



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**



**ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА
ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ:
ЕФЕКТИ НА КАРДИОДИНАМИКУ И КОРОНАРНИ ПРОТОК
ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

мр рh Невена Јеремић

Крагујевац, 2015. године

Тежину овог доктората за мене не представљају стране које сам написала, премда засигурно имају научни значај, имати ову књигу у рукама за мене је доказ да се труд, рад и љубав коју уложите увек вишеструко врате.

Када сам се још као студент 2008.године обрела на вратима лабораторије за Кардиоваскуларну физиологију којом руководи професор Владимир Јаковљевић у нади да ћу ту успети да изведем потребне експерименте за један од својих испита, нисам ни слутила да ћу после само пар дана рада у лабораторији осетити припадност том месту. Све до данас заједно са лабораторијом сам се развијала а са њеним члановима сазревала и као личност и као истраживач. Процес је и даље у току.

Свом ментору, професионалцу и човеку *великог* срца, професору Владимиру Јаковљевићу се неизмерно захваљујем, пре свега на прилици да заједно са њим и његовим тимом померам границе науке, на свим стручним саветима који су ми помогли при истраживању и писању дисертације али наравно и на свим пријатељским саветима који су допринели да пут ка визионарству и креативности не само у науци већ и у животу, буде увек осветљен.

Захваљујем се својим колегама и пријатељима, доценту др Владимиру Живковићу и асистенту др Ивану Срејовићу који су поред експерименталног дела овог истраживања, својим идејама и пријатељском подршком допринели квалитету и реализацији ове тезе.

Захваљујем се младом тиму наше лабораторије: Јовани Јеремић, Јовани Брадић, Аници Петковић и свима осталима који су несебично учествовали у статистичкој обради резултата као и у биохемијским анализама.

Посебно се захваљујем свом драгом пријатељу Предрагу Равићу, човеку који зрачи позитивном енергијом и који је својом безусловном подршком и знањем утицао да унапредим своје лабораторијске вештине.

Велико хвала и мојој колегиници и пријатељици Љиљани Ђоковић на пријатељској подршци све ове године а посебно у периоду израде овог доктората.

И наравно, хвала на разумевању и љубави онима без којих све ово и не би имало много смисла, мојој породици, мом неисцрпном извору снаге. Супругу Бобану, који већ деценију уназад даје крила мојој машти и жељама и у многеме доприноси да се и остваре.

Родитељима, Славиши и Биљани

I УВОД.....	1
1.1 ФИЗИОЛОГИЈА КОРОНАРНЕ ЦИРКУЛАЦИЈЕ	2
1.1.1. Артеријски систем срца	3
1.1.2. Регулација коронарног протока.....	3
1.2. ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ.....	5
1.2.1. Гастрична H^+/K^+ - АТР-азна пумпа	7
1.2.2. Негастрична H^+/K^+ - АТР-азна пумпа	8
1.3. СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА	10
1.3.1. Реактивне кисеоничне врсте (ROS).....	11
1.3.1.1. Супероксид анјон радикал ($O_2^{\bullet-}$)	11
1.3.1.2. Водоник пероксид (H_2O_2)	12
1.3.1.3. Остале реактивне кисеоничне врсте	12
1.3.2. Липидна пероксидација	13
1.3.3. Реактивне врсте азота (RNS).....	13
1.3.3.1. Азот моноксид ($^{\bullet}NO$)	14
1.3.4. Антиоксидациони заштитни систем.....	14
1.3.4.1. Примарни антиоксидациони систем заштите	15
1.3.4.2. Секундарни антиоксидациони систем заштите	15
1.4. ФЕНОМЕН ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА.....	16
1.4.1. Прекондиционирање миокарда исхемијом	17
1.4.1.1. Механизам прекондиционирања исхемијом.....	19
1.4.2. Прекондиционирање фармаколошким агенсима на моделу миокарда	22
1.3.3. Значај прекондиционирања	25
1.5. ИНХИБИТОРИ ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ (ИПП).....	25
1.5.1. Хемијска интеракција протонске пумпе и инхибитора протонске пумпе.....	26
1.5.2. Хемијска структура инхибитора протонске пумпе	29
1.5.2.1. Омепразол	29
1.5.2.1.1. Фармакинетика и метаболизам омепразола	30
1.5.2.1.2. Механизам дејства омепразола.....	31
1.5.2.2. Лансопризол	31
1.5.2.2.1. Фармакокинетика и метаболизам лансопризола	32

1.5.2.2.2. Механизам дејства лансопразола	33
1.5.2.3. Пантопразол	33
1.5.2.3.1. Фармакокинетика и метаболизам пантопразола	34
1.5.2.3.2. Механизам дејства пантопразола	34
1.5.3. Интеракције ИПП са другим лековима	34
1.5.4. Друге могуће улоге ИПП	35
1.5.4.1. Улога ИПП у феномену прекондиционирања	36
II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	37
2.1 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	38
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	39
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ	40
3.1.2. Метод ретроградне перфузије изолованог срца при константном притиску .	40
3.1.3. Langendorff апарат LF-01 F-P	41
3.1.4. Материјал потребан за правилно коришћење експерименталног модела	43
3.1.4.1. Комплет реагенаса за припремање Krebs-Hensenleit-овог раствора	44
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ	45
3.2.1. Лекови коришћени у експерименталном протоколу	49
3.2.2. Експериментални протокол са <i>Artemia salina</i>	49
3.3. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ	50
3.3.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	50
3.3.1.1. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације:	51
3.3.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)	51
3.3.2.1. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO):	53
3.3.3. Одређивање супероксид анион радикала (O_2^-)	53
3.3.3.1. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид анионског радикала (O_2^-): ..	54
3.3.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)	54
3.3.4.1. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H_2O_2):	56
3.4 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	56
IV РЕЗУЛТАТИ	57

4.1. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	58
4.1.1. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt max).....	58
4.1.2. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt min).....	60
4.1.3. Систолни притисак у левој комори (SLVP).....	62
4.1.4. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP).....	64
4.1.5. Срчана фреквенца (HR).....	66
4.1.6. Коронарни проток (CF).....	68
4.2. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ НА МАРКЕРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗ КОРОНАРНОГ ВЕНСКОГ ЕФЛУЕНТА	70
4.2.1. Нитрити (NO ₂ ⁻).....	70
4.2.2. Супероксид анјон радикал (O ₂ ⁻).....	72
4.2.3. Водоник пероксид (H ₂ O ₂).....	74
4.2.4. Индекс липидне пероксидације (TBARS).....	76
V ДИСКУСИЈА	78
5.1. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	81
5.2. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА.....	88
VI ЗАКЉУЧЦИ	94
6.1. ЗАКЉУЧЦИ	95
VII ЛИТЕРАТУРА	96
7.1. ЛИТЕРАТУРА.....	97

I УВОД

1.1 ФИЗИОЛОГИЈА КОРОНАРНЕ ЦИРКУЛАЦИЈЕ

Постојање срца било је познато још у време старих грка који су га називали *cardia*. Чак је и Аристотел срце сматрао седиштем душе и централним делом човека. Вековима се испитивала анатомија срца, међутим најзначајнији допринос данашњим концептима о циркулацији дао је давне 1628. године William Harvey, који је описао да је циркулација крви кроз срце заправо проузрокована његовом могућношћу да се понаша као механичка пумпа.

Данас знамо да се срчани циклус којим крв циркулише састоји из два сегмента која се смењују: контракције (систола) и релаксације (диастола). Контрактилност миокарда заправо представља способност рада срчаног мишића при условима артеријског притиска који срце ствара да би испумпало крв (*afterload*) и при максималној запремини енд-дијастолне коморе (*preload*) (1). Постулати на којима се заснивају фазе *afterload*-а и *preload*-а као и њихова практична примена су од значаја за медицинске специјалности које се баве пацијентима са срчаним обољењима.

Срце као за живот најважнија пумпа мора да увек буде снабдевена довољном количином крви. У нормалним условима, коронарни проток крви је блиско повезан са потрошњом кисеоника (O_2) у миокарду. За разлику од других органа, срце успева да из крви током коронарне циркулације екстрахује 70 до 75% кисеоника. Опет, ако говоримо о нормалним условима на срчану циркулацију отпада 5-10% минутног волумена срца, што доводи до протока крви кроз крвне судове у запремини од 250-300 ml у минути за време мировања, а овај волумен управо и представља коронарни проток који у неким патофизиолошким стањима може бити измењен (2, 3).

Коронарну циркулацију чини артеријски и венски систем крвних судова који је од великог значаја јер правилно функционисање коронарне циркулације у многоме ће допринети и нормалном функционисању најважније биолошке пумпе-срца.

1.1.1. Артеријски систем срца

Артеријски коронарни систем чине лева и десна коронарна артерија. Ове артерије се на својим крајевима гранају у артериоле док се артериоле даље гранају у велики број капилара.

Лева коронарна артерија излази из левог синусног аортног ушћа и пролази субперикардијално између плућне артерије и леве аурикуле, затим путем левог коронарног жљеба стиже до предње стране срца где свој пут завршава, одвајајући се на предњу међукоморну грану (предња страна срца) и циркумфлексну грану (плућна површина срца). Лева срчана артерија исхрањује леву преткомору и леву комору, предњи папиларни мишић у десној комори, мали део десне коморе, плућни конус и предњи зид десне коморе (3, 4).

Десна коронарна артерија излази из десног синуса аортног ушћа пролази субперикардијално кроз десни коронарни жљеб, обилази десну страну срца затим прелази између плућне артерије и десне аурикуле и затим се на предњој страни срца грана. Највећи огртак десне коронарне артерије чини задња међукоморна грана која се налази на задњој страни срца и протеже се све до врха миокарда. Десна срчана артерија исхрањује десну преткомору и комору, Кејт-Флак-ов чвор, задњи део срчане преграде, задњи папиларни мишић у левој комори и задњу страну леве коморе као и булбус аорте (3,4).

1.1.2. Регулација коронарног протока

Постоје барем три главна физиолошка фактора који регулишу коронарни проток крви и то су: физички фактори, метаболичка контрола, неурална и хуморална контрола.

Васкуларна контрола путем метаболита је вероватно најважнија јер при сваком дисбалансу између потребе за кисеоником и снабдевености истим долази на локалном нивоу до ослобађања медијатора коронарног протока.

Метаболичке промене које изазивају вазодилатацију у већини ткива укључују смањење парцијалног притиска кисеоника у ткиву (O_2) и вредности рН. Ове промене изазивају релаксацију артериола и прекапиларних сфинктера. Посебно локално смањење парцијалног притиска O_2 може да иницира експресију вазодилататорног гена. Повећање

парцијалног притиска угљен-диоксида CO_2 и осмоалности такође узрокују ширење крвних судова. Повећање температуре у активним ткивима (услед топлоте ослобођене метаболизмом) можда има улогу у настајању вазодилатације док опадање температуре ткива узрокује вазоконстрикцију. K^+ је још једна супстанца која се акумулира локално, и за коју се показало да има дилатацијска својства услед хиперполаризације ћелија васкуларних глатких мишића. Лактат такође може да допринесе дилатацији. У повређеним ткивима, хистамин који се ослобађа из оштећених ћелија повећава капиларну пропустљивост. На тај начин хистамин вероватно изазива отоке у областима које су захваћене упалом (2, 3, 5).

Аденозин настаје из аденозин трифосфата (АТФ) и ствара се у кардиомиоцитима као резултат хипоксије, исхемије или појачаног срчаног рада па је логично да је управо у овим стањима и задужен за регулацију коронарног тонуса. Аденозин доводи до релаксације глатких мишића коронарних артериола чиме доводи до вазодилатације и повећања коронарног протока (2, 3).

Аденозин, атријумски натриуретски пептид (ANP), и хистамин који делује преко H_2 рецептора изазивају релаксацију васкуларних глатких мишића која је независна од ендотела. Међутим, ацетилхолин, хистамин који делује преко H_1 рецептора, брадикинин, вазоактивни интестинални пептид (VIP), супстанца Р и неки други полипептиди, делују преко ендотела, а различите вазоконстрикторне супстанце које делују директно на васкуларне глатке мишиће испољавале би много већи вазоконстрикторни ефекат да њихова дејства нису ограничена њиховом способношћу да истовремено ослобађају азот моноксид (NO). Када се проток крви у ткиву изненада повећа дилатацијом артериола, велике артерије у ткиву се такође шире. Ова дилатација изазвана протоком (*Flow mediated vasodilatation – FMD*) је последица локалног ослобађања NO-а. Производи агрегације тромбоцита такође изазивају ослобађање NO-а, па последична вазодилатација омогућава проходност крвних судова са интактним ендотелом. Ова појава је у супротности са ситуацијом када је крвни суд оштећен, где се на месту повреде у оштећеном ендотелу нагомилавају тромбоцити и изазивају вазоконстрикцију (2, 3, 5).

Аутономна регулација коронарног протока се остварује симпатичком стимулацијом обе поткласе алфа-адренергичких рецептора и проузрокује

вазоконстрикцију док стимулација бета-адренергичких рецептора доводи до вазодилатације (2, 3).

Иако је јако пуно истраживања извршено на тему протонских пумпи које се налазе у срчаном мишићу и одржавају хомеостазу јона натријума, калијума и водоника некако се чини да и данас не знамо доста тога. Имајућу у виду све специфичности коронарне циркулације у односу на системску, поставља се питање на који начин је регулисан митохондријални транспорт јона и његова интеракција са мембранским транспортерима како у физиолошким тако и у патофизиолошким стањима?

1.2. ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ

Све ћелије у организму поседују низ софистицираних мембранских ензимских система који обављају различите процесе битне за живот. Ови процеси крећу од регулације интрацелуларног миљеа у генези преноса информација и комуникација између ћелија. Главна функционална класа ових мембранских ензима укључује оне категоризоване као примарни активни транспортери који се још називају аденозинтрифосфатазе (АТР-азе). АТР-азе катализују пренос молекула супротно електрохемијском потенцијалу, реакције директно повезане са хидролизом АТР-а. Крајем двадесетог века, АТР-азе које активно транспортују катјоне су интензивно проучавали и класификовали Pedersen и Carafoly у три класе: F-тип АТР-аза, V-тип АТР-аза и P-тип АТР-аза (6).

F-тип АТР-аза се налази у: бактеријској плазма мембрани, унутрашњости митохондријалних мембрана и тилакоидним мембранама хлоропласта. Овај тип АТР-аза заправо функционише *in vivo* као обрнута АТР-аза или као АТР синтетаза која синтетише АТР из аденозин дифосфата (ADP-a) и неорганског фосфора користећи енергију добијену од електрохемијског градијента протона (6).

Осамдесетих година двадесетог века V-тип АТР-аза изучаван је на мембранама гљивица и биљака (7-12). Недуго затим V-тип АТР-аза је пронађен и на плазма мембрани бубрежних епитела (13). V-тип АТР-аза је свеприсутан и блиско повезан са АТР синтетазом неких бактерија и као такви играју значајну улогу у закишељавању ендомембранског граничног прелаза свих еукариотских ћелија. У ћелијама сисара V-АТР-

аза помаже да Голџијеве везикуле буду благо киселе а лизозоми високо киселог карактера. Овај тип АТФ-аза је укључен у ендоцитозу, егзоцитозу и закишељавање као важан део у деловању угљених хидрата који су веома значајни као места за препознавање током сортирање ћелија (14).

Суперфамилија Р-типа АТФ-аза састоји се од мембранских ензима који користе потенцијалну енергију АТФ-а за активни транспорт јона. Кључ структуре ових ензима заправо се налази на површини мембране цитосола и састоји се од АТФ-везујућег домена (N-домен), домена за транспорт фосфорилне групе (P-домена) и домена за каталитичку активацију (A-домен) (15, 16).

Р-типови АТФ-аза су широко распрострањени. У овој класи АТФ-аза су и Ca^{2+} -АТФ-азе плазма мембрана, саркоплазматског ретикулума и ендоплазматског ретикулума као и H^+ -АТФ-аза квасаца и биљака, затим K^+ -АТФ-аза бактерија, Na^+/K^+ -АТФ-аза плазма мембрана животињских ћелија и H^+/K^+ -АТФ-аза гастричних паријеталних ћелија. Због формирања фосфоензимских интермедијара, ензимски циклус Р-АТФ-аза може бити подељен у више корака и укључује: киназну активност, којом се остатак аспартата на ензиму фосфорилише и фосфатазну активност којом фосфоензим бива дефосфорилисан (6).

Поред својих функционалних сличности, Р-АТФ-азе имају велики број структурних хомологија, пре свега припадају истој великој фамилији гена. Сви чланови Р-АТФ-аза имају главни пептид тежине око 100kDa који је дизајниран као каталитичка субјединица јер садржи место за везивање АТФ-а и процес фосфорилације (6, 17).

С обзиром на структурне и функционалне сличности дизајнирана је нова група АТФ-аза названа X^+/K^+ -АТФ-аза. Овој групи припадају Na^+/K^+ -АТФ-аза плазма мембрана животињских ћелија и H^+/K^+ -АТФ-аза гастричних паријеталних ћелија (18). Трећу, најновију групу чини на оубаин осетљива негастрична H^+/K^+ -АТФ-аза (6, 19, 20). Прве две пумпе сачињене су од две главне подјединице: каталитичке α -подјединице и структурне β -субјединице (17, 21). Na^+/K^+ -АТФ-азе поседују четири изоформе α -субјединице и три изоформе β -субјединице али физиолошки значај ових изоформи још увек није познат, док гастрична H^+/K^+ -АТФ-аза поседује по једну познату изоформу како α тако и β -субјединице (6, 17).

Фамилија хуманих гена сачињена је од шест сродних гена идентификованих у геному. Три од шест гена одговорни су за кодирање све три изоформе α -субјединице Na^+/K^+ - АТР-аза док четврти ген кодира каталитичку субјединицу гастричне H^+/K^+ - АТР-азе. Функционални статус петог гена одговоран је за кодирање негастричне H^+/K^+ - АТР-азе а функције последњег гена нису још увек познате (17).

1.2.1. Гастрична H^+/K^+ - АТР-азна пумпа

Како подаци из литературе показују, карактеризација α -подјединица H^+/K^+ - АТР-азе извршена је код људи (22), пацова (23), зечева (24), заморчића (25) и жаба крастача (26).

H^+/K^+ - АТР-аза обухвата групу интегралних мембранских протеина који припадају X^+ , K^+ - АТР-азној подфамилији Р-типа АТР-аза које врше транспорт катјона. Иако горе поменуте H^+/K^+ -АТР-азне изоформе, имају око 60-70% сличног аминокиселинског идентитета, оне показују дискретне разлике у кинетичким и фармаколошким својствима када је реч о њиховој експресији у хетерологним системима (17, 27, 28). У прилог томе, постоје доказане разлике и између Na^+/K^+ - АТР-азе и H^+/K^+ - АТР-азе. Кардиоточини гликозид као што је оубаин је познати инхибитор Na^+/K^+ - АТР-азне активности, али не инхибира гастричну H^+/K^+ - АТР-азу, за разлику од оубаина, супстанце као што су SCH 28080 и омепразол, које врше инхибицију активности H^+/K^+ - АТР-азе али не и Na^+/K^+ - АТР-азе (6, 17, 27, 29).

Појачана секреција хлороводоничне киселине (HCl) у желуцу људи може да доведе дневни рН и на вредност од 1,4. Јони хлора се активно транспортују кроз каналиће паријеталних ћелија, који комуницирају са луменом желудачних жлезда а тиме и са луменом самог желуца. Секрецију јона хлора (Cl^-) прати излучивање јона K^+ који се затим замењује са H^+ из цитоплазме уз помоћ H^+/K^+ -АТР-азе у АТР-азном каталитичком циклусу. На прелазу из 19. века признато је да је узрочник улкусне болести управо прекомерна концентрација ове киселине и од тада је у жижи интересовања научног света, посебно јер је убрзо затим откривено да је је такође узрочник позитивног теста на *Helicobacter pylori* а ови патогени су фактор ризика за настанак пептичког улкуса. Три главна стимулуса који делују на паријеталне ћелије су: гастрин (хормон), ацетилхолин (неуротрансмитер) и хистамин (локални хормон) (30, 31).

Делујући на хистаминске (H_2) рецепторе хистамин стимулише паријеталне ћелије. Блокатори H_2 рецептора компетитивно антагонизују дејство хистамина на свим H_2 рецепторима, али се углавном користе за инхибицију секреције киселине у желуцу. Лекови који се користе у пракси су: циметидин, ранитидин, низатидин и фамотидин. Циметидин такође инхибира и цитохром P450 и може успорити метаболизам а тиме и појачати дејство великог броја лекова, укључујући оралне антикоагулансе и трицикличне антидепресиве (32, 33).

У лекове који делују на инхибицију или неутрализацију киселине у желуцу убрајају се и инхибитори протонске пумпе (ИПП). Делују тако што иверзибино инхибирају протонску пумпу, значајно смањују и базалну и стимулисану секрецију киселине у желуцу. Неактивни су у рН неутралној средини, накупљају се у киселој средини где и постају активни што посебно важи за омепразол. Лекови из ове групе су још и: лансопразол, пантопразол и рабепразол (34).

Осетљивост гастричне H^+/K^+ -АТР-азе на омепразол је јединствена јер само овај ензим има три цистеинска остатка на позицијама 819, 828 и 898 на H5-H6 и H7-H8 ентероплазматским доменима који везују ковалентно овај лек (35).

Антациди неутралишу желудачну киселину и тако повећавају гастричну рН вредност. То има за последицу инхибицију пептичке активности, која практично престаје на рН 5. У терапији од антацида најчеће се примењују соли магнезијума и алуминијума (36).

1.2.2. Негастрична H^+/K^+ - АТР-азна пумпа

Након гастричне, следећа пронађена изоформа H^+/K^+ -АТР-азе била је она на дебелом цреву, међутим студије указују на то да обе ове изоформе познате као H^+/K^+ -АТР-азе тип 2 (НКА2) постоје и у бубрезима. Ово откриће допринело је нешто потпунијој слици о реналном транспорту јона, а једна од најзначајнијих чињеница је да је активност овог транспортера снажно стимулисан након примене дијете у којој долази до недовољног уноса јона калијума (37, 38).

Како су бубрези једни од најважнијих регулаторних органа и одговорни за волумен крви а и за њен састав, независно од уноса различите хране и пића, утолико је познавање

свих механизма рада ових органа неопходно. Данас се зна да је примарна локација негастричне H^+/K^+ -АТР-азне пумпе у бубрезима заправо на сабирним каналићима нефрона. (39-41). На хуманом моделу доказано је имунохистохемијским методама постојање две изоформе H^+/K^+ - АТР-азе, $HK_{\alpha 1}$ и $HK_{\alpha 4}$ на сабирним каналићима бубрега, док је улога ове пумпе у одржавању ацидо-базне равнотеже доказана пре свега на моделу пацова и зечева (42). Иако су истраживања бубрежне H^+/K^+ -АТР-азне пумпе започета пре више од тридесет година ни до сада нису потпуно разјашњени сви услови под којима она функционише као ни сви њени регулаторни механизми.

Деведесетих година прошлог века Brierly и Jung имунофлуоресцентним методама пратили су K^+ -зависна алкална померања на изолованој срчаној митохондрији како би доказали постојање H^+/K^+ - АТР-азне пуме (43). Сличним методама, McCabe и коаутори дошли су до закључка да глатке ћелије васкуларних мишића (VSMC) поседују до тада непознате механизме преузимања рубидијума (Rb^+) који доприносе одржавању нормалног градијента јона калијума и нормалног рН, отпуштајући јон водоника у замену за јон калијума а све то уз помоћ H^+/K^+ - АТР-азне пуме која је описана и у другим ткивима. Докази о постојању H^+/K^+ - АТР-азне пуме у глатким мишићним ћелијама васкуларног система показани су на аорти пацова и ћелијској линији глатких мишићних ћелија пацова (44). На каротидној артерији паса, целим њеним током вршена је детекција непознатих изоформи које су пројектоване на бази хомологије са секвенцама до тада познате желудачне и цревне изоформе H^+/K^+ -АТР-азне пуме. Методом полимеризоване ланчане реакције (PCR) закључено је постојање сличности пронађене изоформе у проценту од 91% са гастричном H^+/K^+ -АТР-азом. Резултати ове студије заправо сугеришу да глатке мишићне ћелије васкуларног система врше експресију H^+/K^+ -АТР-азе која је могуће идентична као и гастрична изоформа (45).

Иако се дуго водила дебата о постојању H^+/K^+ -АТР-азе у срцу, сигурне доказе о њеној експресији у миокарду дали су прво Nagashima и сарадници крајем двадесетог века, примењујући изоловано срце а затим изолујући вентрикуларне миоците заморчића по Langedorff техници и апликујући познати инхибитор H^+/K^+ -АТР-азе (омепразол). Резултате су разматрали пратећи промене интрацелуларне рН вредности. У кардиомиоцитима, напон зависних калцијумских струја L-типа био је у већем проценту инхибиран у присуству јона калијума него у одсуству, тако да је вероватна омепразол

индукована инхибиција H^+/K^+ -АТФ-азе допринела субсарколемалној ацидификацији која је независна од калцијумских струја (46). Почетком двадесетог века појавило се још чињеница о присуству H^+/K^+ -АТФ-азе у срчаном ткиву. Weisvag и коаутори извршили су реверзну транскрипцију полимеразне ланчане реакције (RT-PCR) на информациону рибонуклеинску киселину (иРНК) из миокардиума и изолованих кардиомиоцита користећи прајмере специфичне за подјединицу гастричне H^+/K^+ -АТФ-азе. Компетитивна RT-PCR анализа је указала на значајно повишен ниво регулације H^+/K^+ -АТФ-азе у миокарду код срчане инсуфицијенције настале након инфаркта миокарда (47). Не дуго затим, Yenisehirli и Onur, су након примене инхибитора протонске пумпе на изоловану преткомору пацова дошли до закључка да H^+/K^+ -АТФ пумпа игра значајну улогу у механичким и електрофизиолошким својствима преткоморског миокарда пацова (48).

1.3. СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА

Слободни радикали представљају производе константних редокс процеса који се одвијају у ћелији током њеног метаболизма. Њихово штетно дејство огледа се пре свега у чињеници да доводе до оксидационих промена биогених молекула које могу деловати на живе ћелије. Уколико не постоји најважнији услов за нормално функционисање ћелија а то је равнотежа између оксидационих и антиоксидационих фактора долази до настанка оксидационог стреса. Оксидациони стрес који настаје посредством реактивних кисеоничних врста (*Reactive Oxygen Species-ROS*) може озбиљно да наруши ћелијску хомеостазу и утиче на ћелијску пролиферацију и диференцијацију а читав низ ћелијских механизма је укључен да спречи или умањи штетне последице оксидационог стреса.

Слободни радикали (СР) представљају молекуле, атоме или јоне који су специфични јер у својој структури садрже неспарене електроне. Они су у организму присутни у јако ниским концентрацијама од 10^{-5} до 10^{-9} mol-а и могу бити неутрални, позитивно или негативно наелектрисани (49, 50).

У физиолошким процесима СР имају улогу у преношењу сигнала и регулацији ћелијског циклуса, у производњи енергије, потпомажу антимикробну активност фагоцитних ћелија и неизоставни су чинилац механизма деловања појединих ензима. За СР можемо рећи да поседују и мутагено својство јер стимулишу раст ћелија и убрзавају

процес старења. Да би остварили све своје улоге, СР, пролазе у хемијском смислу кроз три фазе: фазу иницијације, фазу пропагације и фазу терминације (49, 51).

1.3.1. Реактивне кисеоничне врсте (ROS)

Другим именом реактивне врсте кисеоника могу се још назвати и слободни радикали кисеоника, јер заправо по хемијској структури то и јесу – радикалске честице кисеоника. Међутим не може се рећи да се у реактивне кисеоничне врсте убрајају само слободни радикали кисеоника (супероксид ањон радикал, хидроксил радикал, хидропероксил радикал, алкоксил радикал и пероксил радикал). У ту групу спадају и нерадикалски облици кисеоника (водоник пероксид, хипохлорна киселина, озон, синглет кисеоник и органски хидропероксид).

Иако СР заправо постоје и у физиолошким условима у организму, њихов настанак може бити проузрокован и неким спољашњима агенсима као што су: пестициди, вештачке боје, дувански дим, лекови. Такође, њихов настанак може бити изазван утицајем микроталасног, јонизујућег или другог зрачења а могуће је да настану и после изложености организма неком физичком напору (52, 53).

ROS могу имати улогу секундарних гласника али такође могу индуковати ћелијско старење и апоптозу, због тога реактивне кисеоничне врсте називају молекулима који имају "два лица" (54, 55).

Последњих деценија све више расте број болести у којима се разматра директан утицај ROS и оксидационог стреса као медијатора у механизму настанка ових стања.

1.3.1.1. Супероксид ањон радикал ($O_2^{\bullet-}$)

Супероксид ајон радикал може настати при одвијању процеса дисања, фотосинтези и фотореспирацији, непотпуном редукцијом молекулског кисеоника на мембранама митохондрија, хлоропласта и ендоплазматског ретикулума, може настати оксидацијом хемоглобина и миоглобина као и аутооксидацијом веома реактивних хемијских једињења (56-58). У литератури се може срести и податак да ова реактивна кисеонична врста може бити продукт у организму и након зрачења као и након примене цитостатика (59, 60).

Премда се ретко може срести да се описује висока токсичност супероксид анјон радикала, његова важнија особина је могућност да са различитим биолошким молекулима ступа у реакције и тако учествује у преношењу интрацелуларних сигнала, такође може да ступа у реакције са другим слободним радикалима при чему настају друге реактивне честице. Реакцијом два супероксид анјон радикала настаће водоник пероксид и у физиолошким условима ову реакцију катализује супероксид дизмутаза (SOD). Уколико $O_2^{\bullet-}$ избегне дисмутацију даље ће реаговати или са азот моноксид радикалом формирајући пероксинитрит или ће на више начина са транзиционим металима учествовати у Fenton – овој реакцији са водоник пероксидом формирајући хидроксил-радикал (60, 61).

1.3.1.2. Водоник пероксид (H_2O_2)

Водоник пероксид представља најстабилнији од свих облика реактивних кисеоничних врста. Има улогу код процеса преношења сигнала у ћелији а може довести до промене протеина тако што ступа у директне реакције са тиолима цистеинских остатака протеина или индиректно преко тиреодоксина или глутатиона (62).

Штетни ефекти ове ROS врсте су дозно зависни па тако ниске концентрације H_2O_2 могу деловати пролиферативно пре него антипролиферативно.

Најштетније дејство водоник пероксид остварује када у реакцији са супероксид анјон радикалом или јонима метала настаје хидроксил радикал (OH^{\bullet}) који је заправо најснажнији активатор липидне пероксидације ћелијских мембрана (54).

1.3.1.3. Остале реактивне кисеоничне врсте

Хидроксил радикал (OH^{\bullet}) је свакако један од најтоксичнијих врста ROS-а. Ступа у реакције са готово свим биомолекулима где се убрајају: фосфолипиди, нуклеотиди, алкохоли, аминокиселине, шећери и органске киселине при чему као продукти ових реакција поново настају слободни радикали чиме је омогућена даља слободно-радикалска реакција што резултира управо иреверзибилним оштећењима ћелија. Хидроксил радикал доводи до оштећења ћелијске мембране, поремећаја липидне пероксидације, оштећења

молекула дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и оштећења митохондријалне мембране (63).

Из реакције хидроксил радикала са полинезасићеним масним киселинама настају алкоксил радикали, док алкил радикали који настану процесом који је сличан липидној пероксидацији даље реагују са молекулима кисеоника при чему настаје пероксил радикал који на крају може бити узрочник настанка хидропероксида (62).

1.3.2. Липидна пероксидација

Засићене масне киселине и масне киселине које садрже једну двоструку везу, много су отпорније на деловање ROS-а него на дејство полинезасићених масних киселина (*PUFA* – *Polyunsaturated Fatty Acids*). Липидна пероксидација полинезасићених липида је процес који најчешће покреће хидроксил радикал (OH^\bullet), међутим и поједини други радикали могу покренути процес пероксидације.

Процес липидне пероксидације одвија се у три ступња: иницијација, пропација и терминација. Реакција молекуларног кисеоника са полинезасићеним масним киселинама због спинског стања није могућа па се пероксидација одвија слободно-радикалским механизмом којим се преошћују спинске препреке између кисеоника и PUFA-е и ова реакција је самопропагирајућа у ћелијској мембрани.

Као последицу, изоловане оксидационе реакције могу имати дубоке ефекте на функцију мембране. Производи липидне пероксидације се лако детектују у крвној плазми и користе се за мерење оксидационог стреса. Најчешће се одређује концентрација малонилдиалдехида (MDA) који настаје из липидних пероксида у процесу липидне пероксидације (64, 65).

1.3.3. Реактивне врсте азота (RNS)

Све реактивне врсте било кисеоника било азота нису увек лоше по живу ћелију али ипак због високог процента вероватноће за биореактивност оне поседују потенцијал за

нарушавање физиолошких функција свих важних биомолекула у организму као што су протеини, угљени хидрати, липиди и нуклеинске киселине.

Представник реактивних врста азота је азот моноксид ($\bullet\text{NO}$) чији метаболизам и реактивност доводе до стварања многих других RNS, где се убрајају: пероксинитрит, азот диоксид, диазот триоксид и диазот тетраоксид (66).

1.3.3.1. Азот моноксид ($\bullet\text{NO}$)

Азот моноксид има бројне улоге у редокс сигнализацији као слободни радикал. $\bullet\text{NO}$ се синтетише из L-arginina у реакцији коју катализује ензим азот моноксид синтаза-NOS (Nitric Oxide Synthases-NOSs). Азот моноксид има кратак полу-живот у ћелијама и делује као сигнални молекул тако што се везује реверзибилним везама за поједине металне јоне. Овај слободни радикал је сам по себи слабо реактиван али због своје директне улоге у сигналним механизмима може да доведе до стварања других реактивних врста које касније могу бити медијатори у редокс сигналном путу. Најбржа реакција азот монооксида је свакако реакција са супероксид анјон радикалом. При овој реакцији настаје токсични пероксинитрит, а супероксид анјон радикал инхибира још и функцију eNOS тако што скраћује полу-живот азот монооксида умањујући његову расположивост.

Како у физиолошким стањима супероксид анјон радикал бива елиминисан од стране ензима супероксид дисмутазе тако реакција азот монооксида са хемоглобином представља примарни механизам уклањања и инактивације $\bullet\text{NO}$ *in vivo* (67, 68, 69, 70).

1.3.4. Антиоксидациони заштитни систем

Као резултат нормалне метаболичке активности реактивне врсте кисеоника су присутне у свим деловима ћелије. Међутим, као што смо и раније напоменули, под утицајем различитих физичких чинилаца постоји могућност да се њихова продукција повећа. Еволуцијом су се у ћелијама као потенцијалним метама за оксидациона оштећења развили различити антиоксидациони заштитни системи (*Antioxidant Defence system-AOS*). AOS обухвата механизам заштите од повећане акумулације ROS-а што подразумева

превентивне и репаративне механизме, механизме физичке одбране и механизам антиоксидационе заштите (71).

AOS се састоји из примарне и секундарне антиоксидационе заштите. У примарну антиоксидациону заштиту укључене су ензимске и неензимске компоненте чија активност се може уочити и у условима нормале као и у условима повећане продукције ROS-а. Секундарна антиоксидациона заштита подразумева део заштитног механизма који се односи на "поправку" биомолекула након оксидационих оштећења и у тај процес се укључују специфичне оксидоредуктазе (72-75).

1.3.4.1. Примарни антиоксидациони систем заштите

У ензимске компоненте AOS убрајају се супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион-пероксидаза (GSH-Px), глутатион-редуктаза (GR), а по најновијим класификацијама глутатион-S-трансфераза (GST) припада ензимима II фазе биотрансформације (76).

Неензимске компоненте AOS чине једињења чија је класификација урађена према њиховој способности проласка кроз липосолубилне односно хидросолубилне средине. У липосолубине се обрајају пре свега липосолубилни витамини као што су витамин Е (α -токоферол), витамин А (ретинол), провитамин А (β -каротен) и коензим Q (убихинон), док хидросолубине чине мокраћна киселина, албумин, трансферин, полиамини, билирубин, глутатион (GSH) и L-аскорбинска киселина (витамин C) (77).

1.3.4.2. Секундарни антиоксидациони систем заштите

Систем секундарне AOS чине бројна нискомолекуларна једињења а собзиром на разноврсност хемијских и физичких особина ових једињења, различити су и механизми којима они могу да остваре своје дејство. У овај систем могу се убројити једињења која ће извршити "поправку" оштећења насталих пропустима примарног система (ДНК-полимераза, ДНК-лигаза итд.) и једињења која потпуно уништавају настала оштећења (протеин-специфичне оксидоредуктазе, АТФ- и Ca^{2+} -независна протеаза) (78, 79).

1.4. ФЕНОМЕН ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА

Нема никакве сумње да је исхемија миокарда (ИМ) једна од главних узрочника обољења и смртности у целом свету. Разне медицинске и хирушке стратегије су развијане током година како би се умањили дубоки и погубни ефекти на метаболизам и контрактилност миокарда као и на одрживост миоцита услед акутног инфаркта миокарда (АИМ). Приступу су различити али најчешће обухватају коришћење тромболитичких агенаса, антагониста β -адренергичких рецептора, инхибитора ангиотензин конвертујућег ензима (АСЕ), коришћење антиоксиданаса, примену транслуминалне коронарне ангиопластике, уградњу бајпаса коронарне артерије. Једна од ретких интервенција која је универзално прихваћена а и данас изазива велику пажњу од стране научног света је свакако феномен прекондиционирања срца исхемијом (80, 81).

Прекондиционирање као појам односи се на појаву да организам постаје толерантан или отпоран на велики стрес ако је пре тога био изложен блажој форми истог стреса. Први је у употребу термине "прекондиционирање" и "толеранција" увео Janoff још шездесетих година прошлог века и заправо мислио на стресом изазвану толеранцију на трауме или оштећења ендотоксинима (82).

Сам феномен прекондиционирања описивао се као механизам "све или ништа" (83). Међутим, у зависности од модела, постоје одређене контроверзе и питања као на пример да ли је прекондиционирање исхемијом (ПИ) само по себи довољно да редукује величину инфаркта или заправо треба мислити и о јачини прекондиционирајућег стимулуса? Наиме, студије *in vivo* спроведене на моделу пацова и свиња показују да величина инфаркта варира у односу на примењену снагу прекондиционирајућег стимулуса, сугеришући на тај начин градирану реакцију, тако да је више него вероватно да прекондиционирање даје веома стрму криву доза-одговор (84) док са друге стране, студије на зечевима, људима и свињама указују да прекондиционирање исхемијом од једног до два минута након чега следи реперфузија не даје значајне ефекте (85).

Већ од 1960-тих када су Dahl и Balfour показали у својој експерименталној студији да су пацови преживели аноксију након што су претходно били изложени блажем хипоксичном стресу (86, 87), постоје бројне студије које су показале да феномен прекондиционирања успешно функционише како на мозгу тако и на срцу. Временом је

број студија растао а самин тим и број модела на којима су уочени ефекти прекондиционарања (88, 89). Сам прекондицирајући стимулус доводи до покретања читаве каскаде ендогених адаптивних механизма који у крајњем резултирају развојем толеранције. Такође је показано да је прекондиционарање моћан механизам који штити миокард од исхемијских оштећења, да редукује појаву аритмија и да има улогу у очувању контрактилности срчаног мишића (90).

Поред тога, број примењених стимулуса може довести до преклапања механизма кроз испитивани систем, јер један стимулус може покренути прекондиционарање али у исто време и довести до унакрсне толеранције и заправо изазвати прекондиционарање за неки други стимулус (91).

Иако тачан механизам који је одговоран за прекондиционарање није у потпуности расветљен, постоји све више доказа који указују на то да ендогене заштитне супстанце миокарда као што су аденозин (92), брадикинин, простагландин и азот моноксид (NO) могу играти централну улогу (93). Међутим, како и где се врши меморисање прекондиционарања остаје и данас мистерија.

Како се ово истраживање односи на ефекте прекондиционарања на моделу изолованог срца пацова, највећу пажњу посветићемо управо врстама и ефектима прекондиционарања на овом за живот најзначајнијем органу.

1.4.1. Прекондиционарање миокарда исхемијом

Први описани тип прекондиционарања миокарда заснивао се на адаптивном феномену у коме кратке епизоде исхемије/реперфузије (И/Р) штите миокард од касније знатно дуже исхемије и реперфузије. Овај начин прекондиционарања назива се прекондиционарање исхемијом (ПИ). Murray је крајем деведесетих година прошлог века међу првима описао ову врсту прекондиционарања. Он наводи да кратке епизоде коронарне оклузије имају за крајњи резултат смањивање величине инфаркта (94).

Како би се уопште разумео механизам прекондиционарања исхемијом неопходно је пре свега знати да се значајан део оштећења ткива миокарда не дешава у самом периоду исхемије, већ у периоду реперфузије што се у литератури наводи као реперфузиона

повреда. Миокард може да издржи око 15 минута озбиљне па чак и апсолутне исхемије а да не дође до смрти ћелија. Међутим, кључну улогу има благовремена реперфузија, јер управо у овом периоду може доћи до нарушавања функције ткива као и до леталне реперфузије у којој долази до смрти миоцита и некрозе (81, 95).

Као што смо већ и напоменули Murry је први описао методу прекондиционирања исхемијом где 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. Као кратак период прекондиционирања исхемијом, Murry у својим истраживањима наводи периоде од 5 до 10 минута, а период заштите је ограничен на један до два сата након иницирања ПИ (94). Заштита која се јавља 24 – 72h након изазивања исхемије назива се други прозор одбране (*Second window of protection - SWOP*) који је повезан са променама у експресији гена доводећи до повећане продукције кардиопротективних протеина (81, 96).

Трајање прекондиционирања исхемијом изражено у минутима у првим постављеним моделима било је у циклусима од 5-10 минута, а једном изазвана исхемија у трајању од 90 секунди сматра се доњим прагом иницијације заштите (97).

Данас се сматра да дужина трајања и број циклуса исхемија/реперфузија (И/Р) којима вршимо прекондиционирање највише зависе од модела на коме се изводе експерименти. Успешност ПИ код пацова показала се након оптималне примене између 1-3 понављања кратких епизода И/Р где исхемија траје 3 минута а пре сваке наредне исхемије је реперфузија у трајању од 5 минута, код зечева је референтан један петоминутни циклус И/Р док је код паса потребан један циклус И/Р у трајању од 150 секунди (98).

Дужина трајања реперфузионог периода није ограничена, међутим зависи од тога шта желимо да испитамо. Сматра се да је реперфузија у трајању од најдуже једог часа најбоље огледало за процену максималне заштите и представља процену ефекта И/Р као првог прозора одбране, док је за процену SWOP потребно да период реперфузије траје и до 72 сата (97).

1.4.1.1. Механизам прекондиционирања исхемијом

Механизам који је одговоран за бенефите прекондиционирања исхемијом још увек није у потпуности разјашњен а постојеће студије претпостављају улоге мускаринских рецептора (99, 100), А1- адренергичких рецептора (101-103), АТР-зависних калијумових канала (104), брадикинина, рецептора за ангиотензин II (105, 106), и G протеина (107) као потенцијалних путева за ефекте исхемијског прекондиционирања. Без обзира на сигналне путеве који су укључени, готово је универзално прихваћено да унутарћелијски сигнали воде до транслокације и активирања протеин киназе C (PKC) (108). Биохемијским и имунолошким студијама директно је показана улога PKC у овом феномену а експерименталним студијама индиректно је доказана круцијална улога PKC јер је инхибиција ове киназе довела до супримирања ефеката прекондиционирања (109, 110).

Први сигнални елемент који је повезан са механизмом прекондиционирања био је аденозин. На моделу зечева, паса, свиња и пацова показано је да услед прекондиционирања исхемијом долази до повећања интерстицијалних концентрација аденозина (85).

После аденозина установљена је и значајна улога брадикинина код модела исхемијског прекондиционирања. Сматра се да се пораст концентрације брадикинина јавља пре пораста концентрације аденозина и да је посебно значајан у механизму мање интензивног прекондиционирања (85, 111).

АТР – зависни K^+ канали су се показали као важни кардиопротективни медијатори и првобитно је њихова кључна улога у прекондиционирању исхемијом претпостављена за сарколемалну K^+ - АТР-азу где долази до скраћивања акционог потенцијала. Међутим, данас се зна да поред сарколемалне постоји и митохондријална K^+ - АТР-аза (*mitoK_{АТР}*) на кардиомиоцитима. Касније се дошло до убедљивих доказа да су управо *mitoK_{АТР}* канали одговорни за заштиту кардиомиоцита у феномену прекондиционирања (84, 104).

Важност улоге азот монооксида (NO) у моделу прекондиционирања исхемијом утврдили су још крајем двадесетог века Parratt и Vegh (93). Истих година од стране Wanga и сарадника је утврђено да је ослобађање азот монооксида повећано, а продукција супероксид радикала убрзана у раној фази реперфузије, а затим је показано и да NO веома лако ступа у реакцију са слободним радикалима формирајући пероксинитрит ($ONOO^-$),

веома јак оксидант (112). Доказе о важности азот монооксида у прекондиционирању показали су Hattori и сарадници јер су применом инхибитора NO-а, показали да кардиопротективно дејство циклуса И/Р опада (113).

Иако се и данас мало зна о тачном механизму у ком учествује ендогени NO, сматра се да NO није окидач а ни медијатор у раној фази одбране од инфаркта миокадра након прекондиционирања исхемијом на моделу зечева и свиња (114-116). Разлог можда лежи управо у томе што је рани период реперфузије веома добар извор како азот монооксида тако и супероксида који међусобно реагују.

Механизам настанка реактивних кисеоничних врста (*Reactive oxygen species - ROS*) је веома битан код процеса реперфузионе повреде а експерименталне студије су показале да реперфузија након исхемије миокарда генерише оксидациони стрес који потом може бити посредник за инфаркт. Кисеоник који дође до миокарда који је претходно претрпео исхемију, доводи до формирања слободних радикала а пре свега супероксида, 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 појачавају продукцију ROS као и степен реперфузионе повреде. Оксидациони стрес током реперфузије миокарда такође смањује биорасположивост интрацелуларних сигналних молекула као што је азот монооксид, поништавајући тиме његово кардиопротективно деловање (95, 117).

У различитим студијама је показано да третман N-2-меркаптопропионил глицином (дифузибилним антиоксидантом) или диметилтиоуреом (сакупљачем слободних радикала) доводи до инхибиције протективног дејства исхемијског прекондиционирања (118-121). Код врста чија срца су богата ксантин оксидазом, слободни радикали могу настати директно из ксантин оксидазе деловањем на катаболизам пурина. То би евентуално могло довести до заштите непосредоване рецептором. У другим врстама, као што је зечије срце, слободни радикали имају много сложеније порекло (122).

Током протекле три деценије спроведена су бројна истраживања која су се бавила испитивањем различитих потенцијалних кардиопротективних агенаса у исхемији и реперфузионој повреди, а од ендогених механизма заштите наводе се пре свега повишена

производња аденозина, отварање АТР-азних калијумових канала и ослобађање азот монооксида (95).

На основу наведених података може се рећи да механизам на основу којих се одвија прекондиционирање исхемијом обухвата четири фазе: редукцију производње енергије од стране АТР-а кроз дужи временски период након исхемије ткива; генерисање слободних радикала од стране неутрофила и њихову директну целуларну токсичност у периоду исхемије али највише у периоду реперфузије; микроваскуларну дисфункцију и оштећење ентотела настале услед неадекватне перфузије у периоду реперфузије и реперфузиону повреду насталу услед преоптерећења калцијумом (81).

Све ове описане могућности на основу којих се може објаснити механизам прекондиционирања исхемијом треба узети са резервом јер се оне међусобно преплићу и у многеме зависе од начина и врсте стимулуса којим желимо да извршимо прекондиционирање. Такође, треба напоменути да конкретно прекондиционирање исхемијом има и своја клиничка ограничења јер није увек применљиво, посебно јер захтева физичко смањење снабдевања ткива крвљу што може бити тешко или непрактично у многим клиничким ситуацијама.

Након свих ових сазнања о постојању различитих путева којима се може објаснити механизам исхемијског прекондиционирања, установљено је и да разни стимулуси могу имати улогу агенса за прекондиционирање а међу њима су: хипоксија, срчани пејсмејкер, термални стрес, матичне ћелије, истезање као и многобројни фармаколошки агенси (85, 123-125).

1.4.2. Прекондиционирање фармаколошким агенсима на моделу миокарда

Прекондиционирање исхемијом је моћан заштитни ендогени адаптивни одговор срца на дужи период исхемијске повреде, али како смо већ навели да није увек применљиво, дошло се до развијања фармаколошке алтернативе. По дефиницији фармаколошко прекондиционирање односило би се на способност примењеног фармаколошког агенса пре коронарне оклузије да умањи величину инфаркта миокарда (126).

Међутим, још увек није у потпуности разјашњено да ли различити облици прекондиционирања фармаколошким агенсима (ПФА) деле исте молекуларне механизме са исхемијским прекондиционирањем.

У протеклим деценијама истраживачи су се бавили утицајем експресије неколико миоцелуларних гена и експресијом протеина који настају под утицајем стреса као индикаторима за опоравак миокарда након ПИ. У такве *de novo* протеине убрајају се ензими антиоксидативне заштите, протеини термореглације и неки још увек непознати протеини. Међутим и до данас је у научним круговима остало питање да ли инхибицијом ових протеина долази до умањења кардиопротективног дејства исхемијског прекондиционирања (127).

Rowland и сарадници су показали да је *de novo* синтеза протеина неопходна за испољавање позитивних ефеката ПИ на срцу пацова (128), али је веома мало познато да ли синтеза ових протеина има било какву улогу било на транслационом или транскрипционом нивоу у ПФА.

Због свега наведеног, истраживачка група Matsuyama и сарадника покушала је да утврди да ли су ПИ и ПФА зависни од синтезе нових протеина. Резултати студије у најмању руку су веома интересантни, постоји значајна повезаност у ефектима ПИ са стварањем *de novo* протеина али нису нашли повезаност *de novo* синтезе протеина и механизма деловања ПФА. Конкретно објашњење ове разлике не постоји, једино што ова група научника наводи као могуће да је ПФА има потпуно другачији пут дејства на срце пацова или да своје кардиопротективно дејство испољава на директнији начин у односу на ПИ (127).

Упоредно испитивање прекондиционарања фармаколошким агенсима и прекондиционарања исхемијом у погледу механизма дејства и могућег разматрања веће ефикасности једног од њих, дали су Loubani et al. Ова истраживачка група је на хуманом моделу кардиомиоцита испитивала утицај агониста $\alpha 1$ -адреноцептора и рецептора за аденозин у поређењу са исхемијским прекондиционарањем како би дала допринос у објашњењу деловања и утицаја активације РКС, p38 митогеном активирани протеин киназе (p38МАРК) и mitoK_{АТР} канала. Закључак изведен из резултата ове студије указује да ПФА има за резултат идентичан ефекат као и ПИ као и да поред тога РКС, p38МАРК и mitoK_{АТР} канали представљају саставни део сигналне трансдукције у овим кардиопротективним механизмима, где су заправо mitoK_{АТР} канали постављени узводно а p38МАРК низводно од РКС (129).

Како је циљ било које врсте прекондиционарања да умањи величину инфаркта, кроз доступне литературне податке данас се могу наћи истраживања у којима су коришћени најразличитији фармаколошки агенси.

Rigou и сарадници разматрали су примену анестетика (десфлуран, севофлуран, изофлуран и халотан) као кардиопротективе на моделу фармаколошког прекондиционарања. Ова истраживачка група користила је модел изолованог срца зеца и установила да се само за севофлуран не може рећи да поседује могућност да буде прекондицирајући агенс (130). Сматра се да и након што испоље своје примарно дејство као анестетици, ова група лекова има продужено дејство на миокард које се тумачи као кардиопротективно (131, 132).

Такође, постоје студије које указују да примена фармаколошких агенаса у циљу прекондиционарања а као додаток тромболитичкој терапији може умањити величину инфаркта и учесталост тахиаритмија као и број исхемијских напада код миокарда са нестабилном ангином (133, 134).

Ресвератрол, полифенол, добијен из грожђа и вина примењиван је од стране Imamura и сарадници на моделу iNOS *knockout* мишева, где су показали да ресвератрол није успео да изврши прекондиционарање iNOS *knockout* мишева док је са успехом дошло до редукције величине инфаркта и оксидационог стреса у групи мишева дивљег типа. Последица добијених резултата је управо активност инхибиторне NO синтетазе (135).

Данас се зна да транзициона повећања ослобађања ROS могу бити рани окидач за прекондиционирање док њихови високи нивои који се срећу у периоду реперфузије могу довести до инфаркта и апоптозе. Истраживања иду у смеру да оксидациони стрес има можда и најважнију улогу у механизмима прекондиционирања, јер студије показују да митохондријална дисфункција доприноси до старењем изазваних промена у срцу повећањем производње реактивних врста кисеоника (ROS) а на тај начин долази и до смањене толеранције на И/Р повреду, што резултира отварање митохондријалних транзиционих пермеабилних пора (mPTP). Студије указују да старењем миокарда долази и до повећаног ослобађања биомаркера оксидационог стреса док се антиоксидативна способност смањује (136, 137).

Како оксидациони стрес има своју улогу у реперфузиој повреди након инфаркта миокарда и како старење погоршава овај процес, применом сакупљача слободних радикала (Tempol), на моделу експерименталних пацова уочена су два могућа механизма којима Tempol мења митохондријалну ROS производњу. Један од механизма је и побољшавање митохондријалне биогенезе која је уско повезана са антиоксидативним механизмима а друга могућност је да после примене Tempol управо старење врши промене у нивоима и активности mPTP компоненти. У овој студији практично се дошло до закључка да хронична примена Tempol-а повећава антиоксидативни капацитет а тиме повећава и могућност одбране миокарда од оксидационог стреса односно од штете која настаје као последица старења, међутим ово истраживање није показало редукцију величине инфаркта код старијих животиња (138).

С обзиром на доказано постојање негастричне H^+/K^+ протонске пумпе у глатком мишићном ткиву миокарда, многе истраживачке групе покушале су да расветле дејство групе лекова који се називају инхибитори протонске пумпе управо на моделу фармаколошког прекондиционирања.

Инхибитори протонске пумпе (ИПП), смањују апсорпцију и количину јона калијума у васкуларним глатким мишићним ћелијама и смањују интрацелуларни рН. Омепразол као ИПП доводи до релаксације глатких мишићних ћелија миометријума и инхибира спонтане контракције код људи док други SCH 28080 јаки ИПП доводи до реверзибилне релаксације артерија на моделу свиња али и код људи, а и пантопрозол из

групе ИПП је такође показао позитивне ефекте при примени ових лекова као прекондиционарајућих агенаса. (139)

1.3.3. Значај прекондиционарања

Ране стратегије реваскуларизације најмоћније су средство за ограничавање степена исхемијске повреде. Мада су основе прекондиционарања исхемијом и фармаколошким агенсима успостављене како у погледу механизма дејства тако и у крајњим ефектима, студије које се баве овом тематиком морају бити настављене све док се не установе молекуларни механизми, лекови и њихове дозе у којима ће ове технике бити од користи пацијентима са исхемијом миокарда.

1.5. ИНХИБИТОРИ ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ (ИПП)

Инхибитори протонске пумпе (ИПП) су група лекова која је у протекле три деценије нашла примену у свим популацијама пацијената а чак је одобрена и у педијатрији за децу старију од једне године. Индикације за примену ових лекова су: стања пептичког улкуса укључујући чир на желуцу, гастроэзофагеални рефлукс и инфекције изазване бактеријом *Helicobacter pylori*.

Одговор на питање зашто баш ИПП припадају групи лекова која се у свету највише користи, пре свега лежи у изузетном терапијском ефекту али и у конформности која је пружена пацијенту јер се ови медикаменти примењују најчешће само једанпут дневно. ИПП делују тако што супримирају секрецију киселине управо у њеном последњем кораку без обзира на то да ли је секреција стимулисана или не.

Међутим, да би се ова група лекова разумела потребно је одлично познавање физиологије секреције желудачне киселине, начина везивања ИПП за гастричну H^+/K^+ - АТР пумпу као и узроке њихове активације и наравно познавање фармакокинетики, фармакодинамике и фармакогенетике ИПП.

Почевши са синтезом тимопразола у 1975. години, почео је пут ка развоју ИПП. Тимопразол је из ове групе лекова први показао својство да редукује секрецију желудачне киселине а представљен је као пролек јер је за његово дејство био потребан транспорт

киселине од стране АТР-азе. Међутим прве клиничке студије нису спроведене са тимопразолом јер је установљено да блокира преузимање јода. Само пар година касније синтетисан је омепразол, пионирски лек из групе ИПП који је почетком деведесетих година прошлог века ушао у клиничку праксу. После омепразола своје место у терапијској примени нашли су и лансопразол, пантопразол и рабепразол.

1.5.1. Хемијска интеракција протонске пумпе и инхибитора протонске пумпе

H^+/K^+ -АТР-азна протонска пумпа је велики протеин и састоји се од 2 субјединице; каталитичке алфа подјединице и регулаторне гликозилиране бета подјединице. Алфа подјединица има 10 трансмембранских сегмената и садржи укупно 28 цистеинских (Cys) остатака. Cys 813 је позиција ове аминокиселине у полипептидном ланцу која је идентификована као остатак погодан за деловање инхибитора протонске пумпе. Колико је цистеин важан у интеракцији ИПП са H^+/K^+ -АТР-азом, хемијску природу ове интеракције као и даљи метаболизам ових лекова најбоље су описали Roche и сарадници у чијем ревијском раду се јасно дају објашњења у вези читавог метаболизма лекова из групе ИПП. Појашњено је како код Roche-а, тако и у прегледу литературе од стране Shin и сарадника да се лекови из ове групе који спорије делују, везују за неку наредну секвенцу цистеина у зависности од свог афинитета (35, 140-142). Верује се да поред цистеина постоје и друге аминокиселине као што су анјонски глутатион и аспарагин које учествују у стварању и одржавању везе између ових пролекова и ензима (141).

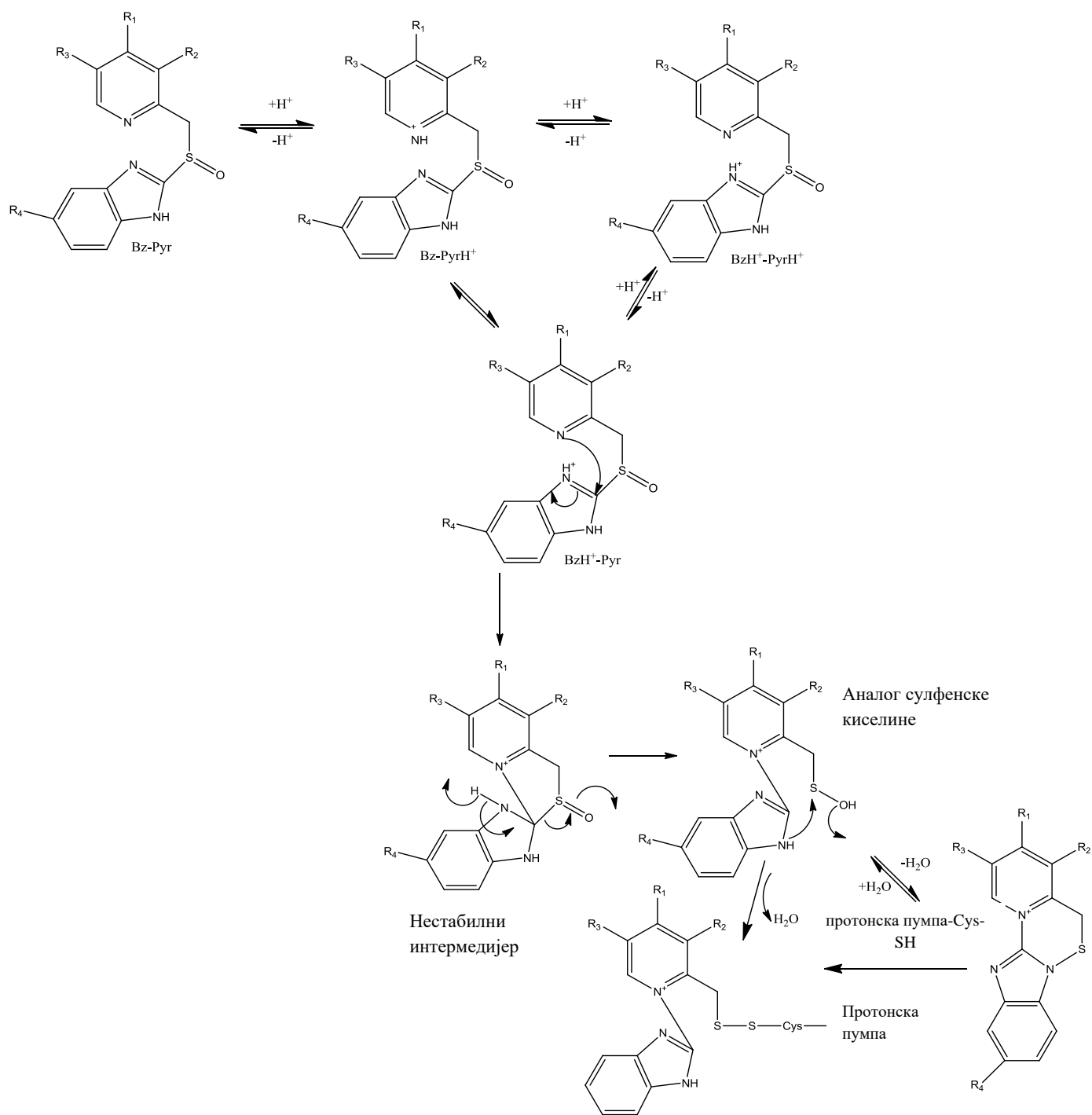
ИПП формирају ковалентну дисулфидну везу са АТР-азним ензимом, доводећи до неповратне инхибиције пумпе. У грађењу ове дисулфидне везе учествоваће један атом сумпора из аминокиселине цистеин и један атом сумпора од самог лека. Пошто је инактивација рецептора неповратна и завршена, ИПП су веома потентни и дуго-делујући лекови. Након ове иреверзибилне интеракције АТР-аза није у стању да се опорави и организам мора извршити *de novo* синтезу ензима, што захтева време. Све док нови протеин не буде синтетисан, секреција желудачне киселине се зауставља (141, 142).

За ову групу лекова се зна да функционишу као пролекови мада ова дефиниција није у потпуности тачна јер они не захтевају ензимску активност да би се покренуо њихов механизам деловања, међутим оно због чега се ИПП називају пролековима јесте реакција

која је кисело-катализована а којом долази до конверзије пролека до планарног тетрацикличног сулфенамида или сулфенских киселина. Тачније речено, форме које врше инхибицију су управо сулфенамид или сулфенска киселина које се затим ковалентно везују за кључну групу цистеина на ензиму доводећи тако до продужене инхибиције секреције желудачне киселине (*Слика 1.*) (141, 142).

Како настају активне форме ИПП на молекулском нивоу први су описали Roche и сарадници а по узору на њега, овај механизам описивале су и многе друге истраживачке групе које су у новије време даље и детаљније испитивале ову веома комплексну и за научни свет тему од изазова. Тако су Ward и сарадници објаснили да до активације ИПП долази протоновањем два атома азота са обе стране сулфонилне групе. На ИПП могу утицати две вредности pK_a (негативан логаритам константе дисоцијације киселина). Прва pK_a је у опсегу од 3,83 – 4,53 и доводи до јонизације и акумулације ових лекова у киселој средини паријеталних ћелија, на месту где и долази до лучења киселине ($pH=1,0$); друга pK_a је у рангу вредности од 0,11 – 0,79. Ово протоновање на делу молекула који садрже бензимидазолов прстен доводи до превођења сулфинил катјона у сулфенску киселину или сулфенамиде који поседују енергију за грађење једне или више дисулфидних веза са сумпором из аминокиселине цистеин (143).

Веза која настаје између ИПП и протонске пумпе је изузетно стабилна и иреверзибилна тако да неће доћи до секреције киселине од стране АТР-азе ни по цену да секреција буде провоцирана (141).



Слика 1. Механизма активације ИПП дат у општој формули, где су $R_1 - R_3$ супституенти на прстену пиридина, док је R_4 супституент на бензимидазолу прстену

1.5.2. Хемијска структура инхибитора протонске пумпе

По својој хемијској структури инхибитори протонске пумпе представљају супституисане бензимидазоле. Тренутно су у продаји ИПП који за основну структуру имају 2-пиридилметилсулфинил бензимидазол и варирају у смислу супституената било на пиридину или бензимидазолу. Оно о чему се највише води рачуна када је реч о супституентима је њихова хемијска природа. Уколико супституенти на пиридину имају електрондонорски карактер могуће је да ће баш они повећати стопу формирања активних сулфенских киселина док ће супституенти са електронпривлачним карактером имати супротну улогу. У зависности од карактера супституента, исто ће се дешавати и са бензимидазолом (141).

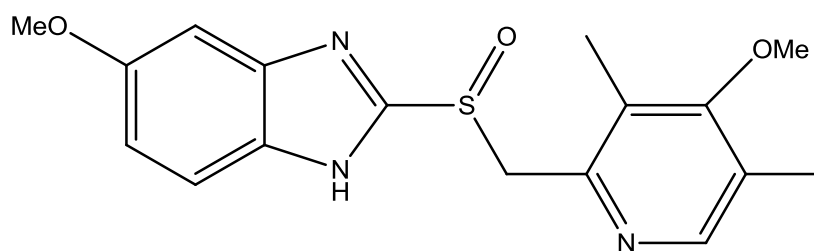
Инхибитори протонске пумпе дефинишу се као слабе базе и ова карактеристика им омогућава акумулацију на местима појачане секреције желудачне киселине, због тога ова група лекова има и до више десетина већу концентрацију на луминалној површини гастричне H^+/K^+ - АТР пумпе него у крви. Редослед стабилности ових пролекова у киселој средини је следећи: тенатопразол > пантопразол > омепразол > лансопразол > рабепразол (142).

1.5.2.1. Омепразол

Омепразол по својој хемијској структури представља (RS) - 5- метокси-2- (4 – метокси - 3, 5 – диметил -2- пиридинил - метилсулфинил) – бензимидазол (*Слика 2.*), емпиријске формуле $C_{17}H_{19}N_3O_3S$, састављене од атома угљеника, водоника, азота, кисеоника и сумпора и молекулске масе од 345,42 g/mol. Елементалном анализом доказан је процентуални састав елемената који чине структуру омепразола: С - 59.11%, Н - 5.54%, N - 12.16%, О - 13.90%, S - 9.28%. Омепразол се јавља у формулацији пудера беле или скоро беле боје (145).

Агенција за лекове и медицинска средства Србије (АЛИМС) регистровала је лек омепразол за следеће индикације: лечење улкуса дуоденума, превенцију релапса дуоденалног улкуса, лечење улкуса желуца, за превенцију релапса желудачног улкуса,

лечење пептичког улкуса изазваног *Helicobacter pylori* у комбинацији са одговарајућим антибиотицима, лечење дуоденалног и желудачног улкуса настолог као последица коришћења нестереоидних антиинфламаторних лекова (NSAIL), за превенцију дуоденалног и желудачног улкуса код пацијената на терапији NSAIL који су под ризиком, за лечење рефлуксног езофагитиса, за терапију пацијентима са залеченим рефлуксним езофагиитсом, за лечење симптоматске гастроезофагеалне рефлуксне болести као и за лечење Золингер-Елисон-овог синдрома (Zollinger Ellison). Ове индикације омепразола су одобрене и од стране америчког FDA (*U.S. Food and Drug Administration*).



Слика 2. Хемијска структура омепразола

1.5.2.1.1. Фармакинетика и метаболизам омепразола

Фармакокинетика омепразола проучавана је како на моделима различитих врста лабораторијских животиња тако и на хуманој популацији. Омепразол се са 95% везује за протеине плазме и готово се потпуно метаболише.

Regardh et al. су у свом истраживању дошли до закључка да се након орално примењеног омепразола код здравих добровољаца у системској циркулацији може наћи и до 54% овог лека (146). Cederberg и сарадници у својој студији показују да омепразол постиже пик концентрације у плазми после 30 минута од узимања прве оралне дозе а да волумен дистрибуције износи 0,3 l/kg. Овај лек се веома брзо елиминише из плазме а време полу-живота износи мање од једног сата док се за 3-4 сата омепразол у потпуности излучи из организма. Пионирски лек из групе ИПП се потпуно метаболише у јетри и има два метаболита: сулфо- и хидроксиомепразол. Око 80% унете дозе лека се излучи путем урина док се остатак излучи путем жучи (147).

Метаболизам свих лекова из групе ИПП одвија се путем фамилије ензима цитохрома P450 (CYP450). Полиморфизам ових ензима у метаболизму ИПП игра важну улогу па су тако форме CYP2C19 и CYP3A4 једне од главних компоненте биотрансформације ове групе лекова. Омепразол се путем CYP2C19 конвертује у хидроксил- и 5-О-диметил метаболите и у сулфоне путем CYP3A4. Како омепразол представља рацемску смешу два енантиомера, они захваљујући својим физичким и хемијским особинама имају различите афинитете према CYP ензимима. Тако је R-омепразол више осетљив на CYP2C19 него S-омепразол. Међутим, поред тога што се метаболише путем изоформи CYP-а, омепразол и инхибира ове ензиме доводећи до потенцијалних могућности за настанак интеракција између лекова (141).

1.5.2.1.2. Механизам дејства омепразола

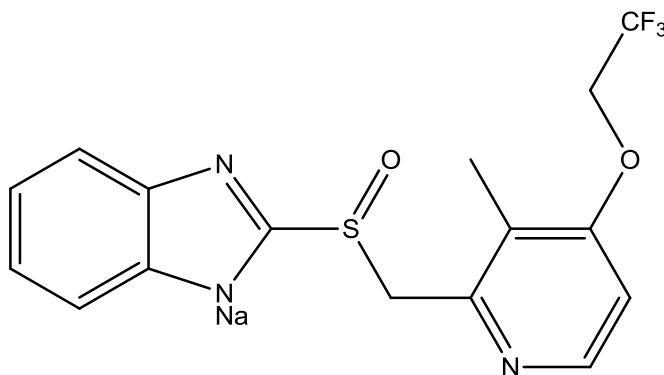
Омепразол сам по себи није активан инхибитор ензима али се он у организму трансформише до својих активних форми. Његову активну форму представља сулфенамидски изомер. Реакција која се даље одвија је неповратна и иде преко једног неактивног интермедијера до сулфенске киселине која даље има улогу у стварању дисулфидне везе са сумпором из аминокиселине цистеин на позицији 813 у базно катализованој реакцији (141, 145).

1.5.2.2. Лансопразол

Лансопразол по својој структури представља (RS)-2-([3-метил-4-(2,2,2-трифлуороексо)пиридин-2-ил]метилсулфинил)-1H-бензо[d]имидазол (Слика 3.). емпиријска формула овог лека је $C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$ и састоји се од атома угљеника, водоника, флуора, азота, кисеоника и сумпора и има молекулску масу од 369,36 g/mol. У формулацији је браонкастог кристалног прашка (148).

Агенција за лекове и медицинска средства Србије (АЛИМС) регистровала је лек лансопразол за следеће индикације: лечење симптоматске гастроезофагеалног рефлукса, лечење бенигног гастричног улкуса, улкуса дуоденума, диспепсија са хиперацидитетом,

терапија и профилакса улкуса код дугострајне примене нестереоидних антиинфламаторних лекова (NSAIL), хиперсекреторна стања укључујући Золингер-Елисон-ов синдром (Zollinger Ellison), рефлуксни езофагитис, ерадикација *Helicobacter pylori* у комбинацији са одговарајућим антибиотицима. Ове индикације лансопразола одобрене су и од стране америчког FDA (*U.S. Food and Drug Administration*).



Слика 3. Хемијска структура лансопразола

1.5.2.2.1. Фармакокинетика и метаболизам лансопразола

Лансопразол се апсорбује веома брзо након оралне примене а највећу концентрацију у плазми постиже након једног сата и тридесет минута од узимања оралне дозе. Око 97% лансопразола се везује за протеине плазме а биорасположивост овог лека већ након примене прве дозе је око 80%. Метаболише се у јетри а излучује путем фецеса а само се око 30% излучи путем урина. Полу-време елиминације је између 1-2 часа (149).

Као и омепразол, лансопразол се такође у највећој мери метаболише путем цитохрома P450 (CYP450) посебно преко изоформи овог ензима CYP2C19 и CYP3A4. Главни метаболити лансопразола су 5-хидрокси лансопразол и сулфон (141).

У ранијим истраживањима Kim и сарадника, откривено је да су концентрације у плазми R-енантиомера конзистентно виши од S-енантиомера и да је распоред енантиомер-селективног лансопразола мање под утицајем CYP2C19 генског полиморфизма него у случају омепразола, што сугерише да CYP2C19 - катализован метаболизам није доминантан пут утврђивања енантиселективног распореда лансопразола (150). Иако деле неке заједничке сегменте у погледу хемијске структуре ипак је уочено да лансопразол и омепразол немају исто каталитичко место када је у питању катализована хидроксилација

преко CYP2C19. Заправо омепразолу је место хидроксилације на пиридину а лансопрозолу на бензиимидазолу (151).

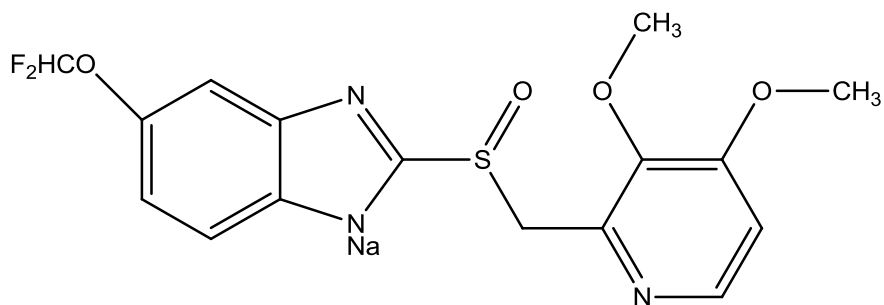
1.5.2.2.2. Механизам дејства лансопрозола

Механизам дејства лансопрозола заснива се, баш као и код читаве групе лекова који чине инхибиторе протонске пумпе, на грађењу дисулфидне везе између сумпора са молекула лансопрозола и сумпора са ензимске аминокиселине, обично цистеина. Поред тога што је високо специфичан за позицију 813, лансопрозол реагује и са цистеином на позицији 831 (35, 152).

1.5.2.3. Пантопрозол

На основу своје хемијске структуре, пантопрозол носи назив 6-(дифлуорометокси)-2-[(3,4-диметоксипиридин-2-ил)метилсулфинил]-1H-бензиимидазол (Слика 4.). Има емпиријску формулу $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ коју чине редом атоми угљеника, водоника, флуора, азота, кисеоника и сумпора. Панторазол има молекулску масу од 383,37 g/mol. Овај лек је беличаста чврста супстанца.

Агенција за лекове и медицинска средства Србије (АЛИМС) регистровала је лек лансопрозол за следеће индикације: улкус дуоденума, улкус желуца, хиперсекреторна стања укључујући Золингер-Елисон-ов синдром (Zollinger Ellison), рефлуксни езофагитис, ерадикација *Helicobacter pylori* у комбинацији са одговарајућим антибиотцима. Ове индикације лансопрозола одобрене су и од стране америчког FDA (*U.S. Food and Drug Administration*).



Слика 4. Хемијска структура пантопрозола

1.5.2.3.1. Фармакокинетика и метаболизам пантопразола

Пантопризол има биоискористљивост од 77% након унете оралне дозе и метаболише се првим проласком кроз јетру док максимум концентрације у плазми постиже након 2-3 сата. Време полу-елиминације овог лека је један сат. Поседује дозно-линеарну фармакинетичку и потпуно се метаболише независно од начина примене као и сви други лекови из групе ИПП преко CYP2C19 и преко CYP3A4 полиморфних цитохрома. (153, 154). Бројне студије указују да омепризол има значајно већи потенцијал за ступање у интеракције са другим лековима у односу на пантопризол (155). Метаболизам пантопразола одвија се по сличном шаблону као и метаболизам лансопразола (144).

1.5.2.3.2. Механизам дејства пантопразола

Пантопризол је хемијски стабилније једињење од других лекова из групе ИПП, посебно ако се налази у средини која има неутралну рН вредност. Ова стабилност може се објаснити високом селективношћу пантопразола за две групе цистеина на позицијама 813 и 822 из полипептидног ланца ензима који и инхибирају (35, 152, 156).

1.5.2.4. Нови лекови из групе инхибитора протонске пумпе

Нови лекови из групе инхибитора протонске пумпе су пре свега стереохемијски изомери већ постојећих лекова и углавном имају исте индикације, сличну биодоступност како после оралне тако и после интравенске примене. Метаболишу се истим путем као и њихови претходници и показују јако мало склоности за интеракције са другим лековима. У новију генерацију ИПП спадају: есомепризол, декслансопризол, рабепризол док је елапризол још увек у клиничким истраживањима од стране US FDA.

1.5.3. Интеракције ИПП са другим лековима

Иако су инхибитори протонске пумпе релативно сигурни лекови који сами по себи веома ретко доводе до интеракција са другим лековима, међутим ипак постоји пар

идентификованих интеракција или се може рећи да се сумња у ове интеракције. Литературни подаци указују да лекови из групе ИПП могу смањити апсорпцију антибиотика из групе цефалоспорина, витамина В12 и кетоконазола, да могу повећати апсорпцију кларитромицина, дигоксина и теофилина у формулацији са продуженим ослобађањем. Оно о чему се мора највише водити рачуна код примене лекова из групе ИПП јесу параметри стања јетре јер се ови лекови највећим процентом управо метаболишу путем јетре а новија истраживања указују на то да омепразол може довести до пролиферације тумора јетре (157). Наравно треба дозирати правилно лекове у зависности од старосне доби пацијената (151).

1.5.4. Друге могуће улоге ИПП

Поред свих својих индикација које су главна карактеристика ових лекова и разлог њиховог синтетисања, године које су прошле од њихове прве примене па до данас донеле су пуно нових сазнања о овој групи лекова као и новитете у погледу њихове могуће терапијске примене у другим патофизиолошким стањима.

Због своје могућности да повећавају ниво гастрина у серуму и тако смањују секрецију желудачне киселине ИПП се данас захваљујући једном делу механизма који се одвија управо преко гастрина истражују и као могући фармаколошки агенсу у лечењу дијабетеса тип 2 посебно јер је улога гастрина још од раније раније позната а његови нивои у физиолошким и патофизиолошким стањима били су повезивани и раније са нивом гликемије и одговором инсулина (158, 159). У најновијим студијама, указује се да би ИПП били од велике помоћу у регулацији гликемије у дијабетесу тип 2, а неки аутори посебно издвајају пантопразол као лек избора (160-162).

Да су инхибитори протонске пумпе заиста посебна група лекова у сваком смислу те речи ових дана доказују научници широм света који налазе могућом примену ове групе лекова као агенаса који би потпомогли дејство антиканцерогене терапије. У овом случају мета за ИПП била би АТР-аза туморских ћелија. Дејством ИПП на АТР-азу ћелија тумора, изменила би се интрацелуларна расподела лека што би резултирало повишеним нивом лека у језгру и повећаном цитотоксичношћу. Може ли или не овако нешто бити применљиво у будућности остаје да се истражи (163).

Последњих година истраживачке групе су се бавиле и утицајем и могућим терапијским опцијама ИПП на кардиоваскуларни систем како на моделу експерименталних животиња тако и на људима.

1.5.4.1. Улога ИПП у феномену прекондиционирања

Студије на основу којих је и дизајнирана ова експериментална студија односиле су се управо на могуће бенефите улоге инхибитора протонске пумпе као фармаколошких агенаса у моделу прекондиционирања.

Gomes и сарадници су се у два своја истраживања осврнули на улогу прво омепразола а затим и пантопразола као могућих прекондиционирајућих средстава. У истраживању које су спровели са омепразолом уочили су да је овај лек статистички значајно допринео бољем опоравку изолованог срца пацова након повреде миокарда изазване исхемијом и реперфузијом. Сличне закључке извели су и из свог истраживања спроведеног са пантопразолом на изолованом срцу пацова (164, 165).

Резултати студија од стране Васаксиз и сарадника показују да уколико се за фармаколошко прекондиционирање примени пантопразол пре исхемије и реперфузије миокарда, обим повреде миокарда биће значајно умањен (139) а баш као и Gomes и сарадници и ова група научника сматра да је за успешност ИПП као агенаса за прекондиционирање миокарда одговорна инхибиција срчане H^+/K^+ АТР-азе о којој је раније било речи.

Неке клиничке студије показале су да интравенска примена ових лекова није штетна и да не утиче на промене хемодинамских параметара код пацијената у коронарној јединици (166) Управо због свог кратког задржавања у организму ИПП и немају прилику да одразе неко своје озбиљно нежељено дејство на миокард а у судији од стране Такаки и сарадника ИПП нису ни након дуготрајне примене променили испитиване параметре срчане функције и ови аутори сугеришу кардиолозима слободу у прописивању ове групе лекова (167).

II
ЦИЉ
ИСТРАЖИВАЊА

2.1 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свега наведеног циљеви наше студије били су следећи:

1. Евалуација ефеката акутне администрације различитих лекова из групе инхибитора протонске пумпе као фармаколошких агенаса у моделу прекондиционирања на функционисање миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
2. Евалуација ефеката исхемије у моделу прекондиционирања на функционисање миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
3. Процењивање ефеката акутне администрације инхибитора протонске пумпе као фармаколошких агенаса у моделу прекондиционирања, као и феномена прекондиционирања исхемијом на миокард и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
4. Испитивање учешће различитих биомаркера оксидационог оштећења: нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикала (O_2^-), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију при примени модела прекондиционирања исхемијом или инхибиторима протонске пумпе.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ

Пионир експерименталне технике испитивања кардиоваскуларне функције изолованог срца пацова, коју смо користили у овој студији био је чувени немачки физиолог Оскар Лангендорф (*Oskar Langendorff* 1853-1908).

Оправданост употребе овог модела како у овој студији тако и у многим другим је управо чињеница да се свеке године повећава број научних публикација, који користе неку од модификација Лангендорфовог модела у својим истраживањима.

3.1.2. Метод ретроградне перфузије изолованог срца при константном притиску

За изучавање функције миокарда и коронарне циркулације определили смо се за модификовани *Langendorff*-ов модел изолованог срца, применљив на изолованом срцу сисара (пас, мачка, зец, заморчић).

Постиге две класичне варијанте *Langendorff*-ове технике које се примењују у експерименталним истраживањима и то су:

1. Перфузија изолованог срца при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито;
2. Перфузија изолованог срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито;

при чему је други параметар променљива варијабла. У првој варијанти експерименталног модела променљива варијабла је притисак, који се региструје на писачу посебним системом преносника (трансдјусера), док је у другој варијанти експерименталног модела то проток, који се региструје „*flowmetrijски*“, тј. скупљањем венског ефлуента у одређеном временском интервалу или помоћу „*flow-metra*“, који се апликује директно у коронарно артеријско корито.

У оба експериментална модела ради се о средњој вредности променљивог параметра, с обзиром да се апсолутне вредности не могу третирати као поуздане. Узрок томе су специфичности самог срчаног рада: понављање срчаних циклуса, чије радне компоненте (систола и дијастола) не трају исто, фреквенца срца која се сваког тренутка

мења, минималне разлике у температури комплексног физиолошког раствора којим се срце перфундује итд. У циљу поузданости се, због тога, одређивање променљивог параметра у функцији задатог параметра регистује у трајању од 5 минута.

Ми смо се определили за другу варијанту модификованог *Langendorff*-овог модела, који као константну величину има притисак (70 cmH₂O), док је проток променљива компонента. Однос ових величина постављен је следећом формулом:

$$p = \text{const} / \text{protok} = 1 / \text{radijus}^4$$

Избор овог модела сматрамо оправданим, јер коронарна циркулација, као испитивани феномен у нашем истраживању, управо подразумева променљивост протока. Сагледавајући физиолошки аспект, перфузија изолованог срца при константном притиску има предност у односу на другу варијанту експерименталног модела, јер се у интактној циркулацији перфузиони притисак одржава константним (1, 7, 8).

3.1.3. Langendorff апарат LF-01 F-P

Експериментална истраживања у нашој студији су спровођена на *Langendorff* апарату марке **LF-01 F-P** произвођача Experimetria Ltd, Budapest, (Мађарска).

Овај апарат састоји се од следећих компоненти:

- Две вертикалне стаклене цеви, исте висине, од којих се цев мањег калибра налази у цеви већег калибра. Између површине ове две цеви циркулише вода, која се убацује у цев већег калибра путем бочних цеви и система црева, а претходно се у воденом купатилу загрева до одређене температуре. У цев мањег калибра се, методом негативног притиска убацује комплексан физиолошки раствор (у нашем случају Krebs-Henseleit-ов раствор), који има сличне перформансе као екстрацелуларна течност. Циркулишућа вода у цеви већег калибра се загрева тако да раствор у цеви мањег калибра на излазу из система има температуру 37 °C тј. оптималну телесну температуру. Цев мањег калибра се завршава излазом, на који се поставља препарат изолованог срца;
- Резервоара у коме се налази комплексни Krebs-Henseleit-ов раствор, чија је запремина 4 литра, који је спојен са једне стране са унутрашњом цеви мањег калибра, а са друге стране са боцом у којој се налази смеша гасова O₂/CO₂;

- Боце са смешом гасова у односу $O_2:CO_2=95\%:5\%$, а која је спојена са резервоаром у коме се налази Krebs-Henseleit-ов раствор. Боца са смешом гасова има двоструки задатак:
 - 1) да постигне физиолошки парцијални притисак кисеоника и угљен диоксида какав егзистира у артеријској крви и
 - 2) да негативним притиском који ствара у резервоару убацује раствор у унутрашњу цев система цеви;
- Каниле, која спаја изводну цев система цеви и асцедентну аорту изолованог срца пацова;
- Воденог купатила које загрева воду у спољашњој цеви и на тај начин индиректно постиже температуру физиолошког раствора од $37\text{ }^\circ\text{C}$ (изотермичност);
- Инфузионе пумпе, којом се жељени агенс адекватном брзином (у зависности од базалног коронарног протока) администрира непосредно на споју каниле и асцедентне аорте,
- Рачунара са одговарајућим софтвером (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) преко кога се континуирано прате кардиодинамски параметри срчаног рада (Слика 15). Рачунар је повезан са сензорима преко којих добија податке о раду срца.
- Сензора - трансдјусера који су са једне стране повезани са различитим структурама изолованог срца, а са друге стране са рачунаром. Улога сензора је у континуираном регистровању функције миокарда - леве коморе (промена притисака, систолног и дијастолног притиска, срчане фреквенце, притисака у аорти). На нашем моделу *Langendorff* апарата постоје три врсте сензора:
 - 1) Први сензор (transducer BS4 73-0184) је повезан са лучно савијеном, танком металном цеви на чијем крају се налази балончић (пречника 5mm, latex/ најлон фолија) испуњен дестилованом водом. Овај балончић се након пресецања митралне валвуле убацује у леву комору, надува, 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, (mmHg/s), $dp/dt\ min$ – минимална стопа промене притиска у левој комори, (mmHg/s), SLVP – систолни притисак у левој комори,

(mmHg), DLVP – дијастолни притисак у левој комори, (mmHg), и HR – фреквенца рада срца, (bpm).

2) Други сензор (perfusion pressure transducer) има фиксну позицију и смештен је непосредно уз канилу, односно аорту, чиме омогућава регистровање притисака у аорти. У садашњем истраживању смо преко овог сензора били у могућности да пратимо средњи (артеријски) притисак раствора (крви) у аорти – MBP, (mmHg).

3) Трећи сензор (temperature transducer) је такође фиксне локализације, уз стаклену комору која окружује изоловано срце, и региструје температуру срца.

Овакав експериментални модел омогућава регистровање и анализу следећих кардиодиманских параметара:

- $dp/dt \max$ – максимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, параметар помоћу кога смо индиректно процењивали контрактилну способност миокарда
- $dp/dt \min$ – минимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, параметар помоћу кога смо индиректно процењивали релаксантну способност миокарда
- 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 срца у минути (bpm)

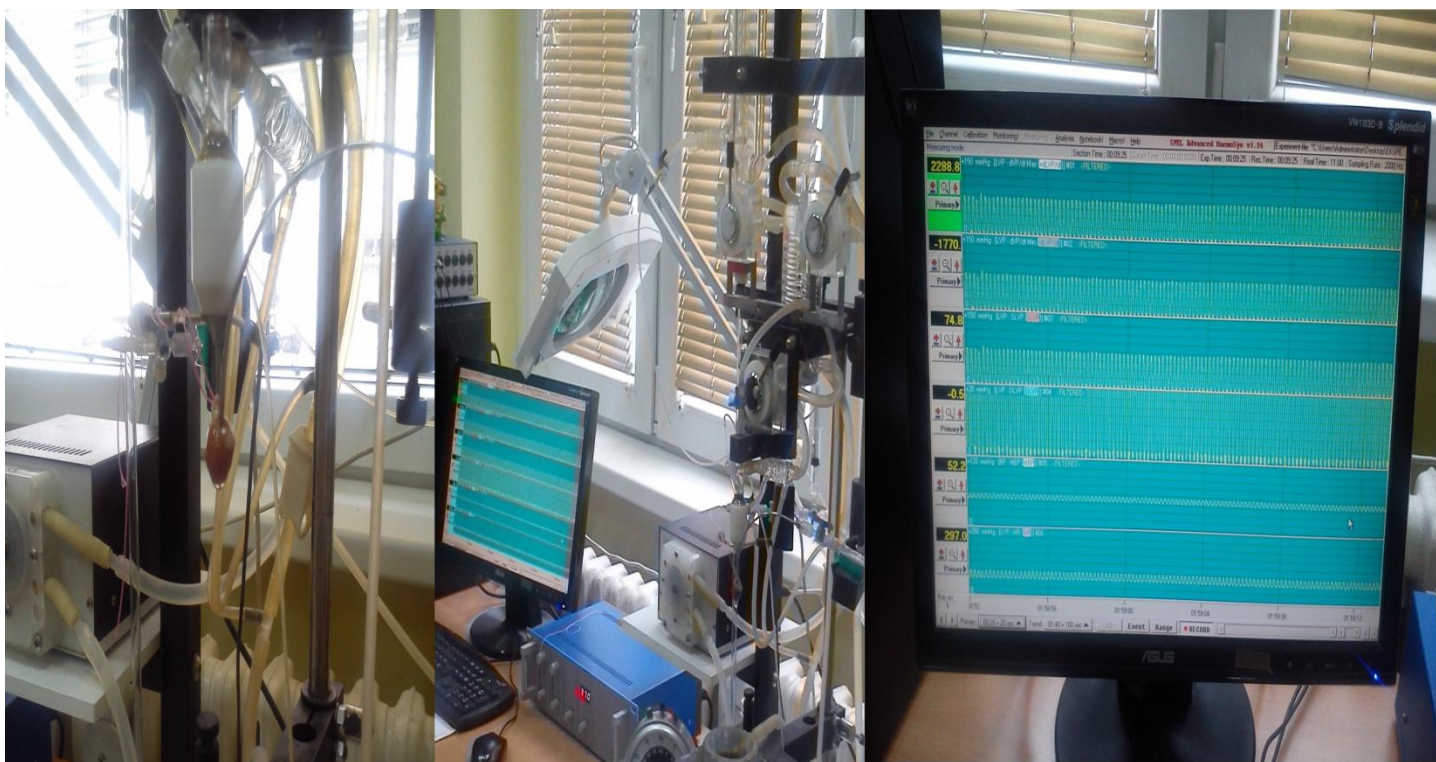
Коронарни проток (CF) је мерен флоуметријски (flowmetrically), и изражен је у ml коронарног венског ефлуента у минути (Слика 5).

3.1.4. Материјал потребан за правилно коришћење експерименталног модела

Што се тиче самог експерименталног модела, поред *Langendorff* апарата за правилно извођење експеримента потребно је још адекватно направити и комплексни Krebs Hensenleit-ов раствор који је по свом саставу врло сличан екстрацелуларној течности. Он се састоји из: NaCl – 118mmol/L, KCl - 4,7 mmol/L, MgSO₄ - 1,66 mmol/L, NaHCO₃ - 24,88 mmol/L, KH₂PO₄ - 1,18 mmol/l, глукоза (C₆H₁₂O₆) - 5,55 mmol/L, и CaCl₂ - 2,52 mmol/L. pH раствора износи 7,4. Улога овог раствора је да, обезбеди одговарајућу исхрану срца и тиме му омогући несметан рад.

3.1.4.1. Комплет реагенаса за припремање Krebs-Henseleit-овог раствора:

Натријум хлорид (NaCl , 27.216 g/4L), калијум хлорид (KCl , 1.4 g/4L), магнезијум сулфат ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1.636 g/4L), калијум дихидроген фосфат ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0644 g/4L), натријум бикарбонат (NaHCO_3 , 8.36g/4L), глюкоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$, 8.8g/4L) и калцијум хлорид ($\text{CaCl}_{2(\text{anh.})}$, 1.117 g/4L).



Слика 5. Оригинални графички запис једног од експеримената у коме су регистровани сви горе описани параметри (десно) и приказ изолованог срца пацова прикљученог на *Langendorff* апарат (лево)

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Све екперименталне процедуре су се спроводиле у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета Медицинских Наука у Крагујевцу. У нашем истраживању смо користили модел изолованог срца пацова Wistar albino соја, као најоптималнији за испитивану проблематику. Старосна доб жртвованих пацова је била 8 недеља, пол мушки, а телесна маса 250 ± 30 г грама. Животиње су чуване 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 ч часова) и са слободним приступом води и храни (ad libitum). Животиње су биле подељене у пет (5) експерименталних група (12 животиња у групи).

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.

Животиње се жртвују након краткотрајне етарске наркозе (дуготрајна би изазвала срчану инсуфицијенцију, што би за наша истраживања било контраиндиковано) цервикалном дислокацијом (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK). Након тога, уследило је хируршко отварање абдомена, дијафрагма је пресечена лучно, с лева на десно, а затим је грудни кош отворан, брзо, бочно, дуж мамиларне линије.

Да би се одржало у релативној хомеостази, током ових процедура, срце је преливано физиолошким раствором ($+4^{\circ}\text{C}$). По отварању грудног коша, пресечен је перикард на врху срца и на тај начин срце је било спремно за изоловање. Након пресецања перикарда, крвни судови на бази срца се ресецирају, орган се вади из грудног коша и одмах се ставља у леден физиолошки раствор, чиме се импровизује тзв. „физиолошка клешта“ и метаболички процеси у миокарду се сведе на минимум.

По стављању органа на лед, спроводи се тупа препарација базе срца, са отклањањем свих елемената, изузев асцендентне аорте, јер се кроз њу одвија ретроградна перфузија. Препарисана аорта се потом концем причвршћује (везује) за канилу чиме

експеримент почиње. У циљу што поузданијих резултата, односно одржања виталности препарата, потребно је да ова хируршка процедура траје свега 2-3 минута.

Након постављања изолованог срца на апарат по *Langendorff*-у, у пределу леве аурикуле, се пресеца лева преткомора, чиме се приступа митралној валвули. Потом се, пинцетом разарају митрални залистци, што у нашем експерименталном моделу има двоструки значај: 1) на овај начин притисак у левој преткомори је сведен на нулу, чиме се искључује сваки утицај на коронарну циркулацију, који не зависи од функције леве коморе. То омогућава постизање оптималних услова за ретроградну перфузију изолованог срца, јер ток раствора за перфузију има следећи смер: аорта - лева преткомора - лева комора - коронарни синус - коронарне артерије - коронарне вене, што фокусира и простор нашег истраживања на срце и коронарну циркулацију. 2) Прокидањем митралне валвуле се обезбеђује улазак и постављање претходно поменутог сензора у леву комору преко кога се прати функција срчаног мишића (региструју се притисци у левој комори срца: $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја 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 срца у минути).

Као што је већ поменуто, сви параметри функције леве коморе су повезани са софтверском јединицом и све време трајања експеримента се прате и снимају на монитору рачунара. Проток крви кроз коронарне крвне судове (CF) се изражава у ml/min и мери се скупљањем капи перфузионог раствора који излазе из коронарних крвних судова и срца, флуорометријском методом.

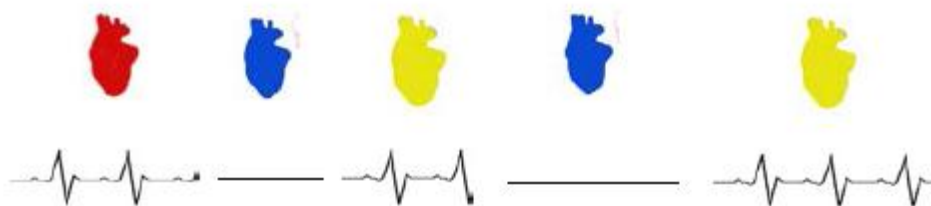
После успостављања стабилног (правилног) срчаног рада (коронарни проток након неколико серија мерења као и сви параметри срчане функције се не мењају значајно), за шта је потребно око пола сата, створени су услови за испитивање функције изолованог срца. Преко инфузионе пумпе се убацује испитивана супстанца (растворена у Krebs Hensenleit-овом), који кроз аорту, заједно са перфузионим раствором, улазе у срце.

Након контролног протокола испитиван је утицај експерименталних протокола по следећој схеми (*Схема 1*).

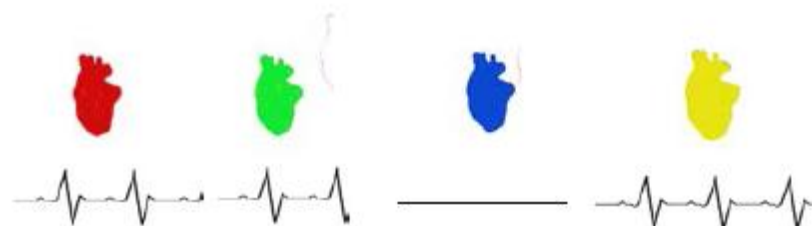
Протокол 1



Протокол 2



Протокол 3



Стабилизација



Реперфузија



Исхемија

Апликација 100μmol/l
лека

Схема 1. Приказ протокола коришћених у овом истраживању, где су трајања сваког дела експеримента изражена у минутима. Протокол 1. односи се на контролну групу, Протокол 2. на групу где је вршено прекондиционирање исхемијом док се Протокол 3. односи на прекондиционирање фармаколошким агенсима у виду лекова из групе инхибитора протонске пумпе.

Истраживање је било подељено у пет (5) експерименталних група (12 животиња у групи):

1. Експериментална група без икаквог прекондиционирања (контролна група),
2. Експериментална група са прекондиционирањем исхемијом,
3. Експериментална група са фармаколошким прекондиционирањем у виду апликације омепразола ($100\mu\text{mol/l}$),
4. Експериментална група са фармаколошким прекондиционирањем у виду апликације пантопразола ($100\mu\text{mol/l}$),
5. Експериментална група са фармаколошким прекондиционирањем у виду апликације лансопразола ($100\mu\text{mol/l}$).

Прва група представља контролну групу која је након стабилизације била подвргнута глобалној исхемији у трајању од 20 минута а потом се успоставио период реперфузије у трајању од 30 минута. Коронарни венски ефлуент је у контролној групи прикупљан у следећим тачкама експеримента: тачки стабилизације, првој тачки реперфузије након двадесетоминутне исхемије као и на сваких 5 минута током периода реперфузије. Друга група представља групу којој је вршено прекондиционирање исхемијом у трајању од 2 минута глобалне исхемије и 4 минута реперфузије после чега је уследио период од 20 минута исхемије након чега почиње реперфузија од 30 минута. Коронарни венски ефлуент је у групи прекондиционирања исхемијом прикупљан у следећим тачкама експеримента: тачки стабилизације, првој тачки реперфузије након двоминутне исхемије и на сваки минут у току тих четири минута затим у првој тачки реперфузије након двадесетоминутне исхемије као и на сваких 5 минута током периода реперфузије. Последње три групе престављају фармаколошко прекондиционирање једним од лекова из групе инхибитора протонске пумпе у трајању од 5 минута након периода стабилизације, после прекондиционирања срца подлежу глобалној исхемији у трајању од 20 минута након чега наступа период реперфузије у трајању од 30 минута. Коронарни венски ефлуент је у групама фармаколошког прекондиционирања прикупљан у следећим тачкама експеримента: тачки стабилизације, првој тачки реперфузије након двадесетоминутне исхемије као и на сваких 5 минута током периода реперфузије.

3.2.1. Лекови коришћени у експерименталном протоколу

За испитивање директних утицаја различитих облика хомоцистеина као и ефеката гасних сигналних молекула, на изоловано срце пацова употребљени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета поменутог произвођача - Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка): Омепразол (Omeprazole) MW= 345,42; Лансопразол (Lansoprazole), MW= 369,36; Пантопразол (Pantoprazole) MW= 405,35.

3.2.2. Експериментални протокол са *Artemia salina*

Познато је да лекови из групе инхибитора протонске пумпе постижу своју активност у киселој средини и да су слабо растворни при неутралној рН вредности, за потребе овог истраживања лекови су растворени у комбинацији Krebs-Hensenleit-овог раствора и хлороводоничне киселине. Међутим, како бисмо елиминисали утицај хлороводоничне киселине као растварача на сам ток и исход експеримента, извршен је оглед на соју *Artemia salina* при чему смо дошли до закључка да потребна концентрација хлороводоничне киселине за растварање омеоразола и лансопразола није цитотоксична.

Artemia salina (саламури шкампи, морски мајмуни) још од краја седамдесетих година предлагана је за рутинску употребу код тестова испитивања токсичности појединих супстанци (168). Ова метода употребе ларви *Artemia salina* за процену токсичности и данас је веома актуелна (169).

Пре свега за овај експеримент потребно је да се ларве *Artemia salina* излегу и за то је неопходно између 24 и 36 часа. Услови у којима долази до формирања *Artemia salina* су пре свега слана вода и температура око 37°C. Након добијања функционалних јединица које се крећу по сланој води, што се може уочити и "голим" оком, прелази се на следећи корак. *Artemia salina* се филтрира и одваја од воде у којој је дошло до инкубације, затим се иста количина распоређује у 6 различитих лабораторијских судова. За потребе нашег истраживања коришћено је 5 различитих концентрација хлороводоничне киселине почевши од 10^{-1} па све до 10^{-6} mol/l, док је у шестом суду била контрола односно вода у којој је и дошло до инкубације. Запажање о понашању *Artemia salina* у различитим

срединама бележено је видеозаписима и праћено у временском периоду од два сата. Период од два сата опсервације узет је као оптималан јер укупно трајање експеримента након примене лека који растворимо по додатку киселине износи сат времена. Успешним експериментом сматрао се суд у коме је остао највећи број јединки у покрету.

Као закључак из овог експеримента смо извели чињеницу да се *Artemia salina* готово потпуно изгубила (изгубила активност) у посматраном временском оквиру у судовима са где су биле највише две концентрације хлороводоничне киселине, у осталим судовима покретљивост јединки била знатно боља, с тим да су у највећем броју биле присутне контролној групи, што се и очекивало. На основу овог запажања, може се рећи да као растварач нисмо употребили такву концентрацију хлороводоничне киселине која би довела до токсичности и маскирања дејства лека.

3.3. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Биохемијске анализе су одређиване у узорцима коронарног венског ефлуента, који је сакупљан на крају контролног периода и на крају периода апликације испитиване супстанце. Сви реактивни молекули, који су били од интереса за наше истраживање су мерени спектрофотометријском методом на апарату марке Shimadzu UV-1800 спектрофотометар, Северна Америка.

3.3.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидационог стреса, је одређиван индиректно преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). У нашим истраживањима ниво TBARS-а у коронарном венском ефлуенту смо одређивали спектрофотометријски (170). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

У епрувете је пипетирано 800 μl коронарног венског ефлуента и 200 μl 1% ТВА у 0.05 М NaOH. 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. Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, па се приступило детерминисању концентрације ослобођених TBARS у коронарни венски ефлуент спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=530\text{nm}$.

Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине:

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

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.

3.3.1.1. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације:

2-тиобарбитурна киселина (ТВА, $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$), Mr 144.15; натријум хидроксид (NaOH) Mr 40.00.

3.3.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)

Одређивање количине ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представљало је за нас најдоступнију индиректну методу за одређивање функционалности ендотелног L-аргинин:NO система у коронарној циркулацији. С обзиром да су методе за директно одређивање азотног монооксида (NO) нама за сада недоступне, спектрофотометријска метода одређивања количине ослобођених нитрита (171)

представља доступну и довољно поуздану методу за ову процену. С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља количину ослобођеног NO-а.

Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-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 λ=550 nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

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

Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе

Концентрација NaNO_2 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:

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

3.3.2.1. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO):

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$), Mr 173.19; N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA, $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{C}_{12}\text{N}$), Mr 259.18; амонијум хлорид (NH_4Cl), Mr 53.49; Боракс ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$), Mr 381.4; 85% орто-фосфорна киселина (H_3PO_4), $\rho=1,685 \text{ gcm}^{-3}$; натријум нитрит (NaNO_2), Mr 69.00.

3.3.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анион радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (**Nitro Blue Tetrazolium** - **NBT**) до нитроформазан плавог (172). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}}=550\text{nm}$. Есејна смеша (“assay mixture”) садржи: 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 μl коронарног венског ефлуента и 950 μl 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 екстинксија 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 на следећи начин

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

3.3.3.1. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид ањонског радикала (O_2^-):

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминометан, $C_4H_{11}NO_3$), Mr 121.14; 37% хлороводонична киселина (HCl), $\rho=1,19 \text{ gcm}^{-3}$, Mr 36.5; Na_2EDTA , Mr 372.24; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, $C_{40}H_{30}ClN_{10}O_6$), Mr 817.6; Желатин ($C_{15}H_{11}N_2 NaO_2$), Mr 61.5 kDa.

3.3.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Детерминација количине водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*Horseshoe Radish Peroxidase* - HRPO). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ (173). 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 (*Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ($pH=7$), 5,5 mM D(+)-глукозе 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 М 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 μ l, 1 mM раствора H_2O_2 , 200 μ l дестиловане, 800 μ l раствора фенол црвеног и 10 μ l (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је $pH \approx 12$ помоћу 1 М NaOH (10 μ l). Тако је финална концентрација H_2O_2 у 3 узорака стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ H_2O_2 /ml. Мерење апсорбанце (A) спровођене су на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{max}=610nm$, 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:

$$F = \Delta A / \text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}$$

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

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$

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

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml /минут/g wt} = \Delta A / F \times CF / m_{\text{срца}}$$

3.3.4.1. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H₂O₂):

Калијум хидрогенфосфат дихидрат (K₂HPO₄ x 2H₂O) Mr 214.23; калијум дихидрогенфосфат дихидрат (KH₂PO₄ x 2H₂O) Mr 164.09; натријум хлорид (NaCl) Mr 58.44; водоник пероксид (H₂O₂), Mr 34.01; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), Mr 198.17; фенол црвено (phenol red, C₁₉H₁₄O₅S), Mr 354.4; пероксидаза из коњске ротквице (peroxidase from horse radish – HRPO EC 1.11.1.7), Mr 44 kDa.

3.4 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада података добијених по завршетку свих експеримената и биохемијских анализа спроведена је на следећи начин:

- 1) За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користила се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
- 2) За испитивање нормалности расподеле употребљени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*
- 3) За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове статистичке нормалности користио се Студентов т-тест, Упарен т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, употребљавао се *Bonferroni* тест.
- 4) Статистичка обрада података је рађена у статистичком пакету *SPSS 20.0 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences)*.

Статистичка обрада података добијених након завршених експеримената обухватила је три тачке од инетреса и то: тачку стабилизације, прву тачку реперфузије након двадесетоминутне исхемије као и последњу тачку тридесетоминутне реперфузије.

IV

РЕЗУЛТАТИ

4.1. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

4.1.1. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt max)

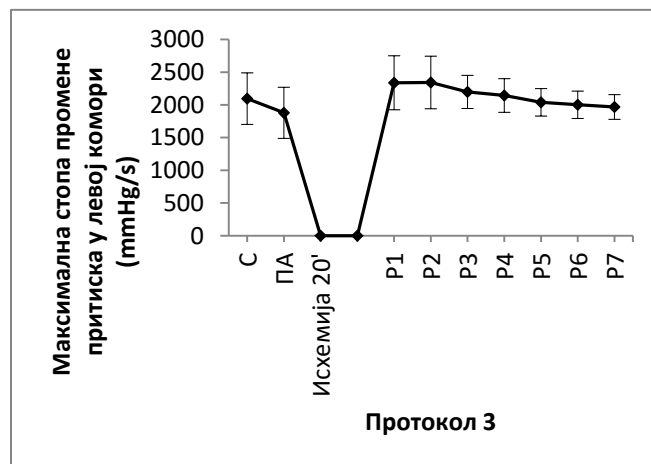
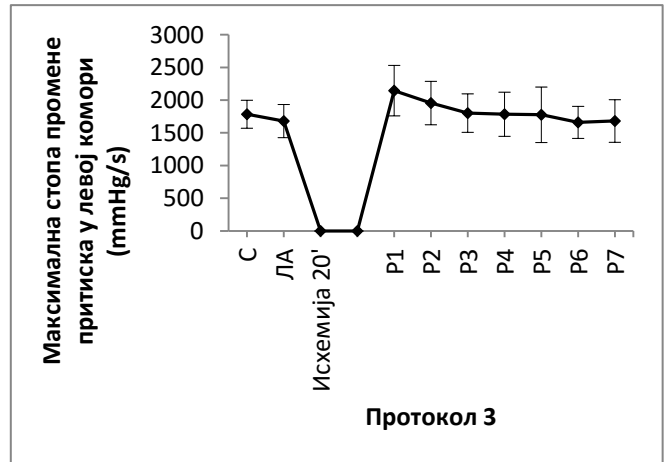
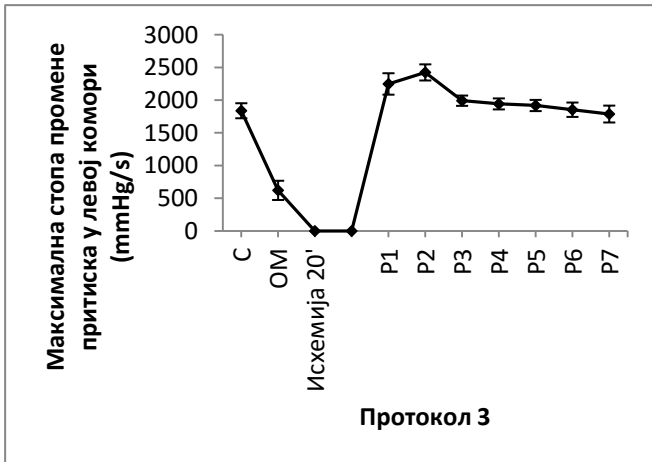
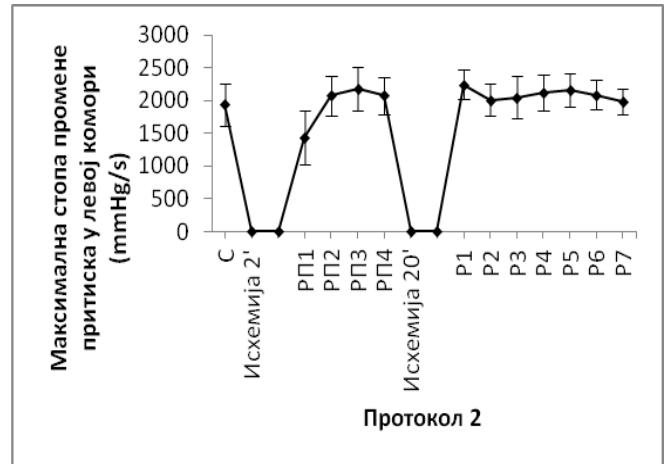
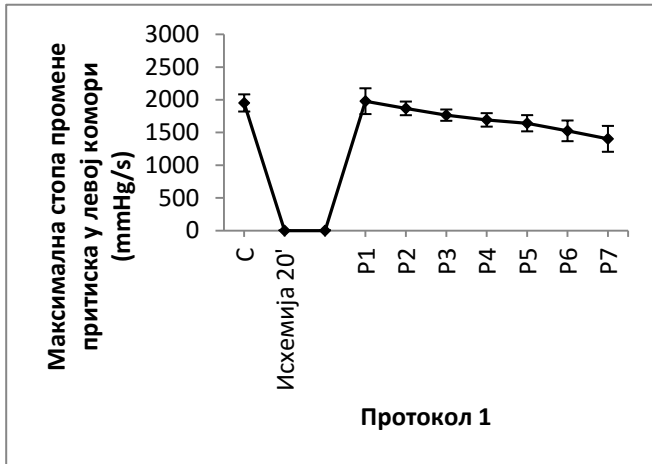
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 1 и Графику 1.

<i>Максимална стопа промене притиска у левој комори dp/dt max (mmHg/s)</i>					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омепразол	Преконд. лансопразол	Преконд. пантопразол
C vs P1	P>0.05	P>0.05	<i>P<0.01**</i>	P>0.05	P>0.05
C vs P7	<i>P<0.05*</i>	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
P1 vs P7	<i>P<0.05*</i>	P>0.05	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.05*</i>	P>0.05
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	<i>-29,11</i>	<i>-16,11</i>	<i>-20,47</i>	<i>-21,63</i>	<i>-15,82</i>
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	<i>-28,12</i>	<i>-10,21</i>	<i>-2,74</i>	<i>-5,80</i>	<i>-6,09</i>

Табела 1 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

У контролној групи, групи где је апликован омепразол као и у групи у којој је примењен лансопразол дошло је до статистички значајне разлике између прве и последње тачке реперфузије што показује и висок проценат за који се последња тачка реперфузије разликовала од прве тачке реперфузије. Ниједна испитивана група није довела до статистички значајне разлике између последње тачке реперфузије и тачке стабилизације.

График 1 Разлике у вредностима максималне стопе промене притиска у левој комори ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.1.2. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt min)

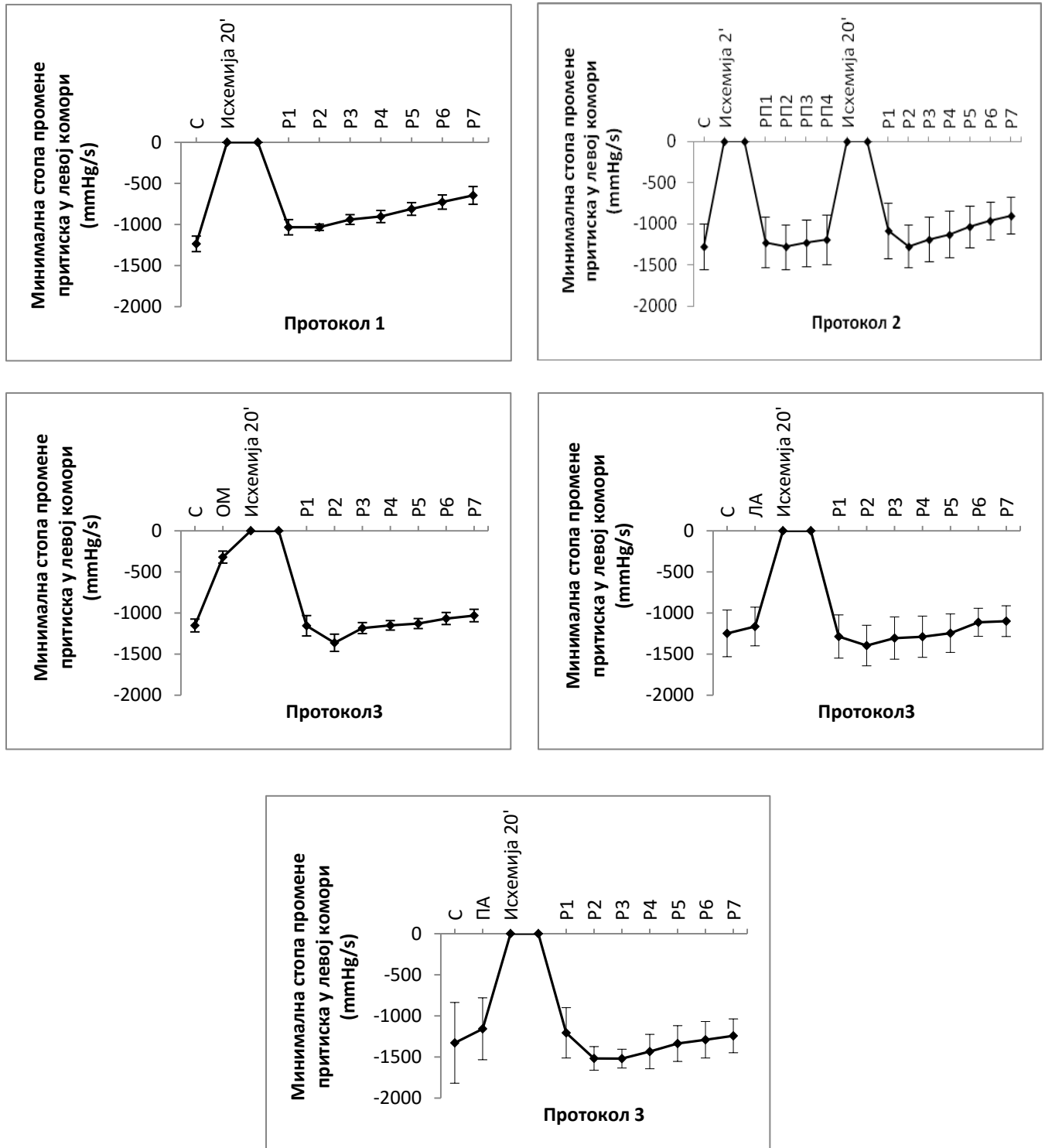
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 2 и Графику 2.

<i>Минимална стопа промене притиска у левој комори dp/dt min (mmHg/s)</i>					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омепразолем	Преконд. лансопразолем	Преконд. пантопразолем
C vs P1	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
C vs P7	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.05*</i>	P>0.05	P>0.05	P>0.05
P1 vs P7	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.05*</i>	P>0.05
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	<i>-37,47</i>	<i>-16,75</i>	<i>-10,78</i>	<i>-14,56</i>	<i>+3,01</i>
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	<i>-47,70</i>	<i>-29,34</i>	<i>-10,51</i>	<i>-11,93</i>	<i>-6,42</i>

Табела 2 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

У контролној групи, групама где су апликовани инхибитори протонске пумпе дошло је до статистички значајне разлике између прве и последње тачке, што није био случај у групи где је прекодиционирање извршено исхемијом, такође, група у којој је апликован пантопразол довела је до пораста вредности на крају реперфузије у односу на почетак за разлику од осталих испитиваних група које су снизиле вредности посматраног параметра у већој или мањој мери. Последња тачка реперфузије се у односу на почетну тачку стабилизације није разликовала у групама са омепразолем и лансопразолем.

График 2 Разлике у вредностима минималне стопе промене притиска у левој комори ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.1.3. Систолни притисак у левој комори (SLVP)

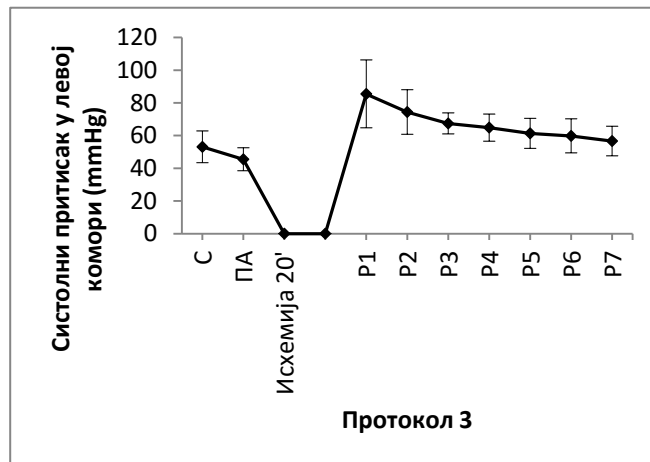
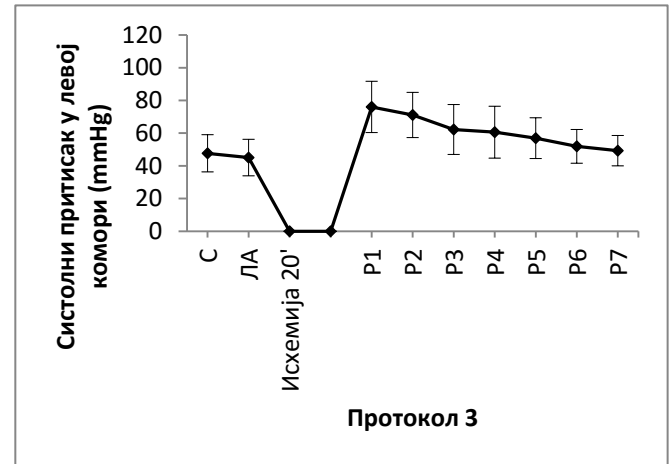
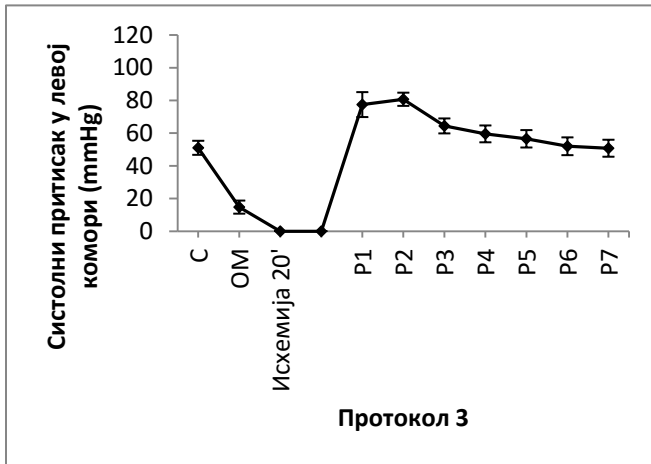
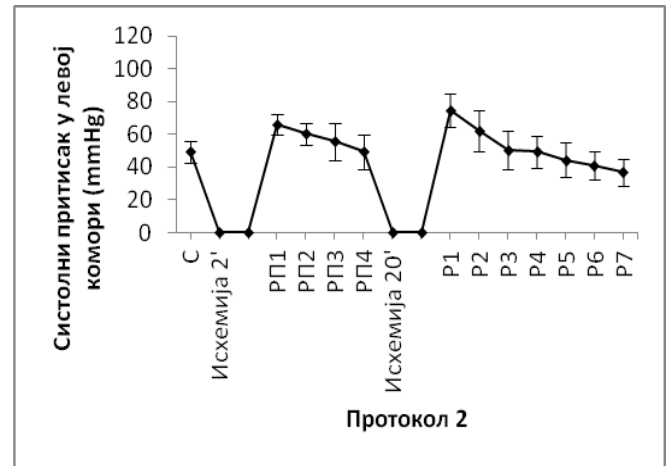
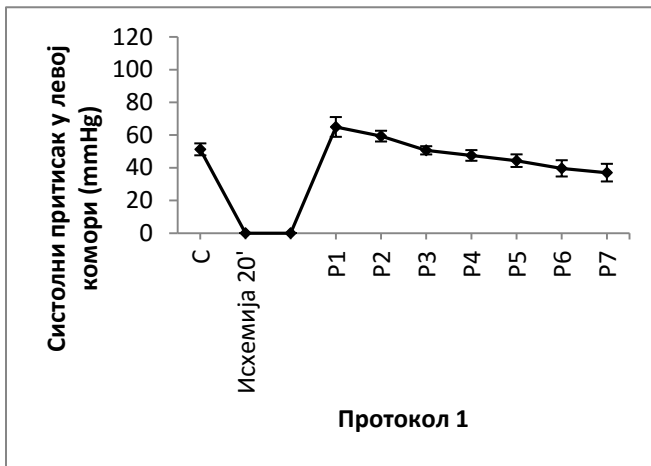
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 3 и Графику 3.

Систолни притисак у левој комори SLVP (mmHg)					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омепразолом	Преконд. лансопразолом	Преконд. пантопразолом
C vs P1	P>0.05	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.01**</i>
C vs P7	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.01**</i>	P>0.05	P>0.05	<i>P<0.05*</i>
P1 vs P7	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.01**</i>
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	-43,02	-50,70	-34,47	-35,18	-33,74
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	-27,78	-25,15	-0,52	+3,39	+6,69

Табела 3 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

Све испитиване групе осим групе у којој је апликован пантопразол довеле су до статистички значајног пада вредности последње тачке реперфузије у односу на прву тачку реперфузије. Група са пантопразолом једина је довела до статистички значајне разлике између последње тачке реперфузије и почетне тачке експеримента.

График 3 Разлике у вредностима систолног притиска у левој комори ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.1.4. Дијастолни притисак у левој комори (DLVP)

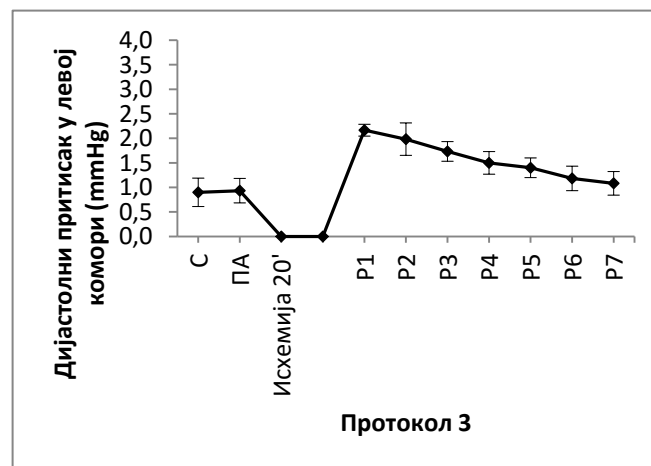
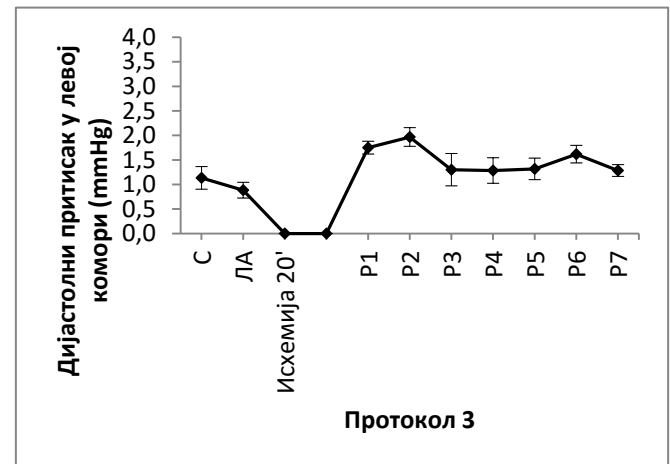
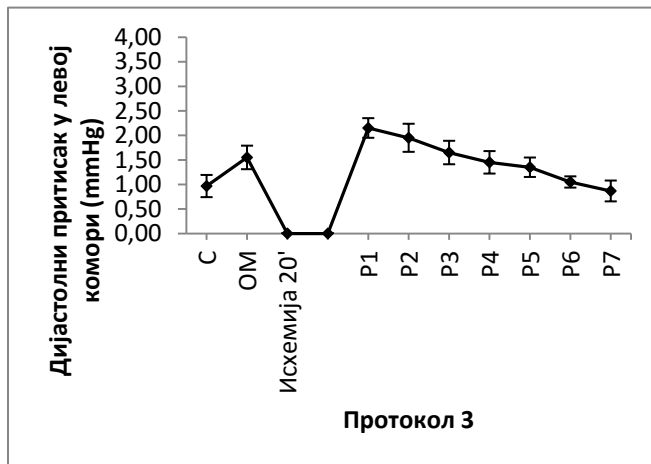
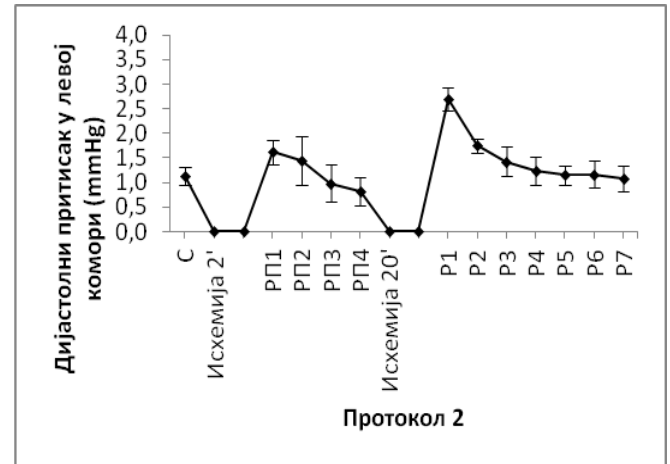
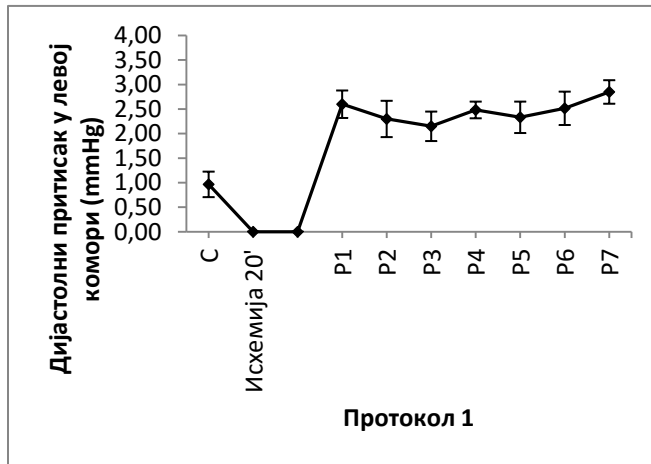
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 4 и Графику 4.

Дијастолни притисак у левој комори DLVP (mmHg)					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омепразолом	Преконд. лансопразолом	Преконд. пантопразолом
C vs P1	P>0.05	P<0.01**	P<0.05*	P>0.05	P<0.05*
C vs P7	P<0.01**	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
P1 vs P7	P>0.05	P<0.01**	P<0.05*	P>0.05	P<0.05*
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	+9,61	-59,88	-59,69	-26,67	-50,00
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	+194,83	-4,41	-10,34	+13,24	+20,37

Табела 4 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

Контролна група довела је до благог пораста вредности последње тачке реперфузије у односу на прву тачку овог периода док су остале групе довеле до процентуалног пада што се статистички значајно одразило на групе у којима је дошло до прекондиционирања исхемијом и омепразолом. Ниједна експериментална група не доводи до статистички значајне разлике између стабилизације и последње тачке реперфузије.

График 4 Разлике у вредностима дијастолног притиска у левој комори ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.1.5. Срчана фреквенца (HR)

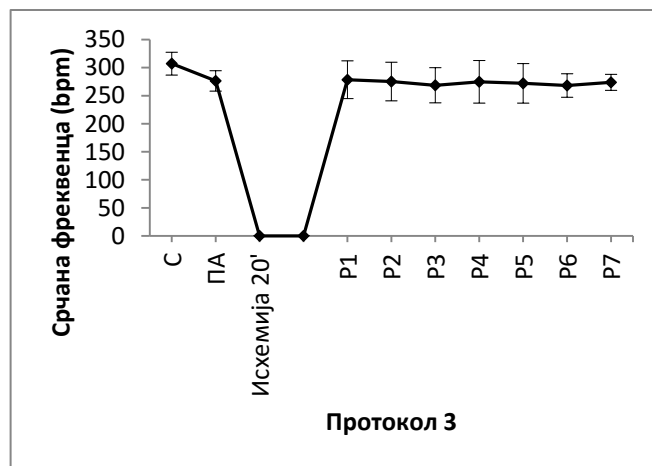
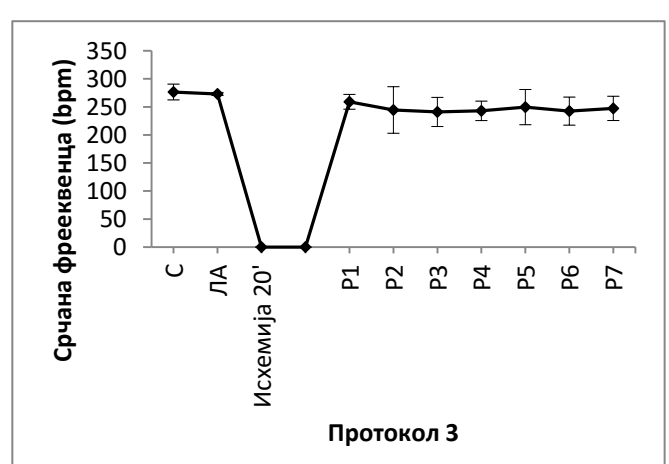
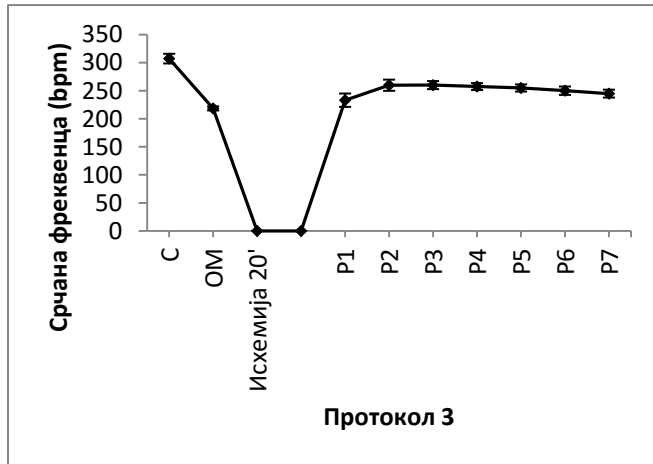
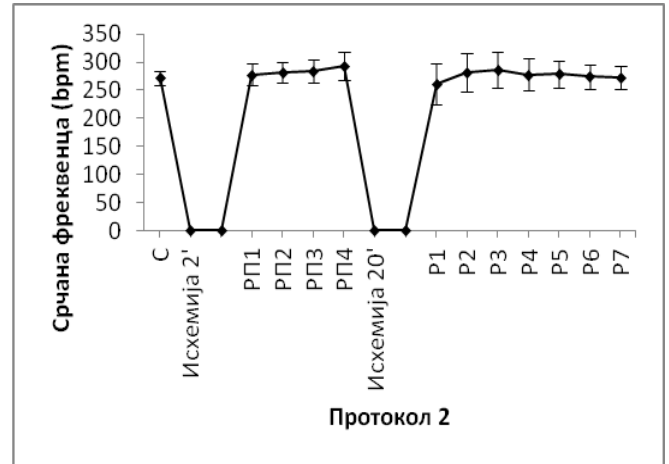
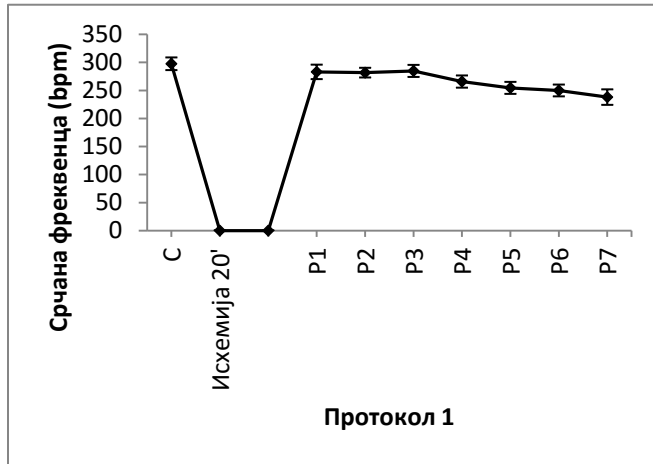
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 5 и Графику 5.

Срчана фреквенца Heart rate (bpm)					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омепразолом	Преконд. лансопразолом	Преконд. пантопразолом
C vs P1	P>0.05	P>0.05	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.05*</i>	P>0.05
C vs P7	<i>P<0.01**</i>	P>0.05	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.05*</i>
P1 vs P7	<i>P<0.05*</i>	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	-15,89	+4,26	+5,02	-4,54	-1,66
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	-19,99	+0,10	-20,31	-10,57	-10,86

Табела 5 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

Контролна група довела је до статистички значајног пада вредности у периоду реперфузије, док је група са исхемијским и преконачионирањем омепразолом довела до благог пораста вредности срчане фреквенце. Од свих испитиваних група једино група са преконачионирањем исхемијом није довела до статистички значајне разлике између тачке стабилизације и последње тачке реперфузије.

График 5 Разлике у вредностима срчане фреквенце ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.1.6. Коронарни проток (CF)

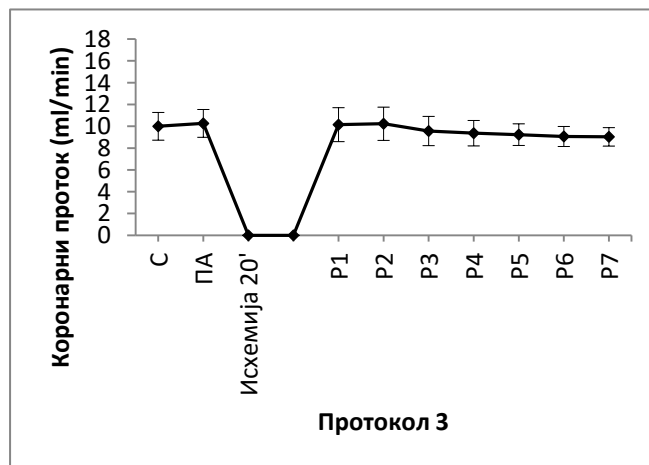
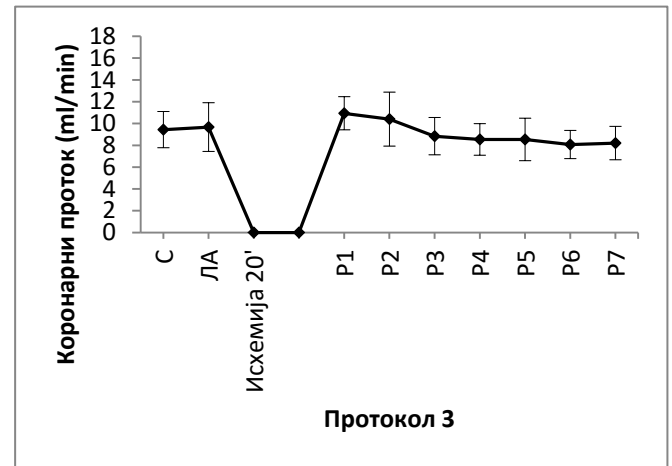
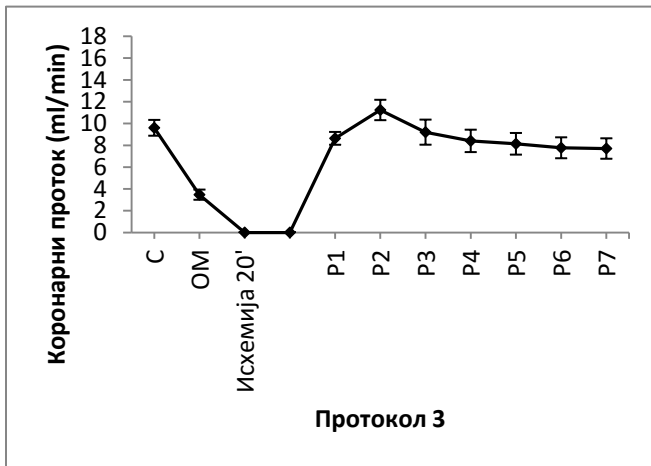
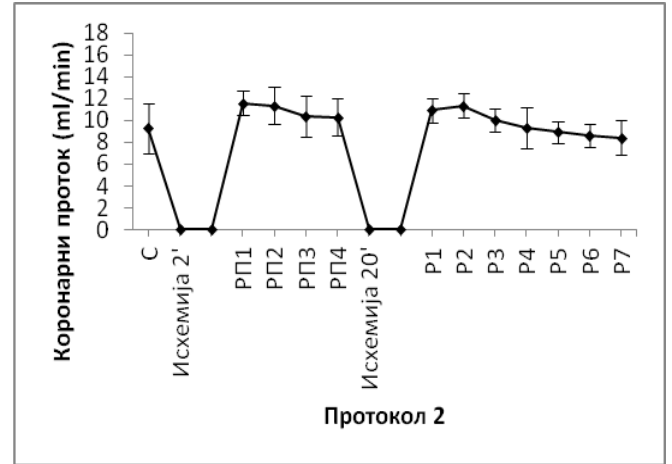
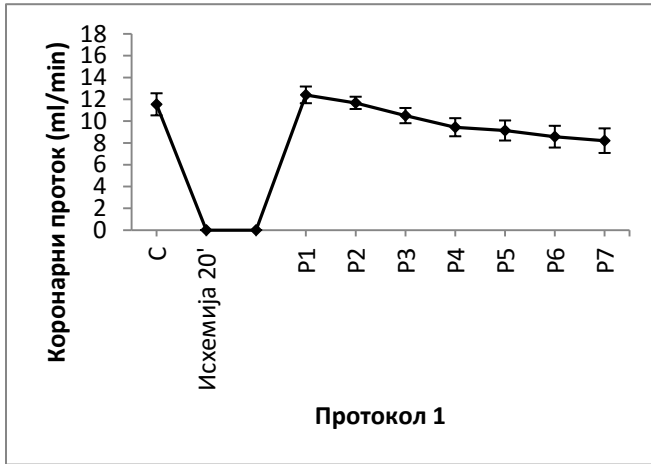
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 6 и Графику 6.

Коронарни проток Coronary flow (ml/min)					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Прекод. исхемијом	Прекод. омепразолом	Прекод. лансопразолом	Прекод. пантопразолом
C vs P1	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P<0.05*	P>0.05
C vs P7	P<0.05*	P>0.05	P<0.01**	P<0.05*	P>0.05
P1 vs P7	P<0.01**	P>0.05	P<0.01**	P<0.01**	P>0.05
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	-33,87	-22,87	-10,81	-25,00	-11,00
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	-28,90	-9,32	-19,79	-13,07	-9,67

Табела 6 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

Вредности коронарног протока у периоду реперфузије у свим групама су биле ниже на крају овог периода у односу на почетак, што је статистички било значајно у контролној и групама у којима је апликован омепразол и лансопразол. У свим групама осим при исхемијском прекодиционирање и при апликацији пантопразола постоји статистички значајна разлика између тачке стабилизације и последње тачке реперфузије.

График 6 Разлике у вредностима коронарног протока ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.2. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ НА МАРКЕРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗ КОРОНАРНОГ ВЕНСКОГ ЕФЛУЕНТА

4.2.1. Нитрити (NO_2^-)

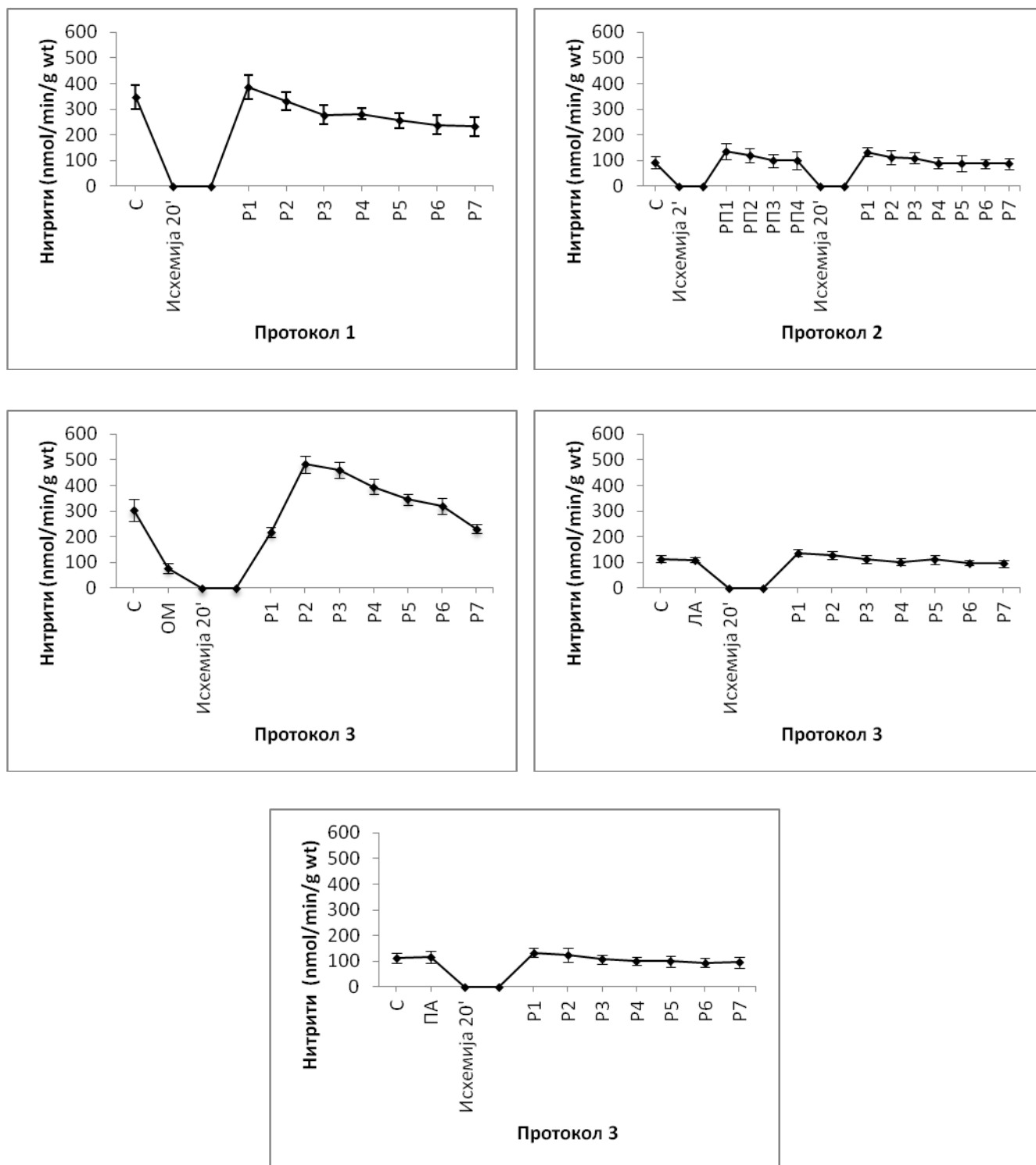
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 7 и Графику 7.

<i>Нитрити (NO_2^-)</i>					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омепразолем	Преконд. лансопразолем	Преконд. пантопразолем
C vs P1	P>0.05	<i>P<0.01**</i>	P>0.05	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.01**</i>
C vs P7	P>0.05	P>0.05	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.05*</i>
P1 vs P7	P>0.05	<i>P<0.01**</i>	<i>P<0.01**</i>	P>0.05	<i>P<0.01**</i>
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	-39,79	-33,69	-46,97	-29,86	-28,83
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	-33,18	-4,99	-34,16	-15,97	-14,79

Табела 7 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

Све експерименталне групе довеле су до пада вредности нитрита у периоду реперфузије. Сем у контролној ни у групи са лансопразолем није дошло до статистички значајних промена вредности између прве и последње тачке реперфузије. Једино су групе у којима је прекондиционарање вршено омепразолем и пантопразолем довеле до статистички значајне разлике између тачке стабилизације и посљедње тачке реперфузије.

График 7. Разлике у вредностима нитрита ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.2.2. Супероксид анјон радикал (O_2^-)

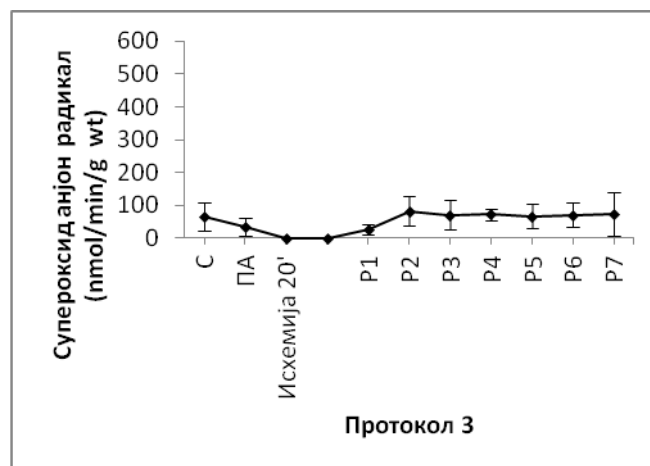
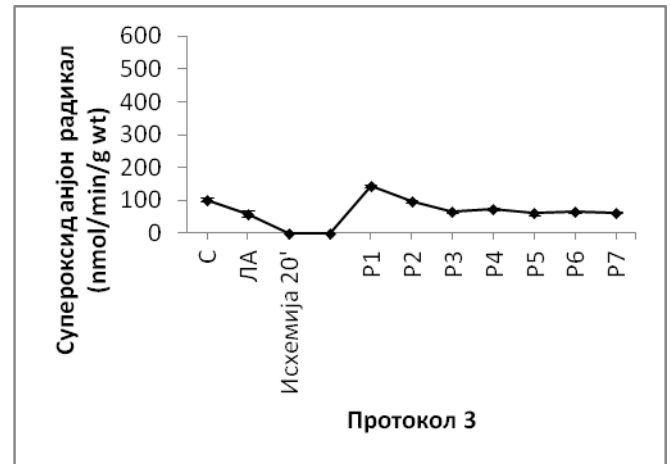
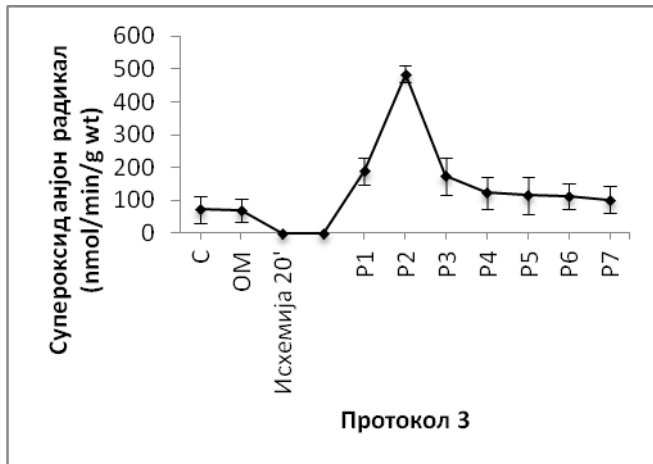
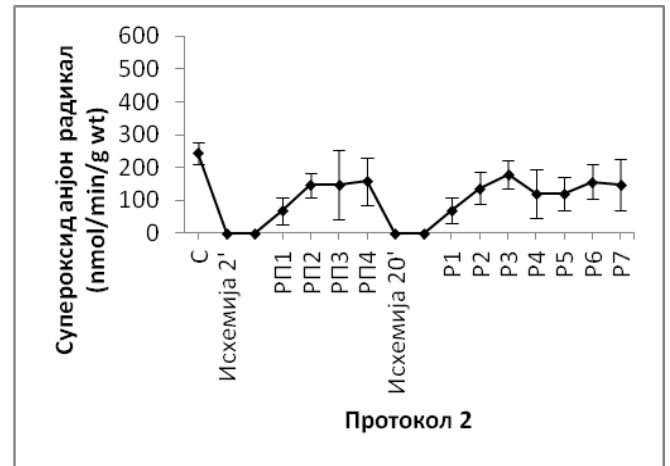
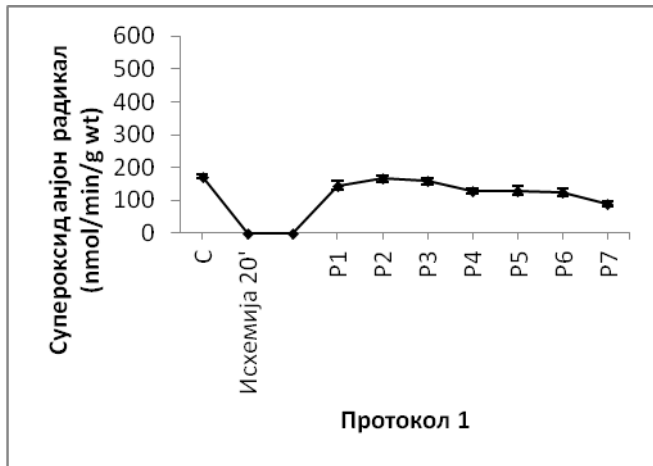
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 8 и Графику 8.

Супероксид анјон радикал (O_2^-)					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омепразолом	Преконд. лансопразолом	Преконд. пантопразолом
C vs P1	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
C vs P7	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
P1 vs P7	P>0.05	<i>P<0.05*</i>	P>0.05	<i>P<0.05*</i>	<i>P<0.05*</i>
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	-37,72	+107,28	- 37,73	-56,22	+181,83
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	-47,30	-39,46	-26,92	-38,57	-13,87

Табела 8 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

Групе у којима је извршено преконачионирање исхемијом и пантопразолом доводе до статистички значајног повећања вредности супероксид анјон радикала у периоду реперфузије, група са лансопразолом доводи до статистички значајног смањења вредности испитиваног параметра за исти период, док ни у једној испитиваној групи се последња тачка реперфузије статистички не разликује од тачке стабилизације.

График 8 Разлике у вредностима супероксид анјон радикала ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.2.3. Водоник пероксид (H_2O_2)

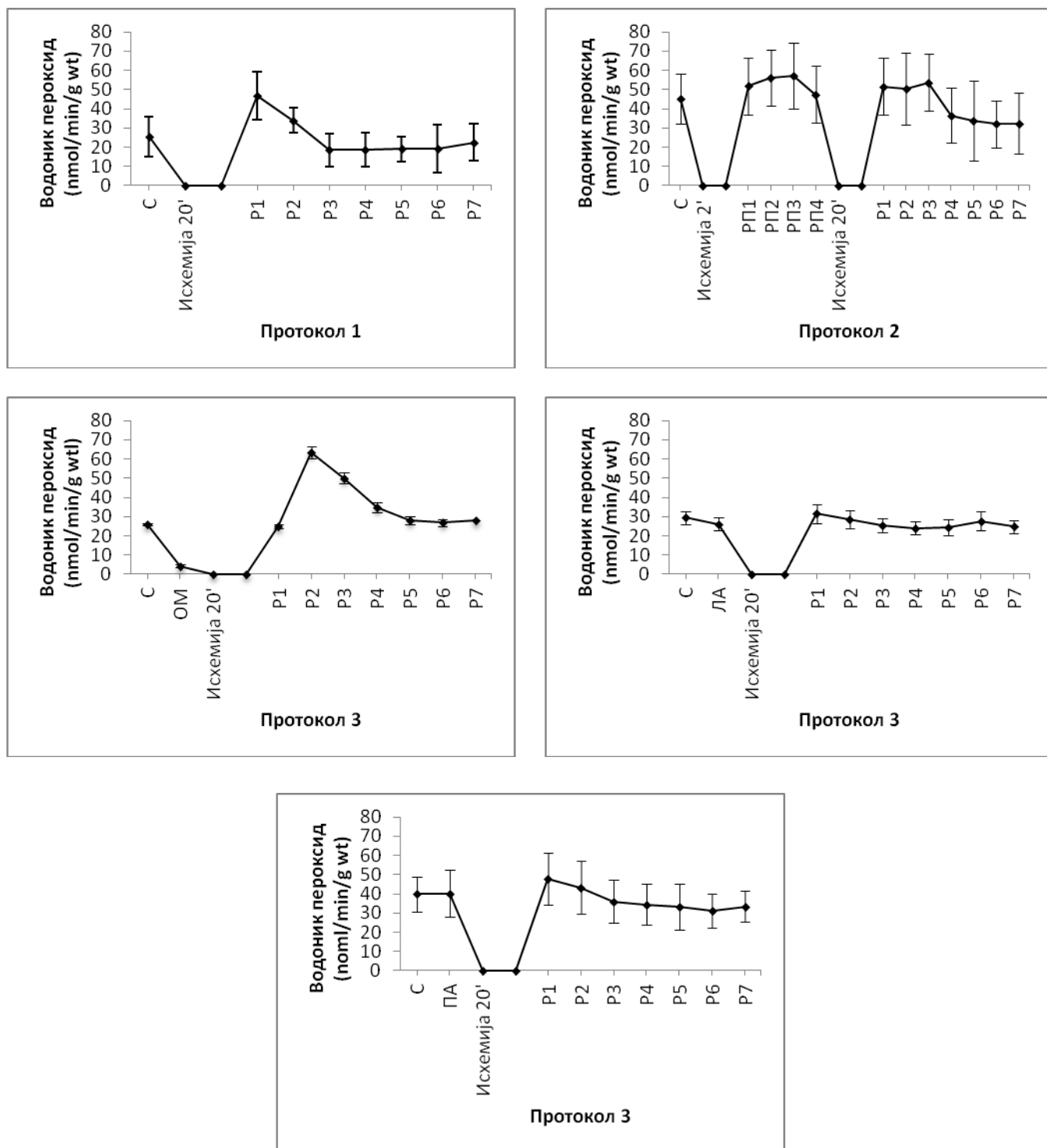
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 9 и Графику 9.

Водоник пероксид (H_2O_2)					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омепразолом	Преконд. лансопразолом	Преконд. пантопразолом
C vs P1	<i>P</i> <0.05*	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> <0.05*	<i>P</i> <0.05*
C vs P7	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> <0.01**	<i>P</i> <0.05*
P1 vs P7	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> <0.05*	<i>P</i> <0.01**	<i>P</i> <0.05*	<i>P</i> <0.01**
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	-51,65	-37,29	- 22,57	-21,27	-30,02
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	-11,40	-28,56	-26,85	-15,70	-16,10

Табела 9 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

Све испитиване групе довеле су до смањења вредности водоник пероксида у периоду реперфузије што се показало статистички значајно у групи са исхемијским преконачионирањем и у групама где су примењивани инхибитори протонске пумпе. Последње тачке реперфузије се статистички не разликују од тачке стабилизације у контролној и групама где је вршено преконачионирање исхемијом и омепразолом.

График 9 Разлике у вредностима водоник пероксида ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



4.2.4. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

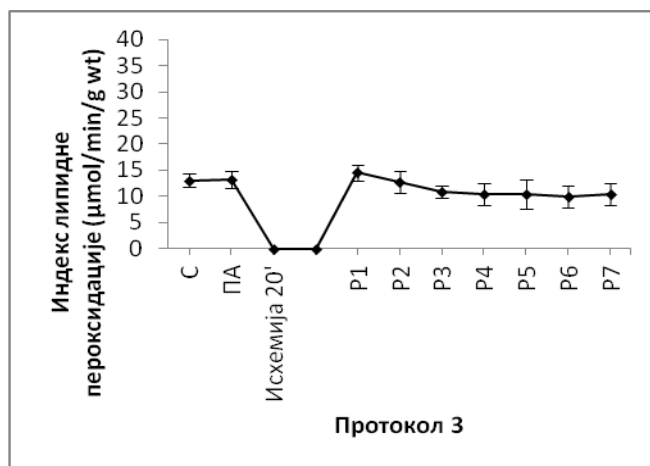
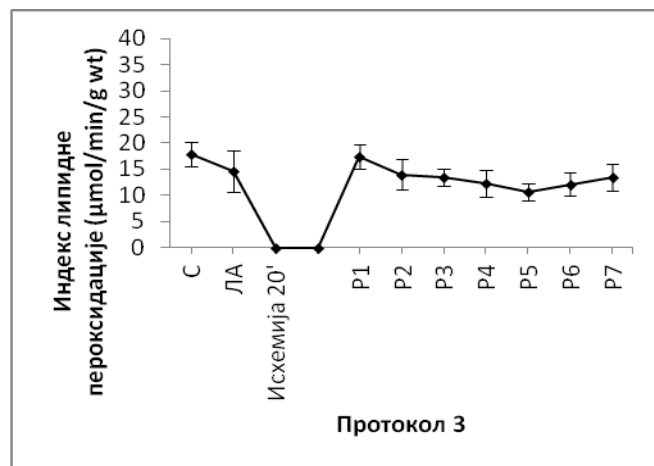
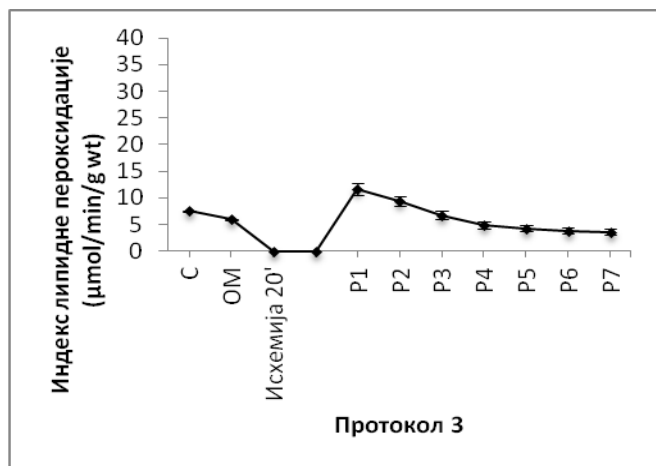
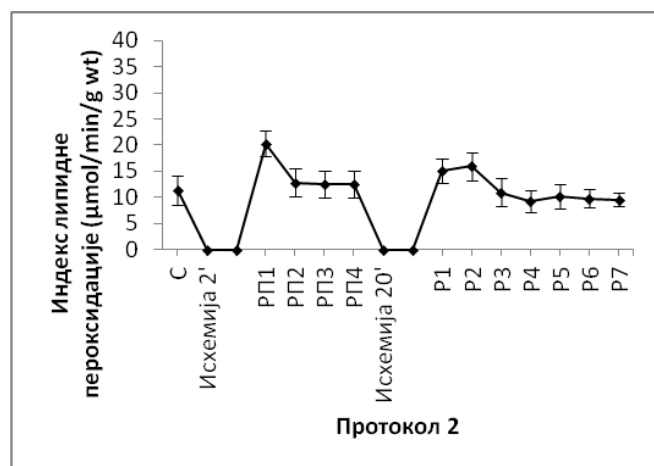
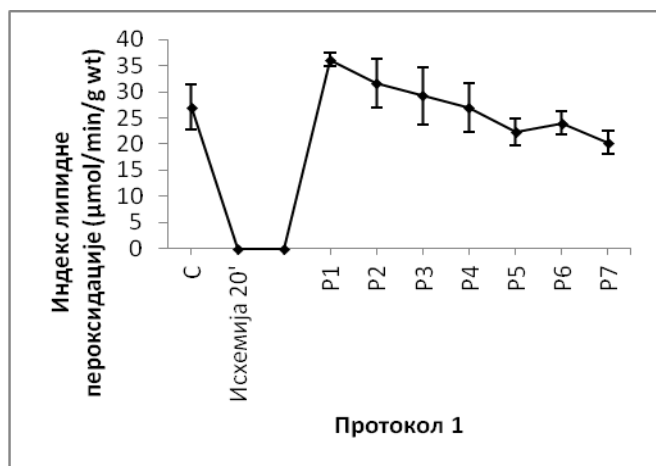
Статистичке значајности и резултати добијени у свима експерименталним групама приказани су у Табели 10. и Графику 10.

Индекс липидне пероксидације (TBARS)					
Тачке од интереса/Групе	Контрола	Преконд. исхемијом	Преконд. омегапразолом	Преконд. лансопразолом	Преконд. пантопразолом
C vs P1	<i>P</i> <0.05*	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
C vs P7	<i>P</i> <0.05*	P>0.05	<i>P</i> <0.05*	<i>P</i> <0.01**	P>0.05
P1 vs P7	<i>P</i> <0.01**	P>0.05	P>0.05	P>0.05	<i>P</i> <0.05*
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на P1 (%)	-43,92	-37,26	- 58,98	-23,28	-27,83
Пад (-) или пораст (+) вредности P7 у односу на C (%)	-25,16	-15,80	-55,66	-25,17	-19,81

Табела 10 Приказ статистички значајних разлика између тачки од интереса и промена у периоду реперфузије у свим посматраним групама за испитивани параметар

Контролна група и група у којој је примењен пантопразол доводе до статистички значајне разлике између прве и последње тачке реперфузије, све остале групе такође доводе до смањења вредности индекса липидне пероксидације које није праћено статистичком значајношћу. Осим у групи са лансопразолом, ниједна друга испитивана група није довела до статистички значајне разлике између последње тачке реперфузије и тачке стабилизације.

График 10 Разлике у вредностима индекса липидне пероксидације ($X \pm SD$) за све експерименталне групе



V
ДИСКУСИЈА

Сваке године акутни инфаркт миокарда однесе велики број живота и представља један од водећих узрочника морбидитета и морталитета у свету (174). Једна од последица акутног инфаркта миокарда је прелажење критичног прага у снабдевености срчаног мишића крвљу као и исцрпљивање механизма миокарда намењених за одржавање нормалне функције и хомеостазе.

Појам исхемијско/реперфузиона (И/Р) повреда миокарда први су почетком седамдесетих година прошлог века описали Jennings и сарадници. Постулати ове групе научника односили су се на чињеницу да брзо успостављање нормалног коронарног протока након инфаркта иако може да доведе до редукције величине инфаркта и боље прогнозе за пацијента такође може да доведе до озбиљних оштећења миокарда. У основи механизми настанка И/Р повреде су сложени, а данашње главне хипотезе укључују прекомерни инфлукс јона калцијума (Ca^{2+}), генерисање реактивних врста кисеоника (ROS), запаљење, и апоптозу (174).

Са циљем да се акутни инфаркт миокарда превенира и побољшају изгледи за преживљавање, кроз историју су увођене многе хирушке и медикаментозне интервенције а временом се дошло и до открића исхемијског прекондиционирања. Кроз последње три деценије овај модел постао је један од главних механизма којим се покушава са ублажавањем (И/Р) повреде (175-177).

Прекондиционирање укључује смањење масе некротичног ткива, побољшање контрактилних перформанси срца после исхемије и реперфузије, као и смањење аритмија. Иако исхемијско прекондиционирање није у потпуности разјашњено, како је и раније наведено, за разумевање механизма прекондиционирања исхемијом неопходно је пре свега знати да се значајан део оштећења ткива миокарда не дешава у самом периоду исхемије, већ у периоду реперфузије. Миокард може да издржи око 15 минута озбиљне па чак и апсолутне исхемије а да не дође до смрти ћелија. Међутим, кључну улогу има благовремена реперфузија, јер управо у овом периоду може доћи до нарушавања функције ткива као и до леталне реперфузије у којој долази до смрти миоцита и некрозе (81, 95).

Модел изолованог срца пацова је један од најпогоднијих експерименталних модела за претклиничка испитивања срца сисара, и такође веома поуздан за везу између животињских и студија на људима. Генерално посматрано, морфолошки срце пацова је веома слично са људском срцу (178). Наиме, структура леве коморе, дебљина зида и

својства папиларних мишића су готово иста као у људском срцу (178). Поред тога, испитивање нодалних ћелија показало је да су по структури веома слични људским Т-ћелијама, и да почињу са функционисањем током ембриогенезе (179). Осим тога, показао је да и вентрикуларни и атријални кардиомиоцити поседују висок проценат сличности у хистолошком смислу (180). Због свега наведеног можемо претпоставити да постоји значајна аналогија између (пато)физиолошких манифестација срца пацова и људског срца. У том смислу, подаци прикупљени од ових експерименталних студија могли би бити од великог интереса за побољшање знања о исхемијским а посебно фармаколошким облицима прекондиционарања.

Moffatand и Karmazyn су почетком деведесетих година прошлог века показали способност фармаколошке заштите од оштећења у периоду реперфузије након исхемије помоћу инхибитора Na^+/H^+ -АТФ-азне протонске пумпе, а у новије време ову улогу преузимају инхибитори H^+/K^+ -АТФ-азне пумпе што показују студије спроведене од стране Budzynski и сарадника као и од истраживачке групе Basaksiz и сарадника (139, 181, 182).

С обзиром на чињеницу да ткиво миокарда поседује H^+/K^+ -АТФ-азу (176), испитивали смо ефекте једне од највише коришћене групе лекова, инхибиторе H^+/K^+ -АТФ-азе на моделу изолованог срца пацова. Ово, тим пре, што се на основу новијих литературних података може закључити да инхибитори протонске пумпе могу бити посебно важни код болесника са срчаним обољењима, иако њихова безбедност није добро проучена.

Ова студија има за главни циљ да упореди потенцијалне заштитне ефекте исхемијског и фармаколошког прекондиционарања са инхибиторима протонске пумпе на изолованом срцу пацова која су била подвргнута смени исхемије и реперфузије.

За нашу студију тачке од интереса у току експеримената за све испитиване групе биле су вредности добијене у тренутку када смо успоставили стабилизацију параметра изолованог срца (С) као и два момента у периоду реперфузије, прва (Р1) и последња тачка реперфузије (Р7). Посебну пажњу смо обратили на последњу тачку реперфузије и вредности које смо добили за тај моменат јер смо поредили га са вредностима прве тачке реперфузије и вредностима у тачки стабилизације добили вредности које показују кроз испитиване параметре да ли се миокард опоравио од глобалне исхемије, као и у којој мери на опоравак утиче феномен прекондиционарања.

5.1. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПМЕ НА КАРДИДИНАСКЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Максимална стопа промене притиска је данас призната као најчешће коришћени индекс контрактилности комора. Са повећањем контрактилне силе која делује, већа је и стопа повећања притиска у левој комори (183, 184)

Резултати наше студије у погледу максималне стопе промене притиска у левој комори указују на то да омепазол са процентуалним падом вредности $P7$ у односу на C од око 3% даје најповољнији ефекат јер показује да су се вредности на крају реперфузионог периода готово вратиле на ниво са почетка експеримената, за њим следе остали лекови из групе инхибитора протонске пумпе. Нешто неповољнији ефекат на контрактилност миокарда остварује група у којој је вршено прекондиционирање исхемијом мада се без обзира на процентуални пад од нешто више од 10% вредности у тачки $P7$ у односу на C , ове две тачке нису статистички значајно разликовале, што говори у прилог опоравку овог параметра након двадесетоминутне исхемије. Контрола се показала најлошијом јер је у периоду реперфузије дошло до статистички значајног пада вредности $dp/dt \max$ (Табела 1., Гарфик 1.). Gomes и сарадници су у две одвојене студије показали да управо апликација омепазола и пантопазола пре индукције исхемије, а у односу на групе са прекондиционирањем исхемијом доводе до заштитних ефеката по функцију миокарда што корелира са нашим резултатима посебно везаним за максималну стопу промене притиска у левој комори (164, 165). Такође ова група научника је у ранијим годинама дала потенцијално објашњење у вези фармакокинетичке основе ове групе лекова којом они и остварују кардиопротективни ефекат. Механизам којим се остварује њихов кардиопротективни ефекат односи се на промене у трансмембранском H^+/K^+ градијенту, који је први показатељ срчане исхемије, одговоран за реполаризацију изражену у морфологији Т-таласа електрокардиограма (185).

Због различитог дизајна, оно што у одређеној мери корелира са нашим резултатима су резултати до којих су дошли Schillinger и сарадници. Њихово истраживање указује да пантопазол има негативно дејство на контрактилност миокарда али и да поред свог негативног инотропног ефекта овај лек не доводи до промене интрацелуларног рН. У овом

раду они спекулишу да се негативни инотропни ефекат пантопразола не одвија преко H^+/K^+ -АТР-азне пумпе већ да у великој мери у овом механизму учествује јон калцијума на тај начин што се под дејством пантопразола смањује преузимање Ca^{2+} у саркоплазматски ретикулум а редукује инфлукс јона калцијума што резултира смањеним садржајем калцијума у саркоплазматском ретикулуму и повећањем концентрације јона Ca^{2+} током дијастоле (186).

Максимална стопа промене притиска у левој комори је у директној спреси са минималном стопом промене притиска у левој комори. Повећање дијастолне функције и луситропни ефекат узрокује повећање негативности вредности $dp/dt \min$ током периода релаксације (187).

Gomes и сарадници показују да пантопразол и у погледу вредности $dp/dt \min$ остварује позитиван ефекат у погледу заштите од И/Р повреде уколико је примењен пре глобалне исхемије (164, 165), Наши резултати су у директној вези са резултатима овог истраживања где се на првом месту из целе групе инхибитора протонске пумпе издваја пантопразол јер је снизио вредност последње тачке реперфузије у односу на стабилизацију за свега 6,42% што није показало статистичку значајност. За пантопразолом следе омепразол са редукцијом минималне стопе притиска у левој комори од 10,51% и лансопразол са 11,93% што такође не доводи до статистички значајне разлике у вредностима последње тачке реперфузије и вредностима у тачки стабилизације. Нешто неповољнији ефекат показује група са прекондиционарањем исхемијом са обарањем вредности P7 у односу на C за готово 30% што је и статистички значајно док је најнеповољнија по контрактилност миокарда контролна група која доводи до статистички значајне разлике између P7 и C у смислу пада вредности за готово 48% (Табела 2., График 2.).

Резултати прва два параметра контрактилности сугеришу да је прекондиционарање фармаколошким агенсима, у нашем случају лековима из групе инхибитора протонске пумпе, показало боље резултате у смислу мање редукције вредности испитиваних параметара. Ово снижење вредности потенцијално доводи до бољег очувања контрактилности миокарда након исхемије с обзиром да су се у последњим моментима реперфузије вредности вратиле на веома сличан ниво с почетка експеримента.

Поред ефеката прекондиционарања исхемијом и инхибиторима протонске пуме на $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, резултати добијени за систолни притисак у левој комори су веома слични.

Са минималним падом вредности у периоду реперфузије у односу на почетак експеримента од 0,52%, омепразол је показао боље ефекте у односу на пре свега остале лекове из групе који су пак довели до благог пораста истих вредности, а сви заједно у смислу својих кардиопротективних деловања бар што се тиче SLVP имају повољније ефекте како од прекондиционарања исхемијом, тако и од контроле (Табела 3., График 3.). Прекондиционарање исхемијом довело је до високо статистички значајног пада вредности и разлике између вредности у тачки P7 и тачки C. Ако сада обратимо пажњу и на резултате добијене за дијастолни притисак у левој комори из табеле и графика (Табела 4., График 4.) може се видети да је контролна група довела до повећања скоро за 195% вредности овог параметра на крају реперфузије у односу на тачку стабилизације што је високо статистички значајно. Инхибитори протонске пумпе као што су пантопразол и лансопразол такође доводе до процентуално нешто виших вредност P7 у односу на C, али се вредности статистички гледано нису разликовале, потом следи омепразол а најповољнији утицај на DLVP имала је група у којој је дошло до прекондиционарања исхемијом. Што се тиче наших резултата, они су кохерентни са резултатима добијеним од стране Lee и сарадника који су показали да на вредности SLVP исхемијско прекондиционарање има бољи утицај од групе која је као и у нашем случају по протоколу представљала контролу (188). Такође, као и у раније описаним резултатима, наша сазнања у погледу систолног притиска у левој комори корелирају са резултатима Gomes и сарадника који наводе да омепразол и пантопразол имају позитиван ефекат на овај параметар (164, 165). Истраживање од стране Kim и сарадника који су испитивали ефекте новог инхибитора протонске пумпе IU-81149 на анималном моделу (мишеви, пацови, заморчићи и пси) показује да овај лек не доводи до било каквих статистички значајних промена систолног и дијастолног притиска у левој комори, такође нису уочили било какав фармаколошки ефекат на кардиоваскуларни систем бар што се тиче доза које је ова група научника применила (189).

Иако се већ деценијама различите групе истраживача баве механизмом којим исхемијско прекондиционарање делује на систолну функцију, још увек постоји много непознаница. Оно што стоји као могућа хипотеза и објашњење у радовима је улога кардиопротективних протеина који могу очувати сарколемалну мембрану и мембрану саркоплазматског ретикулума и на тај начин спречити нагомилавање јона калцијума у

ћелији што је главна детерминанта за очување функције дијастоле (190). Важност јона калцијума је велика пре свега јер услед масовног прилива калцијума све интрацелуларне залихе енергије бивају веома брзо осиромашене. Једном када се истроше залихе енергије а повећају концентрације калцијума у цитосолу формирају се контрактуре у миоцитима (191).

У студији спроведеној на хуманој популацији са повишеним крвним притиском, Joa-Vazquez и сарадници су уочили да пацијенти који су константно користили лекове из групе инхибитора протонске пумпе упоредо са својом кардиолошком терапијом имају мало али статистички значајно снижење крвног притиска у односу на оне који су ове лекове користили повремено. Ова група научника покушала је да објасни механизам оваквог резултата на два начина. Један је као што је и раније било речи, регулација интрацелуларног калцијума а други могући механизам ослања се на потенцијалне лек-лек интеракције. Интеракције ИПП са кардиоваскуларним лековима које пацијенти користе, због заједничког пута метаболизма преко цитохрома P450 и његових изоформи, могу у крајњем довести до редукције метаболизма кардиоваскуларних лекова и њихове повишене концентрације у плазми (192).

С друге стране, у случају срчане фреквенце, наше истраживање показује да инхибитори протонске пумпе снижавају вредности овог параметра у просеку за око 15% у периоду реперфузије у односу на почетак експеримента и те вредности последње тачке реперфузије се у свим групама са леком статистички значајно разликују од вредности из периода стабилизације. За разлику од њих у групи са исхемијским прекондиционирањем јавило се незнатно процентуално повећање вредности у тачки P7 срчане фреквенце за свега 0,10% у односу на C које није било статистички значајно и које је директни показатељ опоравка функције миокарда након исхемијске повреде. Контрола је пак показала статистички значајан пад вредности у истом поређењу за око 20% што је такође било статистички значајно (Табела 5., График 5.).

Наши резултати могу се повезати са сазнањима истраживачке групе Gautam и сарадника који су добили веома интересантне резултате на моделу жабе. У њиховом истраживању ИПП нису довели до статистички значајних промена срчане фреквенце при минималној примењеној дози али су зато након повећања дозе за два пута довели до брадикардије (193). Нешто слично закључили су и у раније већ поменутој студији Kim и

сарадника који су користили нов инхибитор протонске пумпе ІУ-81149 на анималном моделу (мишеви, пацови, заморчићи и пси) и показали да овај лек нема утицаја на срчани ритам (189).

Birnbaum и сарадници су применом прекондиционирања исхемијом на изолованом срцу зеца показали да овај феномен доводи до успоравања срчаног ритма у односу на контролу, што је у поређењу такве две групе из нашег истраживања такође био закључак (194).

Важност промене вредности срчаног ритма веома је велика, јер се још од средине двадесетог века зна да варијабилност овог параметра може бити узрок смрти (195).

Варијација и флукуација стопе рада срца у односу на средњу вредност пулса су се показали као главне функционалне јединице кардиореспираторне физиологије. Појачани вагусни тонус својим ефектом на електрофизиолошка својства коморе може да спречи појаву коморских аритмија које су опасне по живот пацијента што има још већи значај код прележаног инфаркта и пацијената са дијабетесом (196).

Због могућих вентрикуларних аритмија, варијабилност срчаног ритма у погледу повећања вредности овог параметра је веома опасно. Коморске аритмије настају управо у периоду реперфузије, заправо у моментима поновног успостављања коронарног протока после периода исхемије миокарда. Сматра се да на моделу пацова, у готово свим испитиваним случајевима долази до вентрикуларне тахикардије после 5-7 минутне оклузије миокарда док у око 80% случајева се без обзира на то да ли је оклузија трајала краће или дуже развија вентрикуларна фибрилација (197). Нагаг и сарадници су у свом истраживању показали да исхемијско прекондиционирање доводи до значајне редукције аритмија и до потпуног изостанка вентрикуларне тахикардије (197). Наши резултати сугеришу да прекондиционирање исхемијом није довело до статистички значајне разлике у вредностима срчане фреквенце између прве тачке реперфузије и прве тачке експеримента.

Што се тиче везе између срчаних аритмија и лекова из групе инхибитора протонске пумпе у доступној литератури се ова веза помиње пре свега због њиховог могућег нежељеног дејства ИПП. Хипомагнезијемја која може настати после дуготрајне примене ИПП може довести до леталних аритмија (198, 199). Наши резултати указују да омепразол, лансопразол и пантопразол доводе до редукције срчане фреквенце која је

статистички значајна различита у тачки P7 у односу на тачку C тако да су вредности на крају реперфузије биле ниже од базалних вредности са почетка експеримента.

Коронарни проток је у периоду реперфузије редукован у свим експерименталним групама у односу на почетак експеримента. Разлика између група може се уочити између група са примењеним лековима из групе ИПП, контроле и групе са прекондиционирањем исхемијом. ИПП су смањили коронарни проток за у просеку 14% где се са најслабијим инхибирајућим ефектом на испитивани параметар показао пантопразол. У групи са омепразолом и лансопразолом вредности добијене у тачки P7 статистички се значајно разликују од периода стабилизације, тако да се најбољи проток након исхемијске повреде и најприближнији базалним вредностима успоставио у групи са пантопразолом. У контролној групи коронарни проток се снизио за око 29% у тачки P7 у односу на C што је статистички значајна разлика, док је у група са прекондиционирањем исхемијом показала најблажи ефекат на коронарни проток са редукцијом у истом периоду за 9,32% чиме се без статистичке значајности ове две вредности показало да се коронарни проток успоставио на најбољи могући начин (Табела 6., График 6.).

Механизам којим исхемијско или прекондиционирање ИПП редукују коронарни проток још увек није у потпуности расветљен. Сматра се да редукцијом стопе коришћења високоенергетских фосфата и анаеробног пута гликолизе, прекондиционирање исхемијом смањује метаболизам миокарда након пролазне коронарне оклузије са минималним трајањем од 2 минута. Ово смањење метаболичке функције посредовано је аденозином који се накупља током периода оклузије и делујући на аденозинске А рецепторе активира АТР-зависне калијумске канале. Накупљање не само аденозина него и многих других супстанци током стреса од стране миокарда може активирати АТР-зависне калијумске канале. Активирани АТР-зависни канали за калијум релаксирају артериоле глатких мишића а самим тим доводе и до дилатације која је независна од ендотела (200, 201). Заштита миокарда која је карактеристична за прекондиционирање настаје услед смањења времена за које су волтаж-зависни калцијумски канали отворени чиме се заправо смањује ниво слободних јона калцијума у цитосолу а тиме и доводи до очувања АТР-а (200). Да аденозин има веома битну улогу у опоравку миокарда након исхемије говори и студија спроведена на људима од стране Sadigh и сарадника. У свом истраживању показали су да

прилоком примене ниских доза аденозина пре исхемије, исхемија неће утицати на промену коронарног протока (202).

Реперфузија након продужене исхемије на анималном моделу је повезана са недовољном перфузијом миокарда, што је вероватно последица оштећења коронарног ендотела од стране ROS. Оштећени ендотел може условити слабију вазодилатацију или довести до вазоконстрикције као одговор на активност тромбоцита; дозволити пријањање и улазак инфламаторних ћелија у зид крвног суда, стимулисати активацију тромбоцита као и стварање реактивних кисеоничних врста. Све ове штетне ефекте може да погорша исхемијска повреда миокарда као и да додатно ослаби систолну функцију миокарда, чиме се доводи у питање успех тромболитика или механичке реперфузије код људи (201). У том смислу, азот-моноксид можда бити користан у смањењу степена некрозе после 1h од исхемије након чега следи 4,5h реперфузије на моделу отвореног грудног коша код паса, са смањењем проласка неутрофила у коронарни ендотел (203).

У физиолошким условима концентрације азот-моноксида флукутирају у оквиру ниских вредности. Ови нивои су контролисани од стране конститутивних синтетаза азот-моноксида (NOS): неуралне (nNOS) и ендотелне (eNOS). Концентрација азот-моноксида брзо расте услед хиперактивности nNOS услед исхемије/реперфузије. У патолошким условима као што је инфламација привремено јако високи нивои азот-моноксида стварају се активацијом индуцибилне NOS (iNOS) (204). У периоду реперфузије појачано је стварање азот-моноксида, међутим како у овом периоду настају и супероксид анјон радикали, услед међусобног реаговања ових молекула долази до стварања токсичних пероксинитрита, чиме се смањује концентрација слободних нитрита (205), а самим тим и азот-моноксида који учествује у регулацији коронарног протока.

Пероксинитрит поред тога што је изузетно реактиван слободан радикал доприноси и смањењу биоактивности азот-моноксида синтетисаног од стране ендотелних ћелија који је важан дилататор крвних судова (206). Itoh и сарадници као закључак свог истраживања на спонтано хипертензивним пацовима склоних можданом удару, указују да повећање концентрације азот-моноксида које је било проузроковано третманом са ендогеним донором азот-моноксида или активацијом Ca^{2+} зависне NOS синтетазе током исхемије доводе од повећања нивоа цикличног гуанозинмонофосфата (cGMP). Ипак, претпоставља се да ни ендогени, а ни егзогени азот-моноксид није довољно биоактиван да стимулише

формирање cGMP и да одржи адекватне кардиопротективне ефекте који су NO-зависни. Супротно томе, повећана активност Ca^{2+} зависне NOS синтетазе може да допринесе већој продукцији реактивних кисеоничних врста које ће само појачати повреду миокарда након И/Р (207).

Највећи допринос у регулацији васкуларног тонуса има ендотел који константно и прецизно отпушта вазодилаторне (NO, простаглицин, итд.) као и вазоконстрикторне (тромбоксан, ендотелин, итд.) супстанце. Један од главних *in vivo* физиолошких стимулуса за локалну регулацију дијаметра артериола је присуство интралуминалног протока крви. Повећање интралуминалног протока крви изазива ендотел-зависну вазодилатацију којом долази до отпуштања вазодилаторних супстанци (208, 209).

Сматра се да је у многим болестима, па тако и у дијабетесу, кључни механизам за смањење коронарне дилатације може бити редукована синтеза и/или доступност ендотелног азот-моноксида (208).

Међутим, Miura и сарадници су на моделу хуманих коронарних крвних судова који исхрађују преткоморе уочили да је повећање протока повезано са порастом нивоа водоник пероксида (210).

Све ове чињенице говоре у прилог томе да сам коронарни проток као и дилатација која је њиме индукована може бити регулисана различитим механизмима у различитим регионима миокарда.

5.2. ЕФЕКТИ ПРЕКОНДИЦИОНИРАЊА ИСХЕМИЈОМ И ИНХИБИТОРИМА ПРОТОНСКЕ ПУМПЕ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

Одређивањем нивоа прооксидантних молекула (азот-моноксида у форми нитрита, супероксид анјон радикала и водоник пероксида) и маркера оксидационих оштећења (интекса липидне пероксидације) у коронарном венском ефлуенту, желели смо да утврдимо да ли прекондиционарање исхемијом и примењени лекови из групе ИПП као прекондиционарајући агенси имају позитиван или негативан ефекат на продукцију слободних радикала у периоду реперфузије. На тај начин смо у могућности да испитамо

да ли добијени кардиодинамски ефекти могу да буду посредовани оксидационим оштећењем или је у питању неки други механизам.

Реперфузиона повреда миокарда је суштинска последица поновног успостављања протока након исхемије. Иако тачни механизми којима се миокард може заштити од настанка ове повреде или којима се она може ублажити још увек нису довољно истражени, интересовање за овим проблемом не јењава.

Много времена је прошло од када је установљено да успостављање протока крви након исхемије изазива вентрикуларне аритмије, контрактилну дисфункцију, срчани застој и на крају срчану смрт, данас је повећан прилив информација о узрочно-последичној вези између И/Р повреде и оксидационог стреса (211).

Наши резултати показују да су лекови из групе инхибитора протонске пумпе статистички значајно редуковали концентрацију азот-моноксида у поређењу последње тачке реперфузије и тачке стабилизације, с тим да је у највећој мери пад нитрита условно омепразол. Са лековима из групе ИПП по дејству на ослобађање нитрита парира и контролна група у којој је дошло до пада вредности овог испитиваног параметра за 33,18%. Најмању редукацију вредности ослобођених нитрита показала је група у којој је миокард био прекондициониран исхемијом (Табела 7., График 7.).

Значај азот-моноксида у И/Р повреди миокарда је пре свега велики због његове реакције са супероксид анјон радикалом услед чега долази до стварања раније поменутих пероксинитрита у реакцији контролисане дифузије (206, 211, 212). Пероксинитрити (ONOO^-) могу да изазову оксидацију протеина као и липидну пероксидацију (211). Наши резултати могли би се тумачити у светлу ове чињенице јер су све групе редуковале ослобађање супероксид анјон радикала који је могуће управо утрошен на стварање пероксинитрита у реакцији са азот-моноксидом чије су вредности такође у паду.

Могућа повезаност динамике азот-моноксида са вредностима коронарног протока је објашњена у претходном одељку дискусије.

Прегледни рад који су још крајем двадесетог века објавили Nonami и сарадници, указује да на основу критичког осврта на до тада објављене радове, не може се са сигурношћу тврдити да су ни доноси ни прекурсори азот-моноксида, као ни инхибитори азот-моноксид синтетазе довољни да би се спречила И/Р повреда. Као закључак наводе да

азот-моноксид може имати различите ефекте у погледу заштите миокарда а све у зависности од времена његове примене (213).

Азот-моноксид може да учествује у стварању S-нитрозо деривата од неких остатака цистеина и тако да има функцију у његовој модулацији. Слично томе, пероксинитрити, оксидационом модификацијом могу да инхибирају активност саркоендоплазматске Ca^{2+} пумпе, реметећи на тај начин транзицију овог јона (211).

Иако је супероксид анјон радикал високо реактиван молекул, он се у физиолошким условима готово одмах након стварања преводи у водоник пероксид помоћу митохондријалне (Mn-SOD) и цитосолне (Cu/Zn-SOD) супероксид дисмутазе. Даље се водоник пероксид под дејством ензима каталазе преводи у кисеоник и воду. Ипак под одређеним околностима, супероксид анјон радикал може да избегне овај каскадни пут, што као последицу има продукцију ROS које доводе до оксидационих оштећења (191, 211, 214). Међутим, у случају миокарда коме је успостављен проток након исхемије, због ацидозе, ослобађају се феро и фери јони из металопротеина што наводи каталазу на стварање високо реактивних хидроксил радикала од супероксид анјон радикала и водоник пероксида. У условима исхемије, ензими као што је ксантин оксидаза такође редукује концентрацију водоник пероксида до хидроксил радикала док се у периоду реперфузије стварају високо реактивни и токсични пероксинитрити од азот-моноксида и супероксид анјон радикала (211, 215).

Наши резултати који се могу видети из табеле и графика (Табела 8., График 8.), указују на смањено ослобађање супероксид анјон радикала, што није статистички значајно ни у једној испитиваној групи када упоредимо последњу тачку реперфузије и вредност у тачки стабилизације. Смањење вредности супероксид анјон радикала од стране активног метаболита омепразола показао је Wandall још почетком деведесетих година прошлог века на моделу изолованих полиморфонуклеара (216). У студији спроведеној на изолованом срцу зеца, Омаг и сарадници дошли су до закључка да исхемијско прекондиционирање није посредовано супероксид анјон радикалом (217).

Истраживања која су спровеле различите лабораторије указују да генерисање реактивних врста кисеоника има кључну улогу како у оксидационом оштећењу након исхемије тако и у заштити миокарда. Овај парадокс се можда може објаснити специфичним регулаторним потенцијалима ROS-а (211).

Иако се данас истраживања баве могућом улогом супероксид анјон радикала и азот-моноксида као прекондиционарајућих агенаса, резултати тих студија су врло опречни (218-220). Ипак на који начин ROS/RON могу да преведу „смртоносни“ сигнал у сигнал за „преживљавање“ остаје непознаница.

Када је реч о водоник пероксиду, учавамо да након апликације лекова из групе ИПП као прекондиционарајућих агенаса није дошло до повећања вредности испитиваног параметра већ до процентуалног пада вредности ако посматрамо тачку P7 у односу на C. Вредности водоник пероксида из коронарног венског ефлуента имале су исти тренд и у контролној али и у групи где је извршено прекондиционарање исхемијом (Табела 9., График 9.).

Иако водоник пероксид не спада у групу слободних радикала, у присуству транзиционих метала по Fenton-овој реакцији преводи се у веома активни хидроксил радикал (OH^\bullet) (211). Добро је познато да су ови високо реактивни радикали способни да униште све врсте биомолекула (221). Као посредник у настанку OH^\bullet јавља се у реакцији супероксид анјон радикал и то у два механизма. Један представља настајање хидроксил радикала катализовано гвожђем а други је генерисање OH^\bullet посредовано пероксинитритима (212).

Пантопразол прикупљајући хидроксил радикале у студији спроведеној на анималном моделу пацова показује своје антиоксидационе и цитопротективне ефекте (221, 222). Исте способности показао је и лансопразол (223). Што се тиче прекондиционарања исхемијом, Gozal и сарадници су на моделу срца паса показали да овај вид спречавања повреде миокарда доводи до редукције концентрације хидроксил радикала и тиме закључили да прекондиционарање исхемијом не доводи до оксидационих оштећења (224).

Иако у нашој студији нема доказа да прекондиционарање исхемијом као ни инхибиторима протонске пумпе смањује вредности хидроксил радикала, услед укупног смањења свих параметара оксидационог оштећења можемо навестити евентуалну могућност сценарија као у претходно описаним студијама.

Процес пероксидације липида може тећи неензимским путем и бити посредован реактивним врстама кисеоника што резултира настанком малонилдиалдехида (MDA). Излагање високим концентрацијама продуката липидне пероксидације може изазвати низ

ћелијских одговора, од оних акутних токсичних до инхибиције ћелијске пролиферације (62, 39).

Наши резултати показују да је у свим испитиваним групама дошло до смањења вредности супероксид анјон радикала као и водоник пероксида. Како O_2^- доводи до липидне пероксидације мембрана ендотелних ћелија, смањење нивоа вредности ових про-оксиданата је у корелацији са нижим вредностима липидне пероксидације (TBARS) (212). Смањење вредности TBARS можемо пратити кроз све експерименталне групе, где се јасно види процентуални пад вредности у тачки P7 у односу на тачку C. Разлика вредности на крају реперфузије и базалних вредности с почетка експеримента статистички се нису разликовале у групи где је извршено прекондиционирање исхемијом и пантопрозолем што може бити знак да је у тим групама након већег процентуалног пада у периоду реперфузије на крају реперфузионог периода ипак успостављена липидна пероксидација која је се не разликује од оне са почетка експеримента. (Табела 10., График 10.).

У групи где је примењен омепразол може се видети да је дошло до пада вредности у реперфузионом периоду у односу на стабилизацију за чак 55,56%, а како је дошло и до готово највећег смањења у истој групи и концентрације водоник пероксида, може се претпоставити да је липидна пероксидација најмања због најмање продукције хидроксил радикала.

Hayashi и сарадници на моделу изоловане јетре пацова показали су да омепразол смањује вредности липидне пероксидације (225) док је на индометацином индикованом гастритису код пацова показано да примена омепразола такође доводи до спречавања повећања вредности TBARS-а (226).

Оксидациона оштећења срчаног мишића као ни поремећаји на нивоу коронарне циркулације под дејством инхибитора протонске пумпе као прекондиционарајућих агенаса нису до сада много изучавани. На основу резултата ове студије може се закључити да постоји мала вероватноћа да прекондиционирање исхемијом и прекондиционирање ИПП индуюју оксидациона оштећења. Механизам којим настаје реперфузиона повреда након исхемије вероватно се не одвија продукцијом реактивних врста кисеоника. Колику улогу у смањењу липидне пероксидације као маркера оштећења ћелијске мембране имају лекови из групе инхибитора протонске пумпе и сам механизам њиховог деловања као прекондиционарајућих агенаса остаје предмет неких будућих истраживања. Што се тиче

прекондиционарања исхемијом, претпоставка је да своја кардиопротективна дејства остварује смањеним генерисањем реактивних кисеоничних врста. Због доброг одговора миокарда након исхемије којој је претходила краткотрајна оклузија у смислу опоравка готово свих кардиодинамских параметара, прекондиционарање исхемијом може се узети у обзир као први „прозор“ заштите миокарда. С друге стране ИПП такође доводе до опоравка миокарда посматрано кроз параметре кардиодинамике где се посебно истичу омепразол и пантопризол али са једним трендом наглог скока вредности у периоду реперфузије које се касније не разликује пуно од периода стабилизације што наравно говори у прилог овој групи лекова јер се миокард након дуготрајне исхемије опоравио.

Због веома тешке и контроверзне примене прекондиционарања исхемијом у клиничкој пракси, резултати овог истраживања сугеришу да у будућности и лекови из групе ИПП могу имати свој допринос у превенцији оштећења миокарда након исхемије, посебно јер је и данас ова група лекова једна од најпрописиванијих.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6.1. ЗАКЉУЧЦИ

На основу свега што је до сада изнето на карају можемо извести неколико закључака:

1. Сумарно посматрано, исхемијско прекондиционирање је најпозитивнији ефекат остварило у очувању перфузије миокарда и срчане фреквенце, док је прекондиционирање фармаколошким агенсима (лековима из групе инхибитора протонске пумпе) показало боље резултате у очувању оба параметра контрактилности. На тај начин, прекондиционирање исхемијом се може узети у обзир као први „прозор“ заштите миокарда, а прекондиционирање ИПП се може посматрати као адјувантни тип заштите миокарда пре свега у смислу очувања ударног волумена те ејекционе фракције.
2. У том смислу, обе врсте прекондиционирања су показале позитиван ефекат на функционални опоравак миокарда, с тим што је тај утицај у случају фармаколошког прекондиционирања био доминантан на очување контрактилне силе, док је у случају исхемијског прекондиционирања ефекат био фокусиран на очување коронарне реактивности срца.
3. Приликом међусобног поређења остварених ефеката испитиваних ИПП, можемо закључити да се најзначајнији позитивни ефекат на опоравак миокарда среће у случају омепразола и пантопразола.
4. С обзиром да испитујући биохемијске маркере оксидационог оштећења нисмо уочили да је дошло до појачане продукције вредности било ког параметра, можемо хипотезирати да евентуални настанак реперфузионе повреде након прекондиционирања исхемијом и ИПП није посредован овим механизмом.
5. У односу на контролну групу и прекондиционирање исхемијом и лековима из групе ИПП показало је боље ефекте на функционални опоравак миокарда.

VII

ЛИТЕРАТУРА

7.1. ЛИТЕРАТУРА

1. Solaro RJ. Regulation of Cardiac Contractility. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
2. Mujović VM. Kardiovaskularni sistem i homeostaza. U: Kardiologija: udžbenik za posleddiplomsku nastavu. Beograd, Medicinski fakultet; 1994. str. 14-26.
3. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology (10th ed.). 2003, Savremena administracija, Beograd.
4. Von Ludinghausen M. The clinical anatomy of coronary arteries. Adv. Ant Embryol Cell Biol 2003, 167:III-VIII, 1-111.
5. Barrett EK., Barmen MS., Boitano S., Brooks LH. Ganong's review of medical physiology 24th edition. 2012. pg. 555-585.
6. Chow DC, Forte JG. Functional significance of the β -subunit for heterodimeric P-type ATPases. J Exp Biol 1995; 198:1–17.
7. Sze H, Ward JM, Lai S, Perera I I. VACUOLAR-TYPE H⁺-TRANSLOCATING ATPases IN PLANT ENDOMEMBRANES: SUBUNIT ORGANIZATION AND MULTIGENE FAMILIES. J Exp Biol.1992; 172:123-135.
8. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. Annu Rev Biochem. 1986; 55:663-700.
9. Nelson N. Structure, Function, and Evolution of Proton-ATPases. Plant Physiol. 1988; 86:1-3.
10. Nelson N. Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H⁺-ATPases. J Bioenerg Biomembr. 1989; 21:553-71.
11. Forgac M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. Physiol Rev. 1989; 69:765-96.
12. Stone DK, Crider BP, Südhof TC, Xie XS. Vacuolar proton pumps. J Bioenerg Biomembr. 1989; 21:605-20.
13. Gluck S. V-ATPases of the plasma membrane. J Exp Biol. 1992; 172:29-37.

14. Harvey WR. Physiology of V-ATPases. *J Exp Biol.* 1992; 172:1-17.
15. Inesi G, Pilankatta R, Tadini-Buoninsegni F. Biochemical characterization of P-type copper ATPases. *Biochem J.* 2014; 463:167-76.
16. Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol.* 1998; 46:84-101.
17. Pestov NB, Romanova LG, Korneenko TV, Egorov MV, Kostina MB, Sverdlov VE, Askari A, Shakhparonov MI, Modyanov NN. Ouabain-sensitive H,K-ATPase: tissue-specific expression of the mammalian genes encoding the catalytic alpha subunit. *FEBS Lett.* 1998; 440:320-4.
18. Grishin AV, Sverdlov VE, Kostina MB, Modyanov NN. Cloning and characterization of the entire cDNA encoded by ATP1AL1--a member of the human Na,K/H,K-ATPase gene family. *FEBS Lett.* 1994; 349:144-50.
19. Sverdlov VE, Kostina MB, Modyanov NN. Genomic organization of the human ATP1AL1 gene encoding a ouabain-sensitive H,K-ATPase. *Genomics.* 1996; 32:317-27.
20. Crambert G, Béguin P, Pestov NB, Modyanov NN, Geering K. Betam, a structural member of the X,K-ATPase beta subunit family, resides in the ER and does not associate with any known X,K-ATPase alpha subunit. *Biochemistry.* 2002; 41:6723-33.
21. Shin JM, Munson K, Sachs G. Gastric H⁺,K⁺-ATPase. *Compr Physiol.* 2011; 1:2141-53.
22. Modyanov NN, Mathews PM, Grishin AV, Béguin P, Beggah AT, Rossier BC, Horisberger JD, Geering K. Human ATP1AL1 gene encodes a ouabain-sensitive H-K-ATPase. *Am J Physiol.* 1995; 269:C992-7.
23. Crowson MS, Shull GE. Isolation and characterization of a cDNA encoding the putative distal colon H⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. Similarity of deduced amino acid sequence to gastric H⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and mRNA expression in distal colon, kidney, and uterus. *J Biol Chem.* 1992; 267:13740-8.
24. Fejes-Tóth G, Náray-Fejes-Tóth A. Effect of acid/base balance on H-ATPase 31kD subunit mRNA levels in collecting duct cells. *Kidney Int.* 1995; 48:1420-6.

25. Shyjan AW, Ceña V, Klein DC, Levenson R. Differential expression and enzymatic properties of the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase alpha 3 isoenzyme in rat pineal glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87:1178-82.
26. Jaisser F, Beggah AT. The nongastric H⁺-K⁺-ATPases: molecular and functional properties. *Am J Physiol*. 1999; 276:F812-24.
27. DuBose TD Jr, Gitomer J, Codina J. H⁺,K⁺-ATPase. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1999; 8:597-602.
28. Munson K, Law RJ, Sachs G. Analysis of the gastric H,K ATPase for ion pathways and inhibitor binding sites. *Biochemistry*. 2007; 46:5398-417.
29. Shao J, Gumz ML, Cain BD, Xia SL, Shull GE, van Driel IR, Wingo CS. Pharmacological profiles of the murine gastric and colonic H,K-ATPases. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800:906-11.
30. Forte JG, Hanzel DK, Urushidani T, Wolosin JM. Pumps and pathways for gastric HCl secretion. *Ann N Y Acad Sci*. 1989; 574:145-58.
31. Sachs G, Shin JM, Vagin O, Lambrecht N, Yakubov I, Munson K. The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future. *J Clin Gastroenterol*. 2007; 41:S226-42.
32. Feldman M. Suppression of acid secretion in peptic ulcer disease. *J Clin Gastroenterol*. 1995; 20:S1-6.
33. Huang JQ, Hunt RH. Pharmacological and pharmacodynamic essentials of H₂-receptor antagonists and proton pump inhibitors for the practising physician. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001; 15:355-70.
34. Bateman DN. Proton-pump inhibitors: three of a kind? *Lancet*. 1997; 349:1637-8.
35. Shin JM, Kim N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. *J Neurogastroenterol Motil*. 2013; 19:25-35.
36. Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K. *Farmakologija*. 2005. Poglavlje 3 str. 367-371. Data Status, Beograd, Srbija.
37. Kone BC. Renal H,K-ATPase: structure, function and regulation. *Miner Electrolyte Metab*. 1996; 22:349-65.

38. Crambert G. H-K-ATPase type 2: relevance for renal physiology and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014; 306:F693-700.
39. Doucet A. H⁺, K⁽⁺⁾-ATPASE in the kidney: localization and function in the nephron. *Exp Nephrol*. 1997; 5:271-6.
40. Zies DL, Wingo CS, Cain BD. Molecular regulation of the HKalpha2 subunit of the H⁺,K⁽⁺⁾-ATPases. *J Nephrol*. 2002; 5:S54-60.
41. Zies DL, Gumz ML, Wingo CS, Cain BD. The renal H⁺, K⁺-ATPases as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*. 2007; 11:881-90.
42. Kraut AJ, Helander GK, Helander FH, Iroezi DN, Marcus AE, Sachs G. Detection and localization of H⁺-K⁺-ATPase isoforms in human kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2001; 281: 763-8.
43. Brierley GP, Jung DW. Kinetic properties of the K⁺/H⁺ antiport of heart mitochondria. *Biochemistry*. 1990; 29:408-15.
44. McCabe RD, Young DB. Evidence of a K⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾-ATPase in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1992; 262:1955-8.
45. Marrelli SP, Zhao X, Allen JC. Molecular evidence for a vascular smooth muscle H⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol*. 1997; 272:869-74.
46. Nagashima R, Tsuda Y, Maruyama T, Kanaya S, Fujino T, Niho Y. Possible evidence for transmembrane K⁽⁺⁾-H⁺ exchange system in guinea pig myocardium. *Jpn Heart J*. 1999; 40:351-64.
47. Beisvag V, Falck G, Loennechen JP, et al. Identification and regulation of the gastric H⁺/K⁺-ATPase in the rat heart. *Acta Physiol Scand*. 2003; 179:251-62.
48. Yenisehirli A, Onur R. Positive inotropic and negative chronotropic effects of proton pump inhibitors in isolated rat atrium. *Eur J Pharmacol*. 2005; 519:259-66.
49. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:936486.
50. Antoniadou C, Antonopoulos AS, Bendall JK, Channon KM. Targeting redox signaling in the vascular wall: from basic science to clinical practice. *Curr Pharm Des*. 2009; 15:329-42.

51. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15:247-54.
52. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999; 31:261-72.
53. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30:11-26.
54. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44-84.
55. Djordjević VB, Zvezdanović L, Cosić V. Oxidative stress in human diseases. *Srp Arh Celok Lek.* 2008; 2:158-65.
56. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 1985; 8:89-193.
57. Petkau A. Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutases. *Cancer Treatment.* 1985; 13:17-44.
58. Chen AF, Chen DD, Daiber A, et al. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond).* 2012; 123:73-91.
59. Kvam E, Tyrrell RM. Artificial background and induced levels of oxidative base damage in DNA from human cells. *Carcinogenesis.* 1997; 18:2281-3.
60. Santos NA, Bezerra CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008; 61:145-55.
61. Novo E, Marra F, Zamara E, et al. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut.* 2006; 55:90-7.
62. Jacob C, Winyard PG. Redox signaling and regulation in biology and medicine. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2009; p. 13-40.

63. Cheng FC, Jen JF, Tsai TH. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002; 781:481-96.
64. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991 Apr 9;281(1-2):9-19.
65. Pizato N, Bonatto S, Yamazaki RK, Aikawa J, et al., Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumour growth and cachexia in Walker 256 tumour-bearing rats. *Nutrition and cancer.* 53:194-201, 2005.
66. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 1998; 19:221-357.
67. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:9265-9.
68. Hu C, Noll BC, Schulz CE, Scheidt WR. Four-coordinate iron(II) porphyrinates: electronic configuration change by intermolecular interaction. *Inorg Chem.* 2007; 46:619-21.
69. Barrett EK., Barmen MS., Boitano S., Brooks LH. Ganong's review of medical physiology 24th edition. 2012. pg. 539-552.
70. Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. 2000. Karakteristike slobodnih radikala. In: Biohemija slobodnih radikala (Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM, ec). Tehnofarm d.o.o., Beograd, pp.7-69.
71. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010; 15:186-90.
72. Cadenas E, Simic MG, Sies H. Antioxidant activity of 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindole, and DOPA against microsomal lipid peroxidation and its dependence on vitamin E. *Free Radic Res Commun.* 1989; 6:11-7.
73. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem.* 1989; 58:79-110.
74. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.

75. Ognjanović BI, Marković SD, Pavlović SZ, Zikić RV, Stajn AS, Saicić ZS. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiol Res.* 2008; 57:403-11.
76. van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003; 13:57-149.
77. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3rd Ed, Oxford University Press, Oxford 2007.
78. Halliwell B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem Sci.* 1999; 24:255-9.
79. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res.* 1999; 443:37-52.
80. Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Progress in cardiovascular diseases.* 1998; 40: 517-47.
81. Vinod NK, Rupinder SM, Murugesan C. Myocardial ischaemic pre-conditioning. *Indian Journal of Anaesthesia.* 2004; 48: 93.
82. Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesthesiol Clin.* 1964; 2:251-69.
83. Li GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation.* 1990; 82:609-19.
84. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003; 83:1113-51.
85. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2001; 52:181-98.
86. Dahl NA, Balfour WM. Prolonged anoxic survival due to anoxia pre-exposure: brain atp, lactate, and pyruvate. *Am J Physiol.* 1964; 207:452-6.
87. Azad P, Haddad GG. Genetic animal models of preconditioning. *Transl Stroke Res.* 2013; 4:51-5.

88. Ara J, Fekete S, Frank M, Golden JA, Pleasure D, Valencia I. Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia-ischemia in newborn piglet brain. *Neurobiol Dis.* 2011; 43:473-85.
89. Cantagrel S, Krier C, Ducrocq S, et al. Hypoxic preconditioning reduces apoptosis in a rat model of immature brain hypoxia-ischaemia. *Neurosci Lett.* 2003; 347:106-10.
90. Altuğ S, Demiryürek AT, Kane KA, Kanzik İ. Evidence for the involvement of peroxynitrite in ischaemic preconditioning in rat isolated hearts. *British journal of pharmacology.* 2000; 130: 125-31.
91. Shpargel KB, Jalabi W, Jin Y, Dadabayev A, Penn MS, Trapp BD. Preconditioning paradigms and pathways in the brain. *Cleve Clin J Med.* 2008; 75:77-82.
92. Ramasamy R, Liu H, Anderson S, Lundmark J, Schaefer S. Ischemic preconditioning stimulates sodium and proton transport in isolated rat hearts. *J Clin Invest.* 1995; 96:1464-72.
93. Parratt JR, Vegh A. Endothelial cells, nitric oxide and ischaemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 1996; 91:27-30.
94. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74:1124-36.
95. Verma S, Maitland A, Weisel RD, et al. Hyperglycemia exaggerates ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte injury: reversal with endothelin antagonism. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002; 123:1120-4.
96. Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27:1023-34.
97. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whitaker P. Regional ischemic preconditioning protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation.* 1993; 893-899.
98. Tyagi P, Tayal G. Ischemic preconditioning of myocardium. *Acta Pharmacol Sin.* 2002; 23:865-70.
99. Boutros A, Wang J. Ischemic preconditioning, adenosine and bethanechol protect spontaneously hypertensive isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275:1148-56.

100. Donato M, Buchholz B, Rodríguez M, Pérez V, Inserte J, García-Dorado D, Gelpi RJ. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol*. 2013 Feb;98(2):425-34.
101. Tosaki A, Behjet NS, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. Alpha-1 adrenergic receptor agonist-induced preconditioning in isolated working rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995; 273:689-94.
102. Buchholz B, D'Annunzio V, Giani JF, et al. Ischemic postconditioning reduces infarct size through the α 1-adrenergic receptor pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014; 63:504-11.
103. Buchholz B, Donato M, D'Annunzio V, Gelpi RJ. Ischemic postconditioning: mechanisms, comorbidities, and clinical application. *Mol Cell Biochem*. 2014; 392:1-12.
104. Gross GJ, Auchampach JA. Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*. 1992; 26:1011-6.
105. Linz W, Wiemer G, Schaper J, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis. *Mol Cell Biochem*. 1995; 147:89-97.
106. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*. 1995; 47:25-49.
107. Xin W, Yang X, Rich TC, et al. All preconditioning-related G protein-coupled receptors can be demonstrated in the rabbit cardiomyocyte. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2012; 17:190-8.
108. Kitakaze M, Node K, Minamino T, et al. Role of activation of protein kinase C in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through activation of ecto-5'-nucleotidase. *Circulation*. 1996; 93:781-91.
109. Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res*. 1995; 76:73-81.
110. Zhou X, Zhai X, Ashraf M. Preconditioning of bovine endothelial cells. The protective effect is mediated by an adenosine A2 receptor through a protein kinase C signaling pathway. *Circ Res*. 1996; 78:73-81.

111. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacological reviews*. 2007; 59: 418-58.
112. Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem*. 1996; 271:29223-30.
113. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282:1988-95.
114. Nakano A, Liu GS, Heusch G, Downey JM, Cohen MV. Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2000; 32:1159-67.
115. Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2000; 86:263-75.
116. Post H, Schulz R, Behrends M, Gres P, Umschlag C, Heusch G. No involvement of endogenous nitric oxide in classical ischemic preconditioning in swine. *J Mol Cell Cardiol*. 2000; 32:725-33.
117. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*. 2007; 357:1121-35.
118. Cleveland Jr JC, Meldrum DR, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Adenosine preconditioning of human myocardium is dependent upon the ATP-sensitive K⁺ channel. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1997; 29:175-82.
119. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; 29:207-16.
120. Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem*. 1999; 196:59-67.
121. Das DK, Engelman RM, Maulik N. Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 874:49-65.

122. von Ruecker AA, Wild M, Rao GS, Bidlingmaier F. Atrial natriuretic peptide protects hepatocytes against damage induced by hypoxia and reactive oxygen. Possible role of intracellular free ionized calcium. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989; 27:531-7.
123. Amsterdam EA, Schaefer S. Ischemic preconditioning in coronary heart disease: a therapeutic golden fleece? *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43:1515-6.
124. Smith CC, Lim SY, Wynne AM, et al. Failure of the adipocytokine, resistin, to protect the heart from ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011; 16:63-71.
125. Lim SY, Lee DG, Sivakumaran P, Crombie D, et al. In vivo tissue engineering chamber supports human induced pluripotent stem cell survival and rapid differentiation. *Biochemical and biophysical research communications.* 2012; 422:75-9.
126. Kloner RA. Ischemic preconditioning: the issues of refractoriness and tolerance. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 31:1150-1.
127. Matsuyama N, Leavens JE, McKinnon D, Gaudette GR, Aksehirli TO, Krukenkamp IB. Ischemic but not pharmacological preconditioning requires protein synthesis. *Circulation.* 2000; 102:312-8.
128. Rowland RT, Meng X, Cleveland JC, Meldrum DR, Harken AH, Brown JM. Cardioadaptation induced by cyclic ischemic preconditioning is mediated by translational regulation of de novo protein synthesis. *J Surg Res.* 1997; 71:155-60.
129. Loubani M, Galifianes M. Pharmacological and ischemic preconditioning of the human myocardium: mitoK(ATP) channels are upstream and p38MAPK is downstream of PKC. *BMC Physiol.* 2002; 2:10.
130. Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, et al. Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth.* 2002; 89:486-91.
131. Riess ML, Kevin LG, Camara AK, Heisner JS, Stowe DF. Dual exposure to sevoflurane improves anesthetic preconditioning in intact hearts. *Anesthesiology.* 2004; 100:569-74.
132. Riess ML, Stowe DF, Warltier DC. Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 ; 286:1603-7.

133. Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffrè PA. Preinfarction angina and myocardial preconditioning. *Cardiologia*. 1999; 44:963-7.
134. Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffrè PA. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation*. 1999; 100:559-63.
135. Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282:H1996-2003.
136. Kevin LG, Novalija E, Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg*. 2005; 101:1275-87.
137. Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J*. 2005; 