-668.
145. Stojic I, Srejavic I, Zivkovic V, et al. The effects of verapamil and its combinations with glutamate and glycine on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart. *J Physiol Biochem.* 2017;73:141-153.
146. Tang L, El-Din TMG, Swanson TM, et al. Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca²⁺ channel by Ca²⁺ antagonist drugs. *Nature.* 2016;537:117.
147. Tang HM, Ju H, Zhao S, et al. Translational assessment of cardiac contractility by echocardiography in the telemetered rat. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;77:24-32.
148. Fares H, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lavie CJ. Amlodipine in hypertension: a first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes. *Open heart.* 2016;3:e000473.
149. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (j-wind): Two randomised trials. *Lancet.* 2007;370:1483-1493.
150. Ishii H, Ichimiya S, Kanashiro M, et al. Impact of a single intravenous administration of nicorandil before reperfusion in patients with st-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation.* 2005;112:1284-1288.
151. Wang S, Fan Y, Feng X, et al. Nicorandil alleviates myocardial injury and post-infarction cardiac remodeling by inhibiting Mst1. *Biochemical and biophysical research communications.* 2018;495:292-329.

152. Cleophas TJ, van Marun R. Meta-analysis of efficacy and safety of second-generation dihydropyridine calcium channel blockers in heart failure. *Am J Cardiol.* 2001;87:487-490.
153. Davitt K, Hensley L, Clements-Jewery H. Verapamil But Not Lidocaine Suppresses Ischemia-Induced Ventricular Fibrillation in The Isolated Female Rat Heart. *The FASEB Journal.* 2016;30:1274-1278.
154. Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, et al. Additive effects of nicorandil on coronary blood flow during continuous administration of nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:719-725.
155. Hirose M, Tsujino N, Nakada T, et al. Mechanisms of preventive effect of nicorandil on ischaemia-induced ventricular tachyarrhythmia in isolated arterially perfused canine left ventricular wedges. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102:504-514.
156. Ueda H, Hayashi T, Tsumura K, Yoshimaru K, Nakayama Y, Yoshikawa J. Intravenous nicorandil can reduce QT dispersion and prevent bradyarrhythmia during percutaneous transluminal coronary angioplasty of the right coronary artery. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2004;9:179-184.
157. Ueda H, Nakayama Y, Tsumura K, Yoshimaru K, Hayashi T, Yoshikawa J. Intravenous nicorandil can reduce the occurrence of ventricular fibrillation and QT dispersion in patients with successful coronary angioplasty in acute myocardial infarction. *Can. J. Cardio.* 2004;20:625-629.
158. Ok SH, Kwon SC, Kang S, Choi MJ, Sohn JT. Mepivacaine-induced intracellular calcium increase appears to be mediated primarily by calcium influx in rat aorta without endothelium. *Korean J Anesthesiol.* 2014;67:404-411.
159. Sahara M, Sata M, Morita T, Hirata Y, Nagai, R. Nicorandil attenuates monocrotaline-induced vascular endothelial damage and pulmonary arterial hypertension. *PLoS One.* 2012;7:e33367.
160. Serizawa K, Yogo K, Aizawa K, Tashiro Y, Ishizuka N. Nicorandil prevents endothelial dysfunction due to antioxidative effects via normalisation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase in streptozotocin diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10:105.
161. Chen Z, Chen X, Li S, Huo X, Fu X, Dong X. Nicorandil improves myocardial function by regulating plasma nitric oxide and endothelin-1 in coronary slow flow. *Coronary artery disease.* 2015;26:114.

162. Kansanen E, Jyrkkänen HK, Levonen AL. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012;52:973-982.
163. Abd Allah ES, Ahmed MA, Abdel Mola AF. Comparative study of the effect of verapamil and vitamin D on iron overload-induced oxidative stress and cardiac structural changes in adult male rats. *Pathophysiology*. 2014;21:293-300.
164. Alam M, Singh BK, Kumar V. Amlodipine potentiates the protective effect of zonisamide on pentylentetrazol-induced kindling in mice. *Drug Development and Therapeutics*. 2015;6:88.
165. Sugawara H, Tobise K, Kikuchi K. Antioxidant effects of calcium antagonists on rat myocardial membrane lipid peroxidation. *Hypertens Res*. 1996;19:223-228.
166. Lefrandt JD, Heitmann J, Sevre K, et al. Contrasting effects of verapamil and amlodipine on cardiovascular stress responses in hypertension. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52:687-692.
167. Abdel-Raheem IT, Taye A, Abouzied MM. Cardioprotective Effects of Nicorandil, a Mitochondrial Potassium Channel Opener against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;113:158-166.
168. Wang Z, Wang D, Li Y, Zhang X. Protective Effects of Verapamil against H₂O₂-Induced Apoptosis in Human Lens Epithelial Cells. *Biomol Ther*. 2014;22:553-557.
169. Da Hyun Lee JSP, Lee YS, et al. The hypertension drug, verapamil, activates Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic Keap1 degradation and prevents acetaminophen-induced cytotoxicity. *BMB reports*. 2017;50:91.
170. Tanaka M, Nishimura R, Nishimura T, Kawai T, Meguro S, Irie J, Saisho Y, Itoh H. Effect of single tablet of fixed-dose amlodipine and atorvastatin on blood pressure/lipid control, oxidative stress, and medication adherence in type 2 diabetic patients. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6:56.
171. Nagata K, Obata K, Odashima M, et al. Nicorandil inhibits oxidative stress-induced apoptosis in cardiac myocytes through activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and a nitrate-like effect. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:1505-1512.
172. Yui H, Imaizumi U, Beppu H, Ito M, et al. Comparative effects of verapamil, nifedipine, and nitroglycerin on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Anesthesiol Res Pract*. 2011:doi:10.1155/2011/521084.
173. Yu W, Wang JJ, Gan WY, Lin GS, Huang CX. Effects of verapamil preconditioning on cardiac function in vitro and intracellular free Ca²⁺ and L-type calcium current in

- rat cardiomyocytes post ischemia-reperfusion injury. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2010;38:225-229.
174. Mitani A, Kinoshita K, Fukamachi K, et al. Effects of glibenclamide and nicorandil on cardiac function during ischemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am J Physiol.* 1991;261:H1864-871.
175. Saicic Z. Antioksidacioni zastitni sitem. U: Durie DM. ur. Ateroskleroza: faktori rizika, patogeneza, terapija, prevencija. Beograd: Drustvo fiziologa Srbije; 2005:45-61.
176. Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16:233-238.
177. Tepić S, Živković M, Terzić N, et al. Effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in patients having diabetes mellitus type 2. *Medicinski pregled.* 2009;62(5-6):225-230.
178. Oter S, Topal T, Sadir S, et al. Oxidative stress levels in rats following exposure to oxygen at 3 atm for 0-120 min. *Aviat Space Environ Med* 2007;78(12): 1108-13.
179. Ay H, Topal T, Ozier M, Uysal B, et al. Persistence of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects after exposure in rat brain cortex tissue. *Life Sci* 2007; 80(22):2025-2029.
180. Korkmaz A, Oter S, Sadir S, et al. Exposure time related oxidative action of hyperbaric oxygen in rat brain. *Neurochem Res* 2008;33(I):160-166.
181. Zhang YS, He L, Liu B, et al. A novel pathway of nadph oxidase/vascular peroxidase 1 in mediating oxidative injury following ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2012;107:266.
182. Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect.* 1994;10:17-24.
183. Lee YM, Cheng PY, Chen SY, Chung MT, Sheu JR. Wogonin suppresses arrhythmias, inflammatory responses, and apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;58:133-142.
184. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317.
185. Tian D, Dmitrieva RI, Doris PA, Crary JF, Sondhi R, Sacktor TC, Bergold PJ. Protein kinase m zeta regulation of na/k atpase: A persistent neuroprotective mechanism of ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 2008;5:127-139

- 186.Fuller W, Eaton P, Bell JR, Shattock MJ. Ischemia-induced phosphorylation of phospholemman directly activates rat cardiac Na/K ATPase. *FASEB J.* 2004;18:197-199.
- 187.Morita S, Furukawa S, Nishi K. Classification of contraction bands using immunohistochemistry. *The American journal of forensic medicine and pathology.* 2015;36(1):23.
- 188.Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, et al. Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺ /K⁺ - ATPase in the heart. *J Physiol.* 2015;593(6):1361-1382.
- 189.Charan NB, Ripley R, Carvalho P. Effect of increased coronary venous pressure on left ventricular function in sheep. *Respir Physiol.* 1998;112:227-235.
- 190.Davis KL, Mehlhorn U, Laine GA, Allen SJ. Myocardial edema, left ventricular function, and pulmonary hypertension. *J Appl Physiol.* 1995;78:132-137.
- 191.Li K, Sung RY, Huang WZ, et al. Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Circulation.* 2006;113(18):2211-20.
- 192.Dhingra R, Margulets V, Chowdhury SR, et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(51):E5537-44.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ

Име и презиме: Нина Симоновић

Датум и место рођења: 05.04.1987. године, Београд, Република Србија

Адреса:

Телефон: 060/5040987

2. ОБРАЗОВАЊЕ

Гимназија, прве три године у Београду, а завршну годину у САД-у

Медицински факултету Универзитета у Београду, дипломирала 2012. године

Специјализација из области офталмологије, 2017-данас

3. ПОЗНАВАЊЕ СТРАНИХ ЈЕЗИКА

Енглески језик (напредни ниво)

Немачки језик (средњи ниво)

Шпански језик (средњи ниво)

4. РАДНО ИСКУСТВО

Дом здравља, Вождовац

5. РАЗНО

Добитница је Награде града Београда за 2017. годину за научни рад *Улога блокатора калцијумских канала у прекодиционирању срца*

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Simonovic N**, Jakovljevic V, Jeremic J, Finderle Z, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Zivkovic V. Comparative effects of calcium and potassium channel modulators on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2018; doi: 10.1007/s11010-018-3384-y. **M23**
2. **Simonovic N**, Jeremic J. Role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning. *Ser J Exp Clin Res* 2017; 18(4): 281-287. **M51**
3. Radonjic T, **Simonovic N**, Nikolic Turnic T. An overview of pharmacological and non-pharmacological treatment as a useful tool for the protection from cardiotoxicity of antineoplastic drugs. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0019. **M51**

AUTHORS CURRICULUM VITAE

1. PERSONAL DATA

Name and surname: Nina Simonovic

Date and place of birth: 05.04.1987. Belgrade, Serbia

Address:

Phone: 060/5040987

2. EDUCATION

Gymnasium, the first three years in Belgrade, and the final year in the USA

Medical faculty University of Belgrade, graduated - 2012.

Specialization in field of ophthalmology, 2017-present

3. FOREIGN LANGUAGE

English (advanced)

German (intermediate)

Spanish (intermediate)

4. WORK EXPERIENCE

Health Center, Vozdovac

5. MISCELLANEOUS

Winner of the Belgrade City Prize 2017 for the scientific paper *Role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning.*

LIST OF PUBLICATIONS

1. **Simonovic N**, Jakovljevic V, Jeremic J, Finderle Z, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Zivkovic V. Comparative effects of calcium and potassium channel modulators on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2018; doi: 10.1007/s11010-018-3384-y. **M23**
2. **Simonovic N**, Jeremic J. Role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning. *Ser J Exp Clin Res* 2017; 18(4): 281-287. **M51**
3. Radonjic T, **Simonovic N**, Nikolic Turnic T. An overview of pharmacological and non-pharmacological treatment as a useful tool for the protection from cardiotoxicity of antineoplastic drugs. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0019. **M51**

8. ПРИЛОЗИ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број: РБ	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада: ВР	Докторска дисертација
Аутор: АУ	Нина Симоновић
Ментор/коментор: МН	др сци. мед. Владимир Јаковљевић, редовни професор
Наслов рада: НР	Утицај прекондиционирања антагонистима L-типа калцијумских канала и никорандилом самостално и у комбинацији са хипербаричном оксигенацијом на функционални опоравак изолованог срца пацова
Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	Српски/Енглески
Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Шумадијски округ
Година: ГО	2019.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	Факултет медицинских наука, Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац, Србија
Физичи опис рада: ФО	8 поглавља/ 135 страница/ 14 табела/ 17 слика/ 5 схема/ 27 графикана/ 192 референце/ 1 прилог
Научна област:	Медицина

Научна дисциплина: ДИ	Експериментална физиологија
Предметна одредница/ кључне речи: ПО	верапамил, амлодипин, никорандил, прекондиционирање, хипербарична оксигенација, оксидациони стрес
УДК:	Медицина
Чува се: ЧУ	У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Светозара Марковића 69, Република Србија
Важна напомена:	
Извод: ИД	<p>Циљ. Да испита и упореди ефекате прекондиционирања фармаколошким агенсима, хипербаричном оксигенацијом, као и њихове комбиноване примене на анималном моделу.</p> <p>Методе. У студију је било укључено 96 пацова (<i>Wistar albino</i> сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 200±50г). У први део студије (<i>in vivo</i>) било је укључено 48 животиња које су биле изложене прекондиционирању хипербаричном оксигенацијом (ХБО) у трајању од 14 дана. Након тога је уследио други део студије (<i>ex vivo</i>) који је обухватио све животиње које су биле укључене у студију. Изолована срца пацова су перфундована методом ретроградне перфузије по Лангендорфу при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cm H₂O, а након стабилизације срца су подељена у две контролне (контрола без прекондиционирања и ХБО – срца пацова који су били изложени хипербаричној оксигенацији) и 6 експерименталних група које су се међусобно разликовале у примењеном маневру прекондиционирања (верапамил, амлодипин, никорандил или комбиновано ХБО + верапамил, ХБО + амлодипин, ХБО + никорандил). Потом су срца била излагана глобалној исхемији у трајању од 20 минута и реперфузији у трајању од 30 минута. Током читавог експерименталног протокола бележени су кардиодинамски параметри, коронарни проток и сакупљан је коронарни венски ефлуент из кога су одређивани параметри оксидационог стреса.</p>

	<p>Резултати. Добијени резултати јасно указују да блокирање калцијумског канала или активација АТР-зависних калијумских канала може посредовати заштитном ефекту предкондиционарања миокарда, сви испитивани лекови имају корисна кардиопротективна својства повезана са нижим вредностима главних прооксидационих молекула.</p> <p>Закључак. Ова студија би могла да буде полазна основа за будуће студије и испитивање комбинације различитих маневара прекондиционарања.</p>
Датум прихватања теме од стране ННВ: ДП	31. мај 2017.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: КО	<p>Доц. др Иван Срејовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник</p> <p>Проф. др Жарко Финдерле, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Љубљани (визитинг професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу) за ужу научну област Физиологија, члан</p> <p>Доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, члан</p>

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Documentation type: DT	Monographic publication
Type of record: Tr	Textual material, printed
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Nina Simonovic
Menthor/co-mentor: MN	Vladimir Jakovljevic, MD, PhD full professor
Title: TI	The effect of L-type calcium channel antagonists and nicorandil preconditioning alone or in combination with hyperbaric oxygenation to the functional recovery of isolated rat heart
Language of text: LT	Serbian (cyrillic)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Sumadija manicipality
Publication year: PY	2019.
Publisher: PU	Author`s reprint
Publication place: PP	Faculty of Medical Sciences, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia
Physical description: PD	8 charpters/ 135 pages/ 14 tables/ 17 pictures/ 5 sheme/ 27 figures/ 192 references/ 1 annex
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Experimental physiology
Subject/key words: SKW	Verapamil, Amlodipine, Nicorandil, preconditioning, hyperbaric oxygenation,

	oxidative stress
UDC:	Medicine
Holding data: HD	Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Street: Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>Objective. The aim of this study was to examine and compare the effects of preconditioning with pharmacological agents, hyperbaric oxygenation, and their combined applications on the animal model.</p> <p>Methods. The study included 96 rats (<i>Wistar albino</i>, male gender, 8 weeks old, body weight 200 ± 50g). In the first part of the study (<i>in vivo</i>), 48 animals were exposed to hyperbaric oxygenation (HBO) over 14 days. A second part of the study (<i>ex vivo</i>) included all the animals involved in the study. Isolated heart rats were perfused by the Langendorff retrograde method at a constant coronary pressure of 70 cm H₂O, and after stabilization period heart were divided into two controls (control without preconditioning and HBO - heart of rats exposed to hyperbaric oxygenation) and 6 experimental groups differed in the applied preconditioning maneuver (verapamil, amlodipine, nicorandil or combined HBO + verapamil, HBO + amlodipine, HBO + nicorandil). Then, the heart was exposed to global ischemia for 20 minutes and reperfusion for 30 minutes. During the entire experimental protocol, cardiodynamic parameters and coronary flow were recorded, while a coronary venous effluent was collected form determination of oxidative stress parameters.</p> <p>Results. Obtained results clearly indicate that blocking of the calcium channel or activation of ATP-sensitive K⁺ channel can mediate the protective effect of myocardial preconditioning; all investigated drugs have useful cardioprotective properties associated with lower values of the major prooxidation molecules.</p> <p>Conclusion. This study may be starting point for further investigations of combined preconditioning methods.</p>

Accepted by the Scientific Board on: ASB	31. May 2017.
Defended on: DE	
Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) DB	<p>Ass. Prof. Ivan Srejovic, assistant professor at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, chairman</p> <p>Prof. Zarko Finderle, PhD, full professor at Medical Faculty, University of Ljubljana (visiting professor at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac), scientific domain: Physiology, member</p> <p>Ass. Prof. Tamara Nikolic Turnic, assistant professor at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Clinical Pharmacy, member</p>

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Нина Симоновић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:


Утицај прекондиционирања антагонистима L-типа калцијумских канала и никорандилом самостално и у комбинацији са хипербаричном оксигенац
ијом на функционални опоравак изолованог срца пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршила повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 20.12.2018. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Нина Симоновић

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај прекондиционарања антагонистима L-типа калцијумских канала и никорандилом самостално и у комбинацији са хипербаричном оксигенац
ијом на функционални опоравак изолованог срца пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 20.12.2018. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



Comparative effects of calcium and potassium channel modulators on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart

Nina Simonovic¹ · Vladimir Jakovljevic^{2,3} · Jovana Jeremic⁴ · Zarko Finderle⁵ · Ivan Srejovic² · Tamara Nikolic Turnic⁴ · Isidora Milosavljevic⁴ · Vladimir Zivkovic²

Received: 27 March 2018 / Accepted: 16 June 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The aim of this study was to examine and compare the effects of the acute administration of verapamil or amlodipine as representatives of the calcium channel blockers or nicorandil as a representative of the mitochondrial ATP-dependent potassium (K_{ATP}) channel opener to cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. The hearts of adult male *Wistar albino* rats ($n = 60$ total, 12 per group) were divided into five groups, two controls (preconditioning with Krebs–Henseleit solution) and three experimental depending on acute administered pharmacological agents (0,63 $\mu\text{mol/L}$ of verapamil, 0,1 $\mu\text{mol/L}$ of amlodipine, and 200 $\mu\text{mol/L}$ of nicorandil). After stabilization and 5 min of preconditioning in experimental groups, hearts from I/R control and all experimental groups underwent global ischemia (20 min) and reperfusion (30 min). Hearts from sham group were continuously followed for 50 min, after stabilization period. Cardiodynamic parameters and coronary flow were recorded at the end of stabilization (S), at the last minute of pharmacological preconditioning (P) and at intervals of 5 min after global ischemia, during reperfusion, or in case of sham group during 20–50 min after stabilization. At the same intervals, we collected coronary venous effluent from which we spectrophotometrically measured the parameters of oxidative stress: the index of lipid peroxidation, superoxide anion radical, hydrogen peroxide, and nitrite. In summary, our findings clearly indicate that the blocking of the calcium channel or the activation of K_{ATP} may mediate the protective effect of myocardial preconditioning. The *ex vivo* results showed that all examined drugs after ischemia and reperfusion have beneficial cardioprotective properties associated with lower values of major pro-oxidative molecules. Obtained effects seem to be the most convincing in case of nicorandil.

Keywords Verapamil · Amlodipine · Nicorandil · Ischemia/reperfusion · Pharmacological preconditioning

Introduction

Prolonged heart ischemia (hypoxia) accompanied by a reperfusion (reoxygenation) involves irreversible damage of the cardiomyocytes, the vascular smooth muscle, the endothelium, and consequently, coronary circulation [1]. Several factors are responsible for cardiac dysfunction caused by ischemia/reperfusion (I/R) injury [2]. However, in the recent years it has become increasingly clear that the key contributing factors to heart failure during I/R injury are elevated production of reactive oxygen species (ROS) and a disturbance in ionic homeostasis, i.e., imbalance of Ca^{2+} , Na^+ , and K^+ [3]. During reperfusion, the reoxygenation of ischemic tissue leads to the overload of mitochondrial Ca^{2+} , extracellular K^+ accumulation, and re-normalization of intracellular and matrix pH values, followed by excessive ROS production [4–6]. Multiple

✉ Vladimir Jakovljevic
drvladakgbg@yahoo.com

¹ Health Center "Vozdovac", Belgrade, Serbia
² Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
³ Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia
⁴ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
⁵ Department of Physiology, Medical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

mechanisms have been hypothesized to explain intracellular Ca^{2+} overload. Some authors emphasize the role of enhanced Ca^{2+} influx through a voltage-gated L-type Ca^{2+} channel or a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, as well as the excessive release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum via the ryanodine receptor type 2 [7, 8]. Taking into account dysfunction of the sarcoplasmic reticulum induced by myocardial I/R, the heart loses the ability to maintain intracellular Ca^{2+} ions and high cytosolic Ca^{2+} ions contributing to exacerbation of contractile function [9, 10]. The two general explanations are proposed for extracellular K^+ accumulation: increased membrane conductance for K^+ via activation of K^+ channels, the most often mitochondrial ATP-dependent potassium (K_{ATP}) channel and K^+ efflux coupled to lactate and inorganic phosphate efflux to balance transmembrane charge movement [11]. It is well known that loss of myocardial K^+ causes shortening the plateau phase of the action potential and arrhythmogenesis during I/R [12].

Heart injury caused by I/R can be protected by ischemic preconditioning or by using various exogenous cardioprotective agents. Bearing in mind that the ischemic preconditioning is hardly feasible in clinical practice, the attention of the scientific public is focused on the pharmacological and non-pharmacological methods that would be used prior to coronary occlusion or global ischemia in order to reduce the size of myocardial infarction [7].

Regarding the above-mentioned mechanisms of I/R injury, it is clear that administration of the calcium channel blockers (CCBs) or the mitochondrial K_{ATP} channel openers before ischemia has positive effects on the heart during reperfusion [13–15]. However, to our best knowledge, it is still not possible to determine which of these two groups of drugs is more effective in heart preconditioning.

Therefore, the aim of this study was to examine and compare the effects of the acute administration of verapamil or amlodipine as representatives of the CCBs or nicorandil as a representative of the K_{ATP} channel opener to cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers on I/R injury in the isolated rat heart.

Materials and methods

Animals

Adult *Wistar albino* male rats ($n = 60$) weighing 180–200 g, obtained from Military Medical Academy, Belgrade, Serbia, were used for this study. The animals were housed in wire mesh cages under controlled temperatures at 22 ± 2 °C and controlled light/dark cycle (12/12 h). Food and water were provided *ad libitum*.

Preparation of isolated rat hearts

Perfusion of hearts with Krebs–Henseleit solution in a Langendorff apparatus (Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary) proceeded as described in previous work [16]. The animals were killed by cervical dislocation, after intraperitoneal injection of 100 μL of a 10:1 mixture of ketamine (100 mg/mL; Ketaset, Fort Dodge, Fort Dodge, IA) and xylazine (100 mg/mL; AnaSed, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA). After a ketamine/xylazine-induced narcosis, emergency thoracotomy was performed, the heart was isolated and rapidly excised into a basin of ice-cold isotonic saline. Thereafter heart was attached via an aortic cannula and retrogradely perfused on a Langendorff apparatus at constant perfusion pressure (CPP) of 70 cmH_2O with Krebs–Henseleit solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1.7 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 5.5 mM glucose, equilibrated with 95% O_2 mixed with 5% CO_2 , and warmed to 37 °C) at pH 7.4. Immediately after the restoration of normal rhythm, through the created entrance to the left atrium of the heart and damaged mitral valve, the sensor (transducer BS473-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) was inserted into the left ventricle for continuous monitoring of cardiac function. The following parameters of myocardial function were continuously registered: maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max), minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically.

Experimental protocol

The hearts ($n = 60$ total, 12 per group) were divided into five groups, two controls and three experimental depending on acute administrated pharmacological agents.

1. Sham group—without ischemia and reperfusion;
2. I/R control group—preconditioning with Krebs–Henseleit solution;
3. Verapamil group—preconditioning with verapamil in dose of 0,63 $\mu\text{mol/L}$ [17];
4. Amlodipine group—preconditioning with amlodipine in dose of 0,1 $\mu\text{mol/L}$ [17];
5. Nicorandil group—preconditioning with nicorandil in dose of 200 $\mu\text{mol/L}$ [18].

After stabilization (average 30-min) and 5 min of preconditioning, all hearts except hearts from sham group

underwent global ischemia and reperfusion. Ischemia was induced by turning off the tap on the tube leading to the heart, which stops the flow of the perfusion fluid to the heart. Reperfusion was established for 30 min by reopening the tap after 20 min of ischemia. On the other hand, hearts from sham group were continuously followed for 50 min.

All previously mentioned cardiodynamic parameters and coronary flow were recorded at the end of stabilization (S), 6, 21, 25, 30, 35, 40, 45, 50 min from the stabilization in case of sham group, or at the last minute of pharmacological preconditioning (P) and at intervals of 5 min (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30) after global ischemia, during reperfusion (30 min) in case of other examined groups. In addition, at the same intervals, we collected coronary venous effluent from which we spectrophotometrically measured the parameters of oxidative stress: the index of lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and nitrite (NO_2^-).

Index of lipid peroxidation

The lipid peroxidation level in the coronary venous effluent was estimated by measuring TBARS using 1% thiobarbituric acid in 0.05 NaOH incubated with coronary effluent at 100 °C for 15 min and read at 530 nm. As a blank, we used Krebs–Henseleit solution [19].

Nitrite determination

The NO_2^- level was measured as an index of NO production using the Griess reagent. A total of 0.5 mL of perfusate was precipitated with 200 μ L of 30% sulfosalicylic acid, vortexed for 30 min, and centrifuged at 3000 \times g. The equal volumes of the supernatant and Griess reagent, containing 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid/0.1% naphthalene ethylenediamine dihydrochloride, were added, incubated for 10 min in the dark, and read at 543 nm. The nitrite levels are calculated using sodium nitrite as the standard [20].

Superoxide determination

The level of the O_2^- was measured by the reaction of Nitro Blue Tetrazolium in TRIS-buffer with coronary venous effluent and read at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe [21].

Hydrogen peroxide determination

The level of H_2O_2 was measured using oxidation of Phenol Red by H_2O_2 in a reaction catalyzed by horseradish peroxidase [22]. A volume of 200 μ L of perfusate was

precipitated with 800 μ L of fresh Phenol Red solution, along with 10 μ L of 1:20 horseradish peroxidase (made *ex tempore*). An adequate volume of Krebs–Henseleit solution was used for a blank probe (instead of coronary venous effluent). The level of H_2O_2 was read at 610 nm.

Ethical approval

The investigation complies with the European Directive for welfare of laboratory animals No: 2010/63/EU and principles of Good Laboratory Practice. The protocol of the current study was approved by the Faculty of Medical Sciences Ethics Committee for the welfare of experimental animals, University of Kragujevac, and by Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management, Authority for Veterinary of Serbia. The investigators understand the ethical principles under which the journal operates and their work complies with animal ethics checklist.

Drugs

Verapamil, amlodipine, and nicorandil were purchased from Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SD. For statistical analysis, we used point of interest S, P, the first minute of reperfusion or 21st minute in sham group (marked as 1), and the last minute of reperfusion or 50th minute in sham group (marked as 30). For comparison within the group, we compared these points with each other, while for comparison between groups we compared the same interest point between groups.

After a normal distribution and homogeneity of variance were, respectively, confirmed using the Shapiro–Wilk test and Levene’s test, we performed a statistical analysis for all measured parameters. The effects of previously mentioned drugs on cardiodynamic and oxidative parameters between groups were analyzed by a one-way ANOVA (Scheffé’s F test) and non-parametric analogue test of ANOVA (Kruskal–Wallis test). Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Effects of pharmacological preconditioning on cardiodynamic parameters of isolated rat heart

Maximum rate of left ventricular pressure development (dp/dt max)

In the I/R control group, the dp/dt max was significantly increased in the first minute of reperfusion compared with the S, P, and the last minute of reperfusion, while this parameter was significantly decreased in the last minute of reperfusion compared with the S and P. In the verapamil

group, the dp/dt max was significantly decreased after acute administration of verapamil (P) in comparison with the S, the first and the last minute of reperfusion. While in the amlodipine and nicorandil groups this parameter was significantly increased in the last minute in comparison with the first minute of reperfusion.

The dp/dt max was significantly decreased in the first minute of reperfusion in amlodipine and nicorandil groups compared with sham group. In the last minute of reperfusion values, this parameter was almost similar in those groups but significantly increased compared with I/R control group. Also, acute preconditioning in the verapamil, amlodipine, and nicorandil groups significantly decreased the dp/dt max

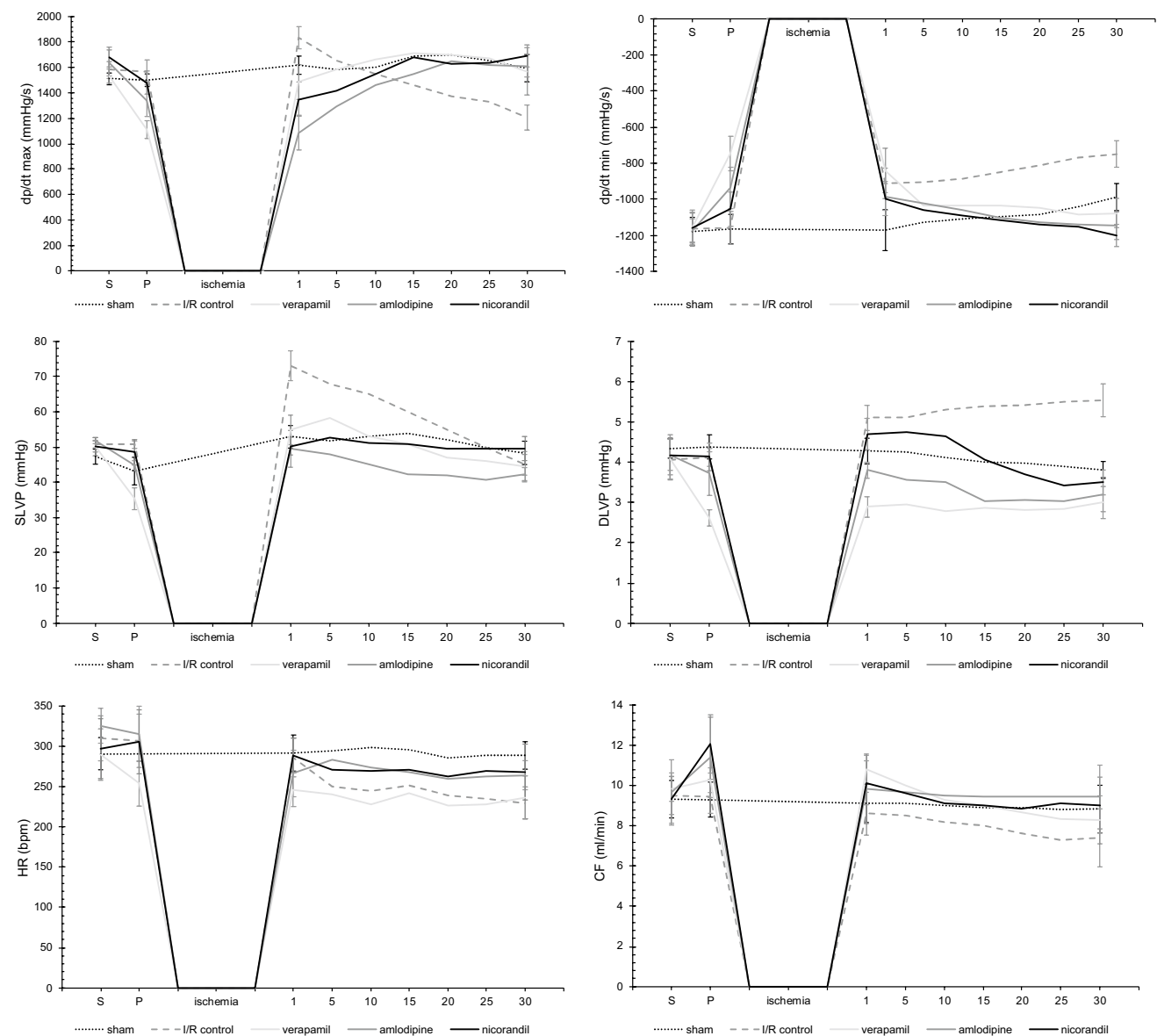


Fig. 1 Effects of pharmacological preconditioning on cardiodynamic parameters of isolated rat heart

Table 1 The effects of the ex vivo preconditioning with verapamil, amlodipine, or nicorandil on the cardiodynamic parameters of the isolated rat heart

	dp/dt max (mmHg)	dp/dt min (mmHg)	SLVP (mmHg)	DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (mL/min)
Sham						
S	1510.60 ± 46.03	- 1179.97 ± 78.62	47.31 ± 2.15	4.35 ± 0.25	290.87 ± 20.07	9.32 ± 0.93
P	1500.11 ± 50.21	- 1165.60 ± 81.21	43.20 ± 3.91	4.38 ± 0.29	290.85 ± 19.21	9.31 ± 0.87
1	1617.47 ± 71.68 ^{cd}	- 1171.87 ± 112.94	52.93 ± 3.20 ^a	4.28 ± 0.32 ^b	291.69 ± 22.34	9.12 ± 0.96
30	1594.43 ± 106.92 ^a	- 988.12 ± 75.42	48.37 ± 3.28	3.81 ± 0.21 ^a	288.73 ± 17.16	8.83 ± 1.18
I/R control						
S	1580.02 ± 67.32	- 1163.21 ± 90.73	50.80 ± 0.95	4.07 ± 0.50	310.12 ± 28.36	9.52 ± 0.94
P	1571.99 ± 65.48	- 1159.93 ± 90.33	50.73 ± 1.09	4.12 ± 0.23	307.89 ± 33.01	9.46 ± 0.84
1	1835.21 ± 87.21 ^{*#}	- 912.12 ± 84.37	73.12 ± 4.23 ^{*#}	5.10 ± 0.31 ^{*#}	286.54 ± 24.11	8.64 ± 1.06
30	1206.03 ± 98.21 ^{*#§}	- 749.13 ± 73.47 ^{*#§}	45.09 ± 2.94 [§]	5.54 ± 0.41 ^{*#}	231.12 ± 20.01 ^{*#§}	7.40 ± 1.44 ^{*#§}
Verapamil						
S	1531.67 ± 56.03	- 1157.67 ± 80.70	50.27 ± 1.70	4.08 ± 0.50	289.78 ± 32.05	9.83 ± 0.62
P	1110.75 ± 71.05 [*]	- 746.82 ± 96.19 [*]	35.35 ± 3.09 [*]	2.62 ± 0.21 [*]	254.02 ± 28.01	10.27 ± 0.62
1	1485.71 ± 136.87 ^{#a}	- 840.45 ± 123.32 [*]	54.92 ± 4.17 ^{#a}	2.89 ± 0.25 [*]	246.28 ± 21.12	10.80 ± 0.70 ^a
30	1569.96 ± 185.84 ^{#a}	- 1076.77 ± 81.21 ^{#§a}	44.63 ± 4.12 [#]	3.00 ± 0.41 ^{*a}	236.38 ± 26.73	8.30 ± 1.19 ^{*#§}
Amlodipine						
S	1635.08 ± 102.45	- 1175.02 ± 67.43	51.87 ± 0.88	4.18 ± 0.49	325.55 ± 21.58	9.70 ± 1.58
P	1337.43 ± 123.74	- 937.75 ± 114.91 [*]	44.75 ± 1.41 ^{*b}	3.72 ± 0.54	315.45 ± 34.36	11.40 ± 1.99 ^a
1	1087.35 ± 136.74 ^a	- 987.32 ± 74.41 [*]	49.52 ± 5.23 ^a	3.80 ± 0.19 ^b	266.32 ± 28.90	9.83 ± 1.72
30	1614.25 ± 89.21 ^{§a}	- 1147.17 ± 76.62 ^{#a}	42.15 ± 2.03 [*]	3.20 ± 0.43 ^a	264.18 ± 18.87 [*]	9.43 ± 1.58 ^a
Nicorandil						
S	1682.60 ± 77.14	- 1157.97 ± 97.74	50.18 ± 2.59	4.18 ± 0.39	297.21 ± 37.19	9.33 ± 1.29
P	1480.83 ± 90.36	- 1056.07 ± 95.34	48.52 ± 3.61 ^b	4.13 ± 0.34 ^b	305.78 ± 39.74	12.07 ± 1.44 ^a
1	1351.01 ± 135.02 ^a	- 996.52 ± 94.38	50.32 ± 2.52 ^a	4.70 ± 0.39 ^{*#bc}	289.45 ± 21.06	10.13 ± 1.09
30	1691.31 ± 86.80 ^{§a}	- 1201.01 ± 61.73 ^a	49.62 ± 3.41	3.50 ± 0.31 ^a	268.17 ± 34.62	9.03 ± 1.39

The values are expressed as means ± SD

Statistical significance compared with the S value in the group ($p < 0.05$); #Statistical significance compared with the P value in the group (# $p < 0.05$); §Statistical significance compared with the 1 value in the group (§ $p < 0.05$)

^aSignificant difference in comparison to the same point in the I/R control group (^a $p < 0.05$); ^bSignificant difference in comparison to the same point in the verapamil group (^b $p < 0.05$); ^cSignificant difference in comparison to the same point in the amlodipine group (^c $p < 0.05$); ^dSignificant difference in comparison to the same point in the amlodipine group (^d $p < 0.05$)

in the first minute of reperfusion, in comparison with I/R control group (Fig. 1; Table 1).

Minimum rate of left ventricular pressure development (dp/dt min)

The dp/dt min was significantly decreased in the last minute of reperfusion compared with the S, P, and the first minute of reperfusion in the I/R control group. Preconditioning with verapamil and amlodipine (P) significantly decreased the dp/dt min in comparison with the S and the last minute of reperfusion. This parameter was also decreased in the first minute of reperfusion compared with S in both groups (verapamil and amlodipine) and increased in the last minute compared with the first minute of reperfusion in the verapamil group.

Preconditioning with mentioned drugs in all examined groups significantly decreased the dp/dt min in the last

minute of reperfusion compared to the I/R control group, but values of dp/dt max in experimental groups were almost similar to dp/dt max value of sham group (Fig. 1; Table 1).

Systolic pressure in the left ventricle (SLVP)

SLVP was significantly increased in the first minute of reperfusion compared with S, P, and the last minute of reperfusion in the I/R control group. This parameter was decreased after ex vivo administrated verapamil (P) compared with the S, the first and the last minute of reperfusion in the verapamil group. In the amlodipine group, SLVP was significantly decreased after administration of amlodipine (P) and in the last minute of reperfusion compared to the S.

SLVP was significantly decreased in the first minute of reperfusion in all experimental groups and sham group in comparison with the I/R control group. On the other hand,

SLVP was significantly lower after preconditioning with verapamil than after preconditioning with amlodipine or nicorandil (Fig. 1; Table 1).

Diastolic pressure in the left ventricle (DLVP)

In the I/R control group, there was a significant increase of DLVP in the first and in the last minute of reperfusion compared with the S and P. In the verapamil group DLVP was significantly decreased in the P point, the first, and in the last minute of reperfusion compared to the S. In nicorandil group, DLVP was significantly increased in the first minute of reperfusion compared with the S and P.

In all examined groups, DLVP was significantly lower than in the I/R control group in the last minute of reperfusion. DLVP was significantly lower after administration of verapamil compared to sham group and after administration of nicorandil. In the first minute of reperfusion, DLVP was significantly higher in the nicorandil group compared to the amlodipine and verapamil group, and also in the amlodipine and sham group compared to the verapamil group (Fig. 1; Table 1).

Heart rate (HR)

In I/R control group the HR was significantly decreased in the last minute of reperfusion compared with the S, P, and the first minute of reperfusion, while in the amlodipine

group the HR was significantly decreased in the last minute of reperfusion compared with the S (Fig. 1; Table 1).

Coronary flow (CF)

Values of CF were significantly decreased in the last minute of reperfusion compared with the S, P, and the first minute of reperfusion in the I/R control and in the verapamil group.

CF was significantly increased after preconditioning with amlodipine or nicorandil than in the I/R control group. On the other hand, CF was significantly increased in verapamil group in the first minute of reperfusion and in amlodipine group in the last minute of reperfusion compared to the I/R control group (Fig. 1; Table 1).

Effects of pharmacological preconditioning on pro-oxidative parameters (O_2^- , NO_2^- , H_2O_2 , TBARS) in the coronary venous effluent

Index of lipid peroxidation

The TBARS concentration was significantly increased in the first minute of reperfusion and after preconditioning with Krebs–Henseleit solution (P) compared with the first and the last minute of reperfusion in I/R control group.

The TBARS concentration was almost similar in sham and experimental groups during whole experimental protocol. In the first minute of reperfusion, the TBARS

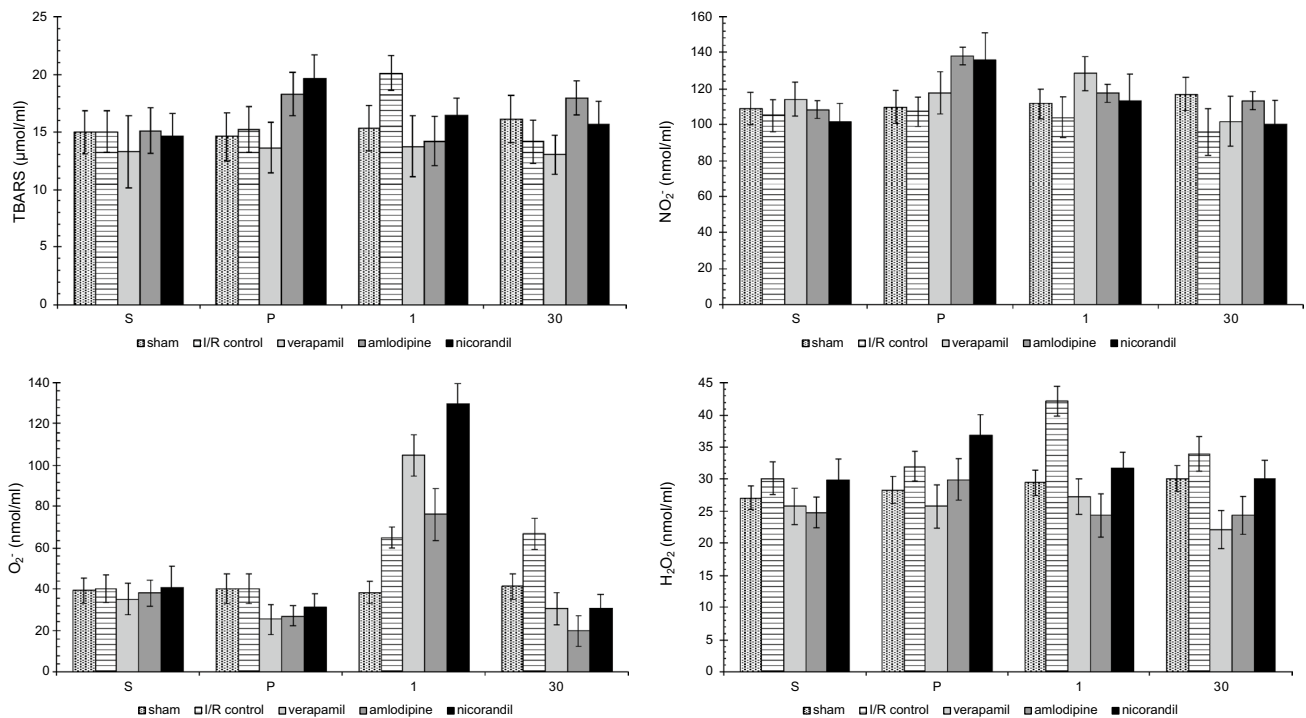


Fig. 2 Effects of pharmacological preconditioning on pro-oxidative parameters in the coronary venous effluent of isolated rat heart

Table 2 The effects of the ex vivo preconditioning with verapamil, amlodipine, or nicorandil on the biomarker of oxidative stress in isolated rat heart

	TBARS ($\mu\text{mol/mL}$)	NO_2^- (nmol/mL)	O_2^- (nmol/mL)	H_2O_2 (nmol/mL)
Sham				
S	14.96 \pm 1.87	109.10 \pm 8.97	39.21 \pm 6.12	27.1 \pm 2.81
P	14.57 \pm 2.10	109.90 \pm 9.21	40.13 \pm 7.23	28.3 \pm 3.03 ^d
1	15.32 \pm 1.97	111.50 \pm 8.34	38.51 \pm 5.3 ^{abcd}	29.4 \pm 2.75 ^a
30	16.12 \pm 2.05	117.20 \pm 9.25	41.19 \pm 6.21 ^c	30.1 \pm 2.94 ^b
I/R control				
S	15.02 \pm 1.81	105.02 \pm 8.85	40.30 \pm 6.72	30.15 \pm 2.54
P	15.21 \pm 2.01	107.12 \pm 8.14	43.23 \pm 7.12	32.02 \pm 2.32
1	20.11 \pm 1.50 ^{*#}	104.11 \pm 11.37	65.01 \pm 5.03 ^{*#}	42.12 \pm 2.32 ^{*#}
30	14.12 \pm 1.89 [§]	95.97 \pm 13.08	66.80 \pm 7.40 ^{*#}	33.97 \pm 2.70
Verapamil				
S	13.28 \pm 3.13	114.28 \pm 9.39	35.24 \pm 7.67	25.72 \pm 2.84
P	13.65 \pm 2.19	117.75 \pm 11.82	25.25 \pm 7.22 ^a	25.70 \pm 3.37
1	13.76 \pm 2.65 ^a	128.40 \pm 10.38	104.81 \pm 10.03 ^{*#}	27.27 \pm 2.77 ^a
30	13.01 \pm 1.69	101.88 \pm 13.88	30.45 \pm 7.84 ^{§a}	22.17 \pm 2.97 ^a
Amlodipine				
S	15.12 \pm 1.98	108.40 \pm 15.33	38.05 \pm 6.25	24.77 \pm 2.39
P	18.30 \pm 1.89 ^b	138.10 \pm 17.66	27.11 \pm 4.87	29.97 \pm 3.23
1	14.20 \pm 2.15 ^a	117.49 \pm 17.91	76.16 \pm 12.60 ^{*#b}	24.36 \pm 3.36 ^a
30	17.96 \pm 1.50 ^b	113.50 \pm 11.00	19.80 \pm 7.43 ^{§a}	24.37 \pm 2.92
Nicorandil				
S	14.60 \pm 2.01	101.41 \pm 10.59	40.98 \pm 10.14	29.83 \pm 3.30
P	19.67 \pm 2.02 ^b	135.67 \pm 15.50	31.28 \pm 6.53	36.81 \pm 3.20 ^{ab}
1	16.42 \pm 1.53 ^a	113.59 \pm 14.58	129.57 \pm 10.10 ^{*#abc}	31.82 \pm 2.37 ^a
30	15.67 \pm 1.98	100.13 \pm 13.46	30.65 \pm 6.77 ^{§a}	30.01 \pm 2.94 ^b

The values are expressed as means \pm SD

*Statistical significance compared with the S value in the group ($*p < 0.05$); #Statistical significance compared with the P value in the group ($#p < 0.05$); §Statistical significance compared with the 1 value in the group ($§p < 0.05$)

^aSignificant difference in comparison to the same point in the control group ($^ap < 0.05$); ^bSignificant difference in comparison to the same point in the verapamil group ($^bp < 0.05$); ^cSignificant difference in comparison to the same point in the amlodipine group ($^cp < 0.05$)

concentration was significantly lower in all experimental groups (verapamil, amlodipine, and nicorandil) compared to the I/R control group. The TBARS concentration was lower after preconditioning by verapamil than by amlodipine or nicorandil. However, in the last minute of reperfusion, TBARS concentration was significantly higher in the amlodipine than in the verapamil group (Fig. 2; Table 2).

Nitrite determination

All examined groups (controls and experimental) had a similar level of the NO_2^- during whole experimental protocol (Fig. 2; Table 2).

Superoxide determination

The O_2^- level was significantly increased in the first and the last minute of reperfusion compared with the S and P point in the I/R control group, while in the rest groups the level of this parameter was significantly increased in the first minute of reperfusion compared with the S, P, and the last minute of reperfusion.

In the first minute of reperfusion, the O_2^- level was significantly increased in I/R control and experimental groups compared to sham group and in the nicorandil group compared with the I/R control, verapamil, and amlodipine group, as well as in the verapamil group compared to the I/R control and amlodipine groups. However, in the last minute of reperfusion the O_2^- level was significantly increased in the sham group compared with the amlodipine group and also in the I/R control group compared with

the sham, verapamil, amlodipine, and nicorandil groups (Fig. 2; Table 2).

Hydrogen peroxide determination

In the first minute of reperfusion, the H_2O_2 level was significantly increased compared with the S, P, and the last minute of reperfusion in the I/R control group.

The H_2O_2 level was significantly increased in the I/R control group than in sham and all experimental groups in the first minute of reperfusion. While at the last minute of reperfusion, the H_2O_2 level was significantly increased in the sham, I/R control, and nicorandil groups than in the verapamil group. Also, after preconditioning by nicorandil, the H_2O_2 level was significantly higher than in sham group and after preconditioning by amlodipine or verapamil (Fig. 2; Table 2).

Discussion

The aim of the present study was to examine and compare the effects of the acute administration of verapamil, amlodipine, or nicorandil to cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers on I/R injury in the isolated rat heart.

Due to different mechanisms of action, we thought it would be important to examine acute effects of both mentioned CCBs on I/R injury in the isolated rat heart. Actually, amlodipine (as a representative of dihydropyridine) induces peripheral vasodilatation and has a very little effect on myocardial contractility and sinus node automaticity, while on the other hand verapamil (as a representative of phenylalkylamine) has less influence on peripheral vascular smooth musculature and direct effects on cardiac inotropy and chronotropy [23, 24].

As we mentioned earlier, we used a Langendorff-isolated heart system to study the ex vivo effects of pharmacological preconditioning by verapamil, amlodipine, or nicorandil. This model allows a functional assessment of pharmacological treatments in real time and immediate delivery of the drug directly to the myocardium. Although in vivo ischemia models of reperfusion injury provide very useful results, they are not as effective for studying the functional effects of an I/R injury acutely in real time [16, 25].

During the first phase of our investigation, we focused on the effects of pharmacological preconditioning on the aforementioned cardiodynamic parameters, which served as indicators of myocardial function. Our results suggest that preconditioning with L-type CCBs (verapamil, amlodipine) or mitochondrial K_{ATP} opener (nicorandil) has improved recovery of contractile function (measured as dp/dt max and dp/dt min) during reperfusion. Comparing the values

of the parameters of myocardial contractility, we note that there are no significant differences between experimental groups. Each of the acutely administered drugs significantly contributed to the improvement of myocardial contractility after global ischemia. Although preconditioning with verapamil led to an initial significant decrease of dp/dt max and dp/dt min, during reperfusion, these parameters were increased and reached values similar to the S. (Fig. 1; Table 1). A previous investigation from our laboratory on a different model of isolated rat heart showed that acute administered verapamil in a dose of 3 $\mu\text{mol/L}$ also significantly reduced contractile parameters [26]. Bearing in mind that verapamil blocks calcium influx and has direct negative inotropic effects, these effects are consistent with its mechanism of action [27]. Our results are in correlation with results obtained by Tang and coworkers. They reported that orally administered verapamil at doses of 0, 3, 10, and 30 mg/kg decreases dp/dt max in the telemetered rat [28]. Similar results of contractile function were obtained in the group where the hearts were preconditioned with amlodipine, the second examined CCBs in this study. Hearts from amlodipine group took a little more time during reperfusion to return value of contractile parameters (primarily dp/dt max) to initial (Fig. 1; Table 1). Potential differences between preconditioning with amlodipine and verapamil are probably caused by a different mechanism of action of these drugs. Namely, amlodipine is long-acting, lipophilic, third-generation dihydropyridine CCBs and binds to both dihydropyridine and non-dihydropyridine binding sites. Dihydropyridines selectively inhibit calcium ion influx into vascular smooth muscle cells and myocardial cells, with a greater effect on vascular smooth muscle cells than on cardiac muscle cells [13, 29]. On the other hand, the least fluctuations in the contractile function are in the group where the hearts are preconditioned with nicorandil (Fig. 1; Table 1). Previous published papers have also provided that nicorandil, as a K_{ATP} channel opener and a NO donor, improves the recovery of the post-ischaemic contractile dysfunction of the heart [30, 31]. Preconditioning with nicorandil affects the mitochondrial membrane potential and does not allow mitochondrial dysfunction to occur which would contribute to the development and progression of cardiac remodeling and reduced contractility [32].

Application of examined drugs, before global ischemia, significantly improved SLVP and DLVP values during reperfusion. The values of SLVP were similar in all pharmacological preconditioned groups, except in the P point where verapamil caused a significant reduction of SLVP. In contrast to the SLVP, DLVP values were significantly different between groups during the first minutes of reperfusion. The highest values were in the group of hearts preconditioned with nicorandil, then amlodipine, and the lowest values were in the verapamil group. Preconditioning

with verapamil significantly reduced values of DLVP and these reduced values were maintained during reperfusion (Fig. 1; Table 1). It is well known that CCBs are widely used for the treatment of hypertension. Regardless of groups, all CCBs bind to alpha-1c subunit of the L-type calcium channel and block the entrance of extracellular Ca^{2+} , resulting in decrease of contractility, lowering of systolic and diastolic pressures, and vascular smooth muscle relaxation [33]. The results of this study correlate with the results of Davitt and coauthors, who also induced reduction of DLVP in rat heart after 5-min long administration of verapamil (300 nM/L) [34]. A clinical study by Okamura has shown that nicorandil, as a nitrite-like antianginal drug, improves coronary circulation without changing the systemic blood pressure [35].

Although there were no significant differences between I/R control and experimental groups, it is clear that HR decreased over time in the I/R control group (Fig. 1; Table 1). Taking into account low doses as well as a short time of exposure to the investigated drugs, results obtained in our study were expected. In a previously mentioned study from our laboratory, administered in a higher dose, verapamil induces a significant decrease of HR [26]. CCBs are known to have the negative inotropic effect and that this action varies among agents [36]. In an experimental study, it has been shown that nicorandil prevents ventricular tachycardia during acute global ischemia in canine left ventricular wedges [37]. Furthermore, intravenously applied nicorandil reduces QT dispersion in humans after percutaneous transluminal coronary angioplasty of the right coronary artery or after acute myocardial infarction, respectively [38, 39].

After administration of amlodipine or nicorandil, the CF was significantly increased in comparison with the I/R control group (Fig. 1; Table 1). The underlying mechanisms could be the increase of coronary flow mediated by the increased amount of nitric oxide and the attenuation of Ca^{2+} inflow in vascular smooth muscle cells [40, 41]. Serizawa and coworkers have reported that nicorandil could prevent endothelial dysfunction by upregulating NO and downregulating the level of endothelin-1 [42, 43].

Considering that values of all measured cardiodynamic parameters of experimental groups were mostly similar to values of the sham group in contrast to I/R control group, examined drugs preserved the isolated heart of rats and improve *ex vivo* I/R injury.

During the next phase of our investigation, we focused on the effects of pharmacological preconditioning on the previously mentioned markers of oxidative stress.

Our results suggested that preconditioning with amlodipine and nicorandil results in a significant increase of TBARS, while on the end of preconditioning the highest values of TBARS were in amlodipine group. Based on our results, we notice that verapamil kept the initial values throughout the experimental protocol, while nicorandil

and amlodipine led to a pick of TBARS concentration after their administration. During reperfusion, concentration of TBARS has returned to the stabilization in nicorandil group, while amlodipine groups remained at elevated concentration. None of the examined drugs led to an increase of TBARS concentration in the first minute of reperfusion, as it was in I/R control group (Fig. 2; Table 2). Allah and coauthors reported that concomitant treatment of verapamil and ferrous sulfate induced increase in serum total antioxidant capacity and decline of serum total peroxide, in contrast to the group treated only with ferrous sulfate [44]. In previous work from our laboratory, verapamil did not induce significant changes in values of TBARS [26]. Alam and coworkers in their study on Swiss albino mice showed that amlodipine decreased TBARS levels in a dose-dependent manner [45]. Literature data suggest that CCBs can inhibit lipid peroxidation if they accumulate in cardiac membranes in sufficiently higher concentrations than in serum *in vivo* [24]. Given that dihydropyridines are highly vascular selective, while verapamil is relatively selective for the myocardium, it could be a reason for higher concentration of TBARS after preconditioning by amlodipine than by verapamil [23]. Abdel-Raheem and coworkers investigated the cardioprotective effect of the nicorandil, on cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats. They showed that nicorandil prevented the doxorubicin-induced elevation in TBARS levels and decreased its elevated levels [46].

In all examined groups there were no changes in NO_2^- level during the whole experimental protocol, while O_2^- level was significantly different between groups during early minutes of reperfusion. The highest values were in the group of hearts preconditioned with nicorandil, then verapamil, and the lowest values were in the amlodipine group. However, in all experimental group, level of O_2^- has returned to the stabilization level during reperfusion. The most significant effect of pharmacological preconditioning in our model is the reduction in H_2O_2 values relative to the I/R control group (Fig. 2; Table 2). The improved cardiac functions could be due to the availability of CCBs and nicorandil to scavenging free radicals generated during early minutes of reperfusion. Some previous studies have shown that pretreatment with verapamil reduces cell death induced by H_2O_2 by decreasing caspase-3 expression [47]. Da Hyun Lee and other authors showed that verapamil activates nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and protect cells from oxidative damage in human and rodent tissues [48]. Several previously published papers support our findings that amlodipine, a highly lipophilic CCBs, reduce oxidative stress. The antioxidative activity of amlodipine is attributed to its high lipophilicity and chemical structure that facilitates proton donation and stabilize the free radical reaction [49]. Nicorandil has been shown to be cardioprotective through inhibition of cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative

stress and hypoxia. It is considered that nicorandil inhibits oxidative stress-induced apoptosis in cardiac myocytes through a nitric oxide/cGMP-dependent mechanism as well as by activating mitochondrial K_{ATP} channels [50].

CCBs exert their beneficial effects on myocardium probably by inhibiting the action of slow Ca^{2+} inward current through the L-type Ca^{2+} channels in the cardiac cells. Verapamil reduces oxygen demand by reducing afterload, preload, and contractility; improves oxygen supply to the ischemic zone; preserves the mitochondrial structure and function; and reduces the availability of calcium to stimulate ATPase, protease, and lipase [51, 52]. On the other hand, a mitochondrial K_{ATP} channel opener mimics the effect of an ischemic precondition and achieving a protective role in the heart reduces the size of myocardial infarction thereby depolarizing the mitochondrial membrane and preventing mitochondrial Ca^{2+} overload [18, 30].

In summary, our findings clearly indicate that the blocking of the calcium channel or the activation of K_{ATP} may mediate the protective effect of myocardial preconditioning. The *ex vivo* results showed that all examined drugs have beneficial cardioprotective properties after ischemia and reperfusion. Obtained effects seem to be the most convincing in case of nicorandil. Administration of all agents was associated with lower values of major pro-oxidative molecules indicating that accomplished effects could at least in part be consequential in their antioxidative properties.

Taking into account that the investigated ion modulators proved to be excellent agents in the preconditioning model future research should consider their combined application that could provide even better results.

References

1. Yang Q, He GW, Underwood MJ, Yu CM (2016) Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection. *Am J Transl Res* 8:765
2. Cadenas S (2018) ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med* 117:76–89
3. Kiselyov K, Muallem S (2016) ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium* 60:108–114
4. Cao CM, Xia Q, Gao Q, Chen M, Wong TM (2005) Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 312:644–650
5. Kwong JQ, Molkenin JD (2015) Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab* 21:206–214
6. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, Punzetti S, Pavesini R, Wieckowski MR, Campo G, Pinton P (2015) Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 78:142–153
7. Altamirano F, Wang ZV, Hill JA (2015) Cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *J Physiol* 593:3773–3788
8. Kojima A, Fukushima Y, Ito Y, Ding WG, Kitagawa H, Matsuura H (2018) TRPC channel blockers improve ventricular contractile functions after ischemia/reperfusion in a Langendorff-perfused mouse heart model. *J Cardiovasc Pharmacol*. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000566>
9. Piper HM, Meuter K, Schafer C (2003) Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 75:S644–S648
10. Hausenloy DJ, Yellon DM (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 123:92–100
11. Venkatesh N, Lamp ST, Weiss J-N (1991) Sulfonylureas, ATP-sensitive K_1 channels, and cellular K_1 loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circ Res* 69:623–637
12. Nichols CG (2016) Adenosine triphosphate-sensitive potassium currents in heart disease and cardioprotection. *Card Electrophysiol Clin* 8:323–335
13. Simonovic N, Jeremic J (2017) Role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning. *Ser J Exp Clin Res* 18:281–287
14. Gross GJ, Auchampach JA, Maruyama M, Warltier DC, Pieper GM (1992) Cardioprotective effects of nicorandil. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:S22–8
15. Ahmed LA, Salem HA, Attia AS, Agha AM (2011) Pharmacological preconditioning with nicorandil and pioglitazone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 663:51–58
16. Herr DJ, Aune SE, Menick DR (2015) Induction and assessment of Ischemia-reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J Vis Exp* 101:e52908
17. Miyawaki H, Ashraf M (1997) Ca^{2+} as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res* 80:790–799
18. Mitani A, Kinoshita K, Fukamachi K, Sakamoto M, Kurisu K, Tsuruhara Y, Fukumura F, Nakashima A, Tokunaga K (1991) Effects of glibenclamide and nicorandil on cardiac function during ischemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am J Physiol* 261:H1864–71
19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 351:8–16
20. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 131:8–17
21. Auclair C, Voisin E (1985) Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton 123:32–48
22. Pick E, Keisari Y (1980) A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161–170
23. Lefrandt JD, Heitmann J, Sevre K, Castellano M, Hausberg M, Fallon M, Urbigheit A, Rostrup M, Agabiti-Rosei E, Rahn KH, Murphy M, Zannad F, de Kam PJ, Smit AJ (2001) Contrasting effects of verapamil and amlodipine on cardiovascular stress responses in hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 52:687–692
24. Sugawara H, Tobise K, Kikuchi K (1996) Antioxidant effects of calcium antagonists on rat myocardial membrane lipid peroxidation. *Hypertens Res* 19:223–228
25. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szeląg A, Schulz R (2007) Isolated heart perfusion according to Langendorff—still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods* 55:113–126
26. Stojic I, Srejsovic I, Zivkovic V, Jeremic N, Djuric M, Stevanovic A, Milanovic T, Djuric D, Jakovljevic V (2017) The effects of verapamil and its combinations with glutamate and glycine on

- cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart. *J Physiol Biochem* 73:141–153
27. Tang L, El-Din TMG, Swanson TM, Pryde DC, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2016) Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca^{2+} channel by Ca^{2+} antagonist drugs. *Nature* 537:117
 28. Tang HM, Ju H, Zhao S, LaDuke C, Hahn S, Glick J, Carey C, Friedrichs GS (2016) Translational assessment of cardiac contractility by echocardiography in the telemetered rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 77:24–32
 29. Fares H, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lavie CJ (2016) Amlodipine in hypertension: a first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes. *Open Heart* 3:e000473
 30. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, Seguchi O, Myoishi M, Minamino T, Ohara T, Nagai Y, Nanto S, Watanabe K, Fukuzawa S, Hirayama A, Nakamura N, Kimura K, Fujii K, Ishihara M, Saito Y, Tomoike H, Kitamura S, investigators JW (2007) Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (j-wind): two randomised trials. *Lancet* 370:1483–1493
 31. Ishii H, Ichimiya S, Kanashiro M, Amano T, Imai K, Murohara T, Matsubara T (2005) Impact of a single intravenous administration of nicorandil before reperfusion in patients with st-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* 112:1284–1288
 32. Wang S, Fan Y, Feng X, Sun C, Shi Z, Li T, Lv J, Yang Z, Sun D (2018) Nicorandil alleviates myocardial injury and post-infarction cardiac remodeling by inhibiting Mst1. *Biochem Biophys Res Commun* 495:292–299
 33. Cleophas TJ, van Marun R (2001) Meta-analysis of efficacy and safety of second-generation dihydropyridine calcium channel blockers in heart failure. *Am J Cardiol* 87:487–490
 34. Davitt K, Hensley L, Clements-Jewery H (2016) Verapamil but not lidocaine suppresses ischemia-induced ventricular fibrillation in the isolated female rat heart. *FASEB J* 30:1274–1278
 35. Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Shimizu M, Nishii T, Taniyam Y, Asai T, Takiuchi S, Moriguchi K, Ohkuro M, Komai N, Yamada K, Inamoto N, Otsuka A, Higaki J, Ogihara (2001) Additive effects of nicorandil on coronary blood flow during continuous administration of nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol* 37:719–725
 36. Curt FD, Psaty MB, Meyer VJ (1995) Nifedipine dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation* 92:1326–1331
 37. Hirose M, Tsujino N, Nakada T, Yano S, Imamura H, Yamada M (2008) Mechanisms of preventive effect of nicorandil on ischemia-induced ventricular tachyarrhythmia in isolated arterially perfused canine left ventricular wedges. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:504–514
 38. Ueda H, Hayashi T, Tsumura K, Yoshimaru K, Nakayama Y, Yoshikawa J (2004) Intravenous nicorandil can reduce QT dispersion and prevent bradyarrhythmia during percutaneous transluminal coronary angioplasty of the right coronary artery. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 9:179–184
 39. Ueda H, Nakayama Y, Tsumura K, Yoshimaru K, Hayashi T, Yoshikawa J (2004) Intravenous nicorandil can reduce the occurrence of ventricular fibrillation and QT dispersion in patients with successful coronary angioplasty in acute myocardial infarction. *Can J Cardiol* 20:625–629
 40. Ok SH, Kwon SC, Kang S, Choi MJ, Sohn JT (2014) Mepivacaine-induced intracellular calcium increase appears to be mediated primarily by calcium influx in rat aorta without endothelium. *Korean J Anesthesiol* 67:404–411
 41. Sahara M, Sata M, Morita T, Hirata Y, Nagai R (2012) Nicorandil attenuates monocrotaline-induced vascular endothelial damage and pulmonary arterial hypertension. *PLoS ONE* 7:e33367
 42. Serizawa K, Yogo K, Aizawa K, Tashiro Y, Ishizuka N (2011) Nicorandil prevents endothelial dysfunction due to antioxidative effects via normalisation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase in streptozotocin diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 10:105
 43. Chen Z, Chen X, Li S, Huo X, Fu X, Dong X (2015) Nicorandil improves myocardial function by regulating plasma nitric oxide and endothelin-1 in coronary slow flow. *Coron Artery Dis* 26:114
 44. Abd Allah ES, Ahmed MA, Abdel Mola AF (2014) Comparative study of the effect of verapamil and vitamin D on iron overload-induced oxidative stress and cardiac structural changes in adult male rats. *Pathophysiology* 21:293–300
 45. Alam M, Singh BK, Kumar V (2015) Amlodipine potentiates the protective effect of zonisamide on pentylentetrazol-induced kindling in mice. *Drug Dev Ther* 6:88
 46. Abdel-Raheem IT, Taye A, Abouziad MM (2013) Cardioprotective effects of nicorandil, a mitochondrial potassium channel opener against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 113:158–166
 47. Wang Z, Wang D, Li Y, Zhang X (2014) Protective effects of verapamil against H_2O_2 -induced apoptosis in human lens epithelial cells. *Biomol Ther* 22:553–557
 48. Da Hyun Lee JSP, Lee YS, Sung SH, Lee YH, Bae SH (2017) The hypertension drug, verapamil, activates Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic Keap1 degradation and prevents acetaminophen-induced cytotoxicity. *BMB Rep* 50:91
 49. Tanaka M, Nishimura R, Nishimura T, Kawai T, Meguro S, Irie J, Saisho Y, Itoh H (2014) Effect of single tablet of fixed-dose amlodipine and atorvastatin on blood pressure/lipid control, oxidative stress, and medication adherence in type 2 diabetic patients. *Diabetol Metab Syndr* 6:56
 50. Nagata K, Obata K, Odashima M, Yamada A, Somura F, Nishizawa T, Ichihara S, Izawa H, Iwase M, Hayakawa A, Murohara T, Yokota M (2003) Nicorandil inhibits oxidative stress-induced apoptosis in cardiac myocytes through activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and a nitrate-like effect. *J Mol Cell Cardiol* 35:1505–1512
 51. Yui H, Imaizumi U, Beppu H, Ito M, Furuya M, Arisaka H, Yoshida KI (2011) Comparative effects of verapamil, nifedipine, and nitroglycerin on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Anesthesiol Res Pract*. <https://doi.org/10.1155/2011/521084>
 52. Yu W, Wang JJ, Gan WY, Lin GS, Huang CX (2010) Effects of verapamil preconditioning on cardiac function in vitro and intracellular free Ca^{2+} and L-type calcium current in rat cardiomyocytes post ischemia-reperfusion injury. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 38:225–229

ROLE OF CALCIUM CHANNEL BLOCKERS IN MYOCARDIAL PRECONDITIONING

Nina Simonovic¹, Jovana Jeremic²

¹Health Center "Voždovac", Belgrade, Serbia

²Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

ULOGA BLOKATORA KALCIJUMSKIH KANALA U PREKONDICIONIRANJU SRCA

Nina Simonović¹, Jovana Jeremić²

¹Klinički Centar Voždovac, Beograd, Srbija

²Katedra za farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

*The authors Jovana Jeremic and Nina Simonovic contributed equally to this manuscript

*Autori Jovana Jeremić i Nina Simonović su podjednako učestvovali u svim elementima izrade ove studije

Received / Priljen: 10. 05. 2016.

Accepted / Prihvaćen: 10. 05. 2016.

ABSTRACT

Coronary heart disease is the leading cause of mortality and morbidity worldwide. The effects of coronary heart disease are usually attributable to the detrimental effects of acute myocardial ischaemia-reperfusion injury. Newer strategies such as ischaemic or pharmacological preconditioning have been shown to condition the myocardium to ischaemia-reperfusion injury and thus reduce the final infarct size. This review investigates the role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning. Additionally, special attention is given to nicorandil whose mechanism of action may be associated with the cardioprotective effects of preconditioning. There are still many uncertainties in understanding the role of these agents in preconditioning, but future research in this direction will certainly help reduce coronary heart disease.

Keywords: Preconditioning, Calcium channel blockers, Nicorandil

SAŽETAK

Koronarna bolest srca je vodeći uzrok mortaliteta i morbiditeta širom sveta. Efekti koronarne bolesti srca se najčešće pripisuju štetnim efektima akutnog infarkta, odnosno ishemijsko-reperfuzionij povredi. Novije strategije, kao što su ishemijsko i farmakološko prekondicioniranje, su pokazale da uticajem na ishemijsko-reperfuzione povrede srca konačna veličina infarkta može biti smanjena. Ovaj pregledni članak ispituje ulogu blokatora kalcijumskih kanala u prekondicioniranju srca. Takođe, posebna pažnja je posvećena nikorandilu, čiji bi mehanizam dejstva mogao biti povezan sa kardioprotektivnim efektima prekondicioniranja. Još uvek postoji mnogo nejasnoća u razumevanju uloge ovih lekova u prekondicioniranju ali buduća istraživanja u ovom pravcu bi svakako doprinela smanjenju koronarne bolesti srca.

Ključne reči: Prekondicioniranje, Blokatori kalcijumskih kanala, Nikorandil



ABBREVIATIONS

ATP - Adenosine triphosphate
CCBs - Calcium channel blockers
CHD - Coronary heart disease
I/R - Ischaemia-reperfusion

IPC - Ischaemic preconditioning
K(ATP) - ATP-sensitive K⁺
PKC - protein kinase C
ROS - reactive oxygen species

INTRODUCTION

Coronary heart disease (CHD) is the leading cause of mortality and morbidity worldwide. According to the World Health Organization, 12.8% of all deaths result from CHD. The effects of CHD are usually attributable to the detrimental effects of acute myocardial ischaemia-reperfusion (I/R) injury (1, 2). This injury includes different clinical manifestations such as myocardial necrosis, arrhythmia,

myocardial stunning and endothelial and microvascular dysfunction. Depending on the severity of the condition, the patient may be treated with medications, surgery or both. The treatment includes the use of thrombolytic agents, beta-antagonists, angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers (CCBs), coronary artery bypass surgery, angioplasty and stenting (3-5). Despite



several therapeutic advances, both medical and surgical, there is still no effective therapy for preventing myocardial I/R injury.

In the past few decades, it has become clear that the myocardial response to I/R injury can be reduced. Based on recent studies, a universally accepted potential endogenous strategy for protecting the heart against acute ischaemia-reperfusion injury is preconditioning. Research into the mechanisms of preconditioning has revealed multiple receptors, pathways, and end effectors. Recent studies suggest that certain pharmacological agents may stimulate these mechanisms. Our understanding of the complex mechanism of preconditioning is still incomplete, and its disclosure could contribute to the treatment of acute myocardial infarction.

PHENOMENON OF MYOCARDIAL PRECONDITIONING

Myocardial preconditioning is a process where myocardium cells or tissues are exposed to a sublethal stimulus to protect them from a subsequent normally lethal stress. Preconditioning can attenuate the subsequent prolonged or lethal tissue injury by increasing the cell tolerance to the stress (6). The term “preconditioning” was used for the first time in 1964 by Janoff to refer to the phenomenon of stress-induced endogenous tolerance against traumatic or endotoxic insults (7). The protective effect of preconditioning in the heart can be demonstrated by the reduction in infarct size and myocardial stunning, prevention of arrhythmias, or the acceleration of the recovery of myocardial function after ischaemia (8-10). Myocardium can be preconditioned by two basic techniques including ischaemic and pharmacological preconditioning.

Ischaemic preconditioning (IPC)

Ischaemic preconditioning was described for the first time in 1986 by Murry and colleagues when they found that a “preconditioned” heart in a canine model became resistant to ischaemia-induced infarction. In fact, infarct size and the degree of reperfusion injury were reduced by single or multiple cycles of ischaemia and reperfusion (11). The same beneficial effect has since been confirmed in every species studied, independently of both the presence of collaterals in the coronary circulation and the size of the animal model (12-14), and has more recently been confirmed in the human (15).

The underlying mechanisms of IPC are still a matter of debate. Protective effects of IPC on the heart can be a consequence of the reduction in reactive oxygen species (ROS) generation, delay in adenosine triphosphate (ATP) depletion, and the reduction of the infarct size, apoptosis and neutrophil accumulation. It is possible that adenosine, noradrenaline and bradykinin play a role in this mechanism (16-18). In addition,, activation of protein

kinase C (PKC), which is known to be a key player in numerous intracellular signal transduction pathways, is believed to be one of the main causative mechanisms in the protection of IPC across various species (19). Nevertheless, for many of the proposed mechanisms, a modulation of intracellular calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$) homeostasis may be the final common pathway in the protection against ischaemic injury. A rise in intracellular free $[Ca^{2+}]_i$ has been postulated to be an important factor in ischaemic myocardial injury (20, 21).

Notably, there are many candidates for the mechanism of IPC. Recently it has been reported that the activation of PKC opens the ATP-sensitive K^+ (K(ATP)) channels which is currently thought to be the end-effector of many signal transduction systems related to the IPC mechanism. Therefore, it is thought that K(ATP) channel openers are also effective in protecting against human ischaemic injury (22).

Myocardial ischaemia occurs when blood flow to the heart muscle (myocardium) is obstructed by a partial or complete blockage of a coronary artery. Coronary arteries can be occluded by thrombi, atherosclerotic plaques, vasoconstriction or inflammation (23). During myocardial ischaemia, the absence of oxygen and metabolic substrates in cardiomyocytes can cause functional, structural and metabolic diseases (24). As a result, the cells switch to anaerobic metabolism, which leads to the accumulation of lactate and a drop in intracellular pH. The main result is intracellular Na^+ overloading. Therefore, diminished intracellular concentrations of ATP and creatine phosphate cause decreased activity of adenosine triphosphate-reliant ion pumps, including the Na^+/K^+ ATP-ase pump, and the exacerbation of contractile function. This induces the Na^+-H^+ exchanger to extrude H^+ and results in intracellular Na^+ overload, which activates the $2Na^+-Ca^{2+}$ exchanger to function in reverse to extrude Na^+ and leads to intracellular $[Ca^{2+}]_i$ overload. These processes and the generation of ROS can lead to cell death induced by ischaemic episodes (20, 25-27).

Furthermore, with reperfusion, the restoration of blood flow after an ischaemic episode may result in paradoxical cardiomyocyte dysfunction caused by ROS, intracellular and mitochondrial Ca^{2+} overload and accumulation of inflammatory cells. The phenomenon called “reperfusion injury” occurs when prompt changes in intracellular ions and normalization of pH cause cell death and greater damage than what is induced by pre-reperfusion ischaemia (26, 28).

Pharmacological preconditioning

As we mentioned above, in addition to IPC, preconditioning can be induced in the heart with pharmacological agents. However, it is still unclear whether the various forms of pharmacological preconditioning have the same molecular mechanisms as ischaemic preconditioning. In recent years, many investigators have studied myocardial



pharmacological preconditioning with various agents (29–32), but particular attention has been directed towards pharmacological agents that modulate Ca^{2+} (33, 34).

Ca^{2+} channel blockers are well known to be cardioprotective when taken after I/R injury (35, 36), but little is known about a possible preconditioning effect before ischaemia. Controversy remains about their ability to reduce infarct size or at least delay the necrotic process. With this in mind, the aim of this review was to examine the possible role of calcium channel blockers as a mediator of ischaemic preconditioning.

CALCIUM CHANNEL BLOCKING AGENTS

Calcium antagonists or calcium channel blockers (CCBs) were introduced into clinical medicine in the 1960s and were approved for the treatment of hypertension in the 1980s (37, 38). CCBs have been one of the mainstays in therapy for cardiovascular diseases, such as angina pectoris, paroxysmal supraventricular tachyarrhythmia, hypertrophic cardiomyopathy, Raynaud phenomenon, pulmonary hypertension, diffuse oesophageal spasm, and cerebral vasospasm, for many years (39). CCBs as a group are heterogeneous and, based on the chemical structure and functional distinctions, include 3 main classes: dihydropyridine, phenylalkylamine and benzothiazepine derivative (40, 41). The differences in chemical structures provide heterogeneity in the action of these agents. However, all CCBs inhibit calcium influx by binding to the α_1 subunit of calcium channels and inhibit cell excitability (42). Inhibition leads to the relaxation of vascular smooth muscle cells, vasodilation and a lowering of blood pressure. In cardiac muscle, contractility is reduced, and the sinus pacemaker and atrioventricular conduction velocities are slowed (43, 44). CCBs also reduce angiotensin II-mediated vasoconstriction and decrease the angiotensin II-stimulatory effect on adrenal biosynthesis and secretion of aldosterone (45). Unlike other vasodilators, calcium antagonists induce mild natriuresis and do not cause volume retention. Thus, calcium antagonists lower blood pressure mainly by reducing peripheral vascular resistance (46).

Furthermore, in many clinical trials, there is controversial data on taking CCBs and an increase in cardiovascular mortality (47, 48). Although several theories have been offered, the mechanism by which CCBs increase cardiovascular mortality is still unknown.

However, the hypothesis that cellular calcium overload may contribute to the onset of irreversible ischaemic cell injury suggested a possible role for CCBs in the protection of ischaemic myocardium (49).

Dihydropyridine CCBs in myocardial preconditioning

Dihydropyridine CCBs include amlodipine, felodipine, isradipine, lacidipine, lercanidipine, nicardipine, nifedipine, nisoldipine, and others (40). Experimental

data suggest that this group of CCBs binds to both dihydropyridine and nondihydropyridine binding sites. Dihydropyridines selectively inhibit calcium ion influx across cell membranes, with a greater effect on vascular smooth muscle cells than on cardiac muscle cells (50). Dihydropyridine CCBs have variable effects on heart rate. Acutely, these drugs tend to induce a reflex tachycardia, but long-term studies have shown similar heart rates before and during therapy (51).

Higher doses of these drugs are generally associated with an increase in heart rate. A group of authors even suggested that the use of short-acting nifedipine in moderate to high doses causes an increase in total mortality. In patients with poor or no collateral flow, nifedipine reduced ischaemic episodes, while in patients with good collateral flow nifedipine significantly increased them (52). Nicardipine and isradipine show the same effects (53).

In vitro experiments on human atrial trabeculae indicate that patients using CCBs (amlodipine $n=7$, diltiazem $n=4$, verapamil $n=1$) were not functionally protected by transient ischaemia. However, a difference in functional performance after I/R between atrial trabeculae with and without CCB exposure was not detected (54).

Likewise, not all studies have demonstrated increased cardiovascular mortality with CCBs. Wallbridge and colleagues studied whether pretreatment with nisoldipine could modify cardioprotective effects of IPC in pigs. Their results indicate that continuous infusion of nisoldipine throughout the entire protocol until onset of reperfusion does not attenuate the potential protective mechanism of IPC; in fact, it may have even exerted a small additional cardioprotective effect (55). These findings are in accordance with an experimental study in guinea pig isolated hearts by Camara and colleagues. They suggest that nifedipine given before ischaemia induces a preconditioning effect as shown by improved left ventricular pressure and lower $[\text{Ca}^{2+}]$ on reperfusion after ischaemia (56).

Phenylalkylamine CCBs in myocardial preconditioning

Phenylalkylamine CCBs are relatively selective for myocardium and are often used to treat angina; they also reduce myocardial oxygen demand, reverse coronary vasospasm. Within this group are verapamil, gallopamil, and others (41), which inhibit the alpha and beta subunits of voltage-dependent calcium channels. Specifically, their effect on L-type calcium channels in the heart causes a reduction in inotropy and chronotropy, reducing heart rate and blood pressure. The most commonly used drug from this group is verapamil (57).

Miyawaki and colleagues have indicated that pretreatment with verapamil alone ($0.63 \mu\text{mol/L}$; 15 minutes before I/R) did not exert a significant effect on ischaemic injury in the Langendorff-perfused rat model compared with no pretreatment in ischaemic control hearts. On the other hand, verapamil administered during IPC, at the same dose, significantly attenuated the salutary effects of IPC



(33). In addition, another study by the same authors demonstrated that ATP contents were significantly higher and cell structure was better preserved in Ca^{2+} preconditioned hearts than in ischaemic control hearts. In other groups, Ca^{2+} influx during Ca^{2+} preconditioning was inhibited with low doses of verapamil (0.2 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$), but verapamil did not influence the cardioprotection of Ca^{2+} preconditioning. On the contrary, in hearts treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ verapamil, lactate dehydrogenase release was significantly increased, ATP content was reduced, mitochondria were swollen and partly disrupted, glycogen was depleted, and myofibrils were partly transformed into contraction bands (58).

The effects of verapamil preconditioning are controversial. Yu and colleagues found that verapamil preconditioning (20 $\mu\text{mol/L}$; 10 min) significantly improved diastolic and systolic functions and reduced the incidence of arrhythmias. One of the possible mechanisms for this effect is a reduction in the influx of $[\text{Ca}^{2+}]$, thereby stabilizing cardiomyocytes in myocardial stunning and avoiding the occurrence of Ca^{2+} -induced $[\text{Ca}^{2+}]$ release during I/R injury (59).

Benzothiazepine CCBs in myocardial preconditioning

This class of drugs is an intermediate class between phenylalkylamine and dihydropyridines in their selectivity for vascular calcium channels. By having both cardiac depressant and vasodilator actions, benzothiazepines are able to reduce arterial pressure without producing the same degree of reflex cardiac stimulation caused by dihydropyridines (41). The main representative of this group is diltiazem. Diltiazem is effective in the treatment of angina, and the longer-acting formulation is effective in the treatment of hypertension. It is less negatively inotropic than verapamil but should still be used cautiously with beta-blockers (60).

Okuda and colleagues have suggested that diltiazem (10 mg/kg) preconditioning leads to a reduction in the infarct area in the coronary artery of an adult mongrel dog (61). De Jong and colleagues studied the effects of diltiazem administered before or during myocardial ischaemia in the Langendorff-perfused rat heart. They observed that diltiazem decreases adenine nucleotide catabolism and presumably does not protect by negative inotropy during myocardial ischaemia. Myocardial function measured by the capacity to develop tension was decreased by diltiazem, and pretreated hearts did not show arrhythmias. Diltiazem also reduced myocardial oxygen demand, thereby diminishing the effect of flow impairment (62).

Nicorandil in myocardial preconditioning

As already mentioned, besides CCBs, K(ATP) channel openers are also effective in protecting against human ischaemic injury; therefore, we pay special attention to nicorandil.

Nicorandil is an antianginal drug whose properties lie between those of nitrates and K^+ channel openers. Activation of K(ATP) channels causes K^+ efflux, hyperpolarization of the smooth muscle cell membrane, and closure of voltage-gated Ca^{2+} channels. Closure of Ca^{2+} channels reduces intracellular levels of Ca^{2+} , resulting in relaxation of vascular smooth muscle and dilation of systemic and coronary arterioles. The nitrate moiety produces relaxation of vascular smooth muscle with dilation of systemic venous circulation and epicardial coronary arteries (63). This drug has been shown to be effective after oral administration in patients with stable angina and acute myocardial infarction (64, 65). Nicorandil allows for simultaneous dilation and relaxation of arterial and venous vasculature via its effect on smooth muscles (64).

Ohno and colleagues have shown that nicorandil preconditioning reduced the size of myocardial infarcts by opening the K(ATP) channels, and this effect was dependent on the plasma nicorandil concentrations immediately before the ischaemia induced in rabbits (66). This study corroborates the findings of Matsubara and co-authors where the preconditioning mechanism of nicorandil is explained by opening K(ATP) channels (67). Nicorandil reduces myocardial infarct size in various animal models. A chronic experiment on rabbits has shown that nicorandil (100 $\mu\text{g/kg}$ bolus + 30 $\mu\text{g/kg}$ -1-min-1 iv for 60 min) induces delayed cardioprotection against myocardial infarction (68). Similar findings were obtained in the study where rats were administered nicorandil (in oral dose; 3 or 6 mg/kg; 5 consecutive days). Rats were then subjected to myocardial I/R (40 min/10 min). Nicorandil was effective in attenuating the ischaemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmias, creatine kinase-MB release, lactate accumulation and oxidative stress (69). Another possible mechanism of preconditioning is the upregulation in the expression of COX-2 and Bcl-2 as it occurs after IPC and nicorandil preconditioning (68, 70).

Several clinical studies have shown that nicorandil improves functional and clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (71, 72). Intravenous preadministration of nicorandil attenuates ST-segment elevation and improves lactate metabolism during coronary angioplasty, suggesting that pharmacological preconditioning is induced by nicorandil. Also a level of troponin T, one of the reliable metabolic markers of myocardial injury, is suppressed after coronary angioplasty as well as ST-segment elevation during coronary angioplasty (72). In the I-WIND trial, Kitakaze and colleagues randomized patients with an anterior ST-segment elevation myocardial infarction to receive intravenous nicorandil as a bolus or placebo after primary percutaneous coronary intervention. The overall morbidity and mortality were the same in both groups after 3 years. However, 61 patients continued on oral nicorandil after discharge, and in this group, the LV ejection fraction was better at the 6-month follow-up (73). Larger trials are needed, however, to examine the cardioprotective action of nicorandil.



Although many investigators have studied the role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning, there are many open questions that future research should seek to answer. Nevertheless, the use of calcium channel blockers to mimic preconditioning in selected clinical settings may be a desirable future therapeutic goal. Based on current knowledge, we can say that nicorandil preconditioning is certainly worth investigation. More importantly, future studies should reveal simpler and even more effective therapeutic interventions for protecting the heart from ischaemia/reperfusion.

REFERENCES

1. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998;38(2):291-300.
2. Vinod NK, Rupinder SM, Murugesan C. Myocardial ischaemic preconditioning. *Indian Journal of Anaesthesia.* 2004;48:93.
3. Duan HF, Wu CT, Wu DL, et al. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Molecular therapy.* 2003;8(3):467-74.
4. Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Progress in cardiovascular diseases.* 1998;40:517-47.
5. Alserius T, Hammar N, Nordqvist T, Ivert T. Risk of death or acute myocardial infarction 10 years after coronary artery bypass surgery in relation to type of diabetes. *Am Heart J.* 2006;152(3):599-605.
6. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli J. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(9):1200-8.
7. Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *International anesthesiology clinics.* 1964;2(2):251-70.
8. Muller DWM, Topol EJ, Califf RM, Sigmon KN, Gorman L. Relationship between antecedent angina pectoris and short term prognosis after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1990;119:224-31.
9. Pomerantz BJ, Joo K, Shames BD, Cleveland JC Jr, Banerjee A, Harken AH. Adenosine preconditioning reduces both pre and postischemic arrhythmias in human myocardium. *J Surg Res.* 2000;90(2):191-6.
10. Luh SP, Yang PC. Organ preconditioning: the past, current status, and related lung studies. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(5):331-41.
11. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-36.
12. Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol.* 1992;263:H1107-12.
13. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 1991;84:350-6.
14. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, et al. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 1990;66:1133-42.
15. Kloner Ra, Shook T, Przyklenk K, et al. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4: a clinical correlate to preconditioning? *Circulation.* 1995;91:37-45.
16. 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):1723-41.
17. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-35
18. Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT. Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(5):629-37.
19. Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C: its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res.* 1994;75:586-90.
20. Steenbergen C, Fralix TA, Murphy E. Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol* 1993;88:456-70.
21. Silverman HS, Stern MD. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res* 1994;28:581-97.
22. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* 1998;97(24):2463-9.
23. Crossman DC. The pathophysiology of myocardial ischaemia. *Heart.* 2004;90(5):576-80.
24. Jones CJ, Kuo L, Davis MJ, et al. Role of nitric oxide in the coronary microvascular responses to adenosine and increased metabolic demand. *Circulation.* 1995;91:1807-13.
25. Meldrum DR. Mechanisms of cardiac preconditioning: ten years after the discovery of ischemic preconditioning. *J Surg Res.* 1997;73(1):1-13.
26. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100.
27. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 1991;42:225-46.
28. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation.* 2002;105(20):2332-6.
29. Mittal D, Taliyan R, Sharma PL, Yadav HN. Effect of pioglitazone on the abrogated cardioprotective effect of ischemic preconditioning in hyperlipidemic rat heart. *Indian J Pharmacol.* 2016;48(1):59-63.
30. Dorsch M, Behmenburg E, Raible M, et al. Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151025.



31. Müllenheim J, Ebel D, Frässdorf J, Preckel B, Thämer V, Schlack W. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology*. 2002;96(4):934-40.
32. Jeremic N, Petkovic A, Srejovic 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):266-75.
33. Miyawaki H, Ashraf M. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 1997;80: 790-9.
34. Smith GB, Stefenelli T, Wu ST, Wilkman-Coffelt J, Parmley WW, Zaugg CE. Rapid adaptation of myocardial calcium homeostasis to short episodes of ischemia in isolated rat hearts. *Am Heart J*. 1996;131:1106-1112.
35. Dagenais F, Cartier R, Hollmann C, Buluran J. Calcium-channel blockers preserve coronary endothelial reactivity after ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 1997;63:1050-6.
36. Hugtenburg JG, Van Voorst MJ, Van Marle J, et al. The influence of nifedipine and miflozine on mitochondrial calcium overload in normoxic and ischaemic guinea-pig hearts. *Eur J Pharmacol*. 1990;178:71-8.
37. Braunwald E. Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. *New England Journal of Medicine*. 1982; 307(26):1618-27.
38. Brichard G, Zimmermann PE. Verapamil in cardiac dysrhythmias during anesthesia. *British Journal of anaesthesia*. 1970;42(11):1005-12.
39. Freher M, Challapalli S, Pinto JV, Schwartz J, Bonow RO, Gheorgiade M. Current status of calcium channel blockers in patients with cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol*. 1999;24:236-40.
40. Weir MR. Calcium channel blockers: differences between subclasses. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2007;7:5-15.
41. Frishman W.H. Calcium channel blockers: differences between subclasses. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2007;7:17-23.
42. Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;139:33-87.
43. Cleophas TJ, van Marun R. Meta-analysis of efficacy and safety of second-generation dihydropyridine calcium channel blockers in heart failure. *Am J Cardiol*. 2001;87:487-90.
44. Ruzicka M, Leenen FH. Relevance of 24 H blood pressure profile and sympathetic activity for outcome on short- versus long-acting 1,4-dihydropyridines. *Am J Hypertens*. 1996;9:86-94.
45. Millar JA, McLean KA, Sumner DJ, et al. The effect of the calcium antagonist nifedipine on pressor and aldosterone responses to angiotensin II in normal man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1983;24:315-21.
46. Krishna GG, Riley LJ, Deuter G, et al. Natriuretic effect of calcium-channel blockers in hypertensives. *Am J Kidney Dis*. 1991;18:566-72.
47. Cutler JA. Calcium-channel blocker for hypertension-uncertainty continues. *N Engl J Med*. 1998; 338:679-81.
48. Psaty BM, Heckbert SR, Koepsell TD, et al. The risk of myocardial infarction associated with antihypertensive drug therapies. *JAMA*. 1995;274:620-5.
49. Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol*. 1972;67(3):417-40.
50. Kiowski W, Buhler FR, Fadayomi MO, et al. Age, race, blood pressure and renin: predictors for antihypertensive treatment with calcium antagonists. *Am J Cardiol*. 1985;56:81-5.
51. Sica DA. Pharmacotherapy review: calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8(1):53-6.
52. Curt FD, Psaty MB, Meyer VJ. Nifedipine dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation*. 1995;92:1326-31.
53. Waters D. Proischemic complications of dihydropyridine calcium channel blockers. *Circulation*. 1991;84:2598-2600.
54. Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Meng X, Bannerjee A, Harken AH. Clinical L-type Ca²⁺ channel blockade prevents ischemic preconditioning of human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31(12):2191-7.
55. Wallbridge DR, Schulz R, Braun C, Post H, Heusch G. No attenuation of ischaemic preconditioning by the calcium antagonist nisoldipine. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(8):1801-10.
56. Camara AK, Chen Q, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF. Negative inotropic drugs alter indexes of cytosolic [Ca²⁺]_i-left ventricular pressure relationships after ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(2):H667-80.
57. Dilmac N, Hilliard N, Hockerman GH. Molecular determinants of frequency dependence and Ca²⁺ potentiation of verapamil block in the pore region of Cav1.2. *Mol Pharmacol*. 2004;66(5):1236-47.
58. Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res*. 1996;79:137-146.
59. Henry PD. Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipine, verapamil and diltiazem. *The American journal of cardiology*. 1980;46(6):1047-58.
60. Yu W, Wang JJ, Gan WY, Lin GS, Huang CX. Effects of verapamil preconditioning on cardiac function in vitro and intracellular free Ca²⁺ and L-type calcium current in rat cardiomyocytes post ischemia-reperfusion injury. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2010;38(3):225-9.
61. Okuda K, Nohara R, Ogino M, et al. Limitation of infarct size with preconditioning and calcium antagonist (Diltiazem): Difference in ^{99m}Tc-PYP uptake in the myocardium. *Annals of nuclear medicine*. 1996;10(2):201-9.
62. De Jong JW, Harmsen E, De Tombe PP. Diltiazem administered before or during myocardial ischemia decreases adenine nucleotide catabolism. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(4):363-70.
63. Taira N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators. *Am J Cardiol*. 1989;63:18J-24J.



64. The IONA Study Group. Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: the impact of nicorandil in angina (IONA) randomized trial. *Lancet* 2002;359:1269–75.
65. Lablanche JM, Bauters C, Leroy F et al. Prevention of coronary spasm by nicorandil: Comparison with nifedipine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20:S82–5.
66. Ohno Y, Minatoguchi S, Uno Y, Kariya T, Arai M, Yamashita K, Fujiwara T, Fujiwara H. Nicorandil reduces myocardial infarct size by opening the K(ATP) channel in rabbits. *Int J Cardiol*. 1997;62(3):181-90.
67. Matsubara T, Minatoguchi S, Matsuo H, et al. Three minute, but not one minute, ischemia and nicorandil have a preconditioning effect in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(2):345-51.
68. 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):H1273-80.
69. Ahmed LA, Salem HA, Attia AS, Agha AM. Pharmacological preconditioning with nicorandil and pioglitazone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;663(1-3):51-8.
70. Rajesh KG, Sasaguri S, Zhitian Z, Suzuki R, Asakai R, Maeda H. Second window of ischemic preconditioning regulates mitochondrial permeability transition pore by enhancing Bcl-2 expression. *Cardiovasc Res*. 2003;59(2):297-307.
71. Matsuo H, Watanabe S, Segawa T, et al. Evidence of pharmacologic preconditioning during PTCA by intravenous pretreatment with ATP-sensitive K⁺ channel opener nicorandil. *Eur Heart J*. 2003;24(14):1296-303.
72. Sakai K, Yamagata T, Teragawa H, Matsuura H, Chayama K. Nicorandil enhances myocardial tolerance to ischemia without progressive collateral recruitment during coronary angioplasty. *Circulation journal*. 2002;66(4):317-22.
73. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): 2 randomised trials. *Lancet*. 2007;370(9597):1483-93.



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Бр. 06-7573

19.06. 2018

КРАГУЈЕВАЦ



Поштовани аутори,

Обавештавамо вас да је рад под насловом: „AN OVERVIEW OF PHARMACOLOGICAL AND NON-PHARMACOLOGICAL TREATMENT AS A USEFUL TOOL FOR THE PROTECTION FROM CARDIOTOXICITY OF ANTINEOPLASTIC DRUGS“, чији су аутори: Тања Радоњић, Нина Симоновић и Тамара Николић Турнић, који је у евиденцији редакције часописа SERBIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH, former title MEDICUS заведен под бројем SJECD-18-00041, након достављених стручних рецензија од компетентних рецензента, а које је одредило Уредништво часописа SERBIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH, поштујући принцип «двоструке слепе рецензије», **ПРИХВАЋЕН ЗА ШТАМПУ** и биће штампан у једном од наредних бројева Часописа.

DOI: 10.2478/sjecr-2018-0019

Надамо се да ћете и даље наставити сарадњу са Часописом.

С поштовањем,

ГЛАВНИ И ОДГОВОРНИ УРЕДНИК ЧАСОПИСА
SERBIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL
AND CLINICAL RESEARCH


Проф. др Владимир Јаковљевић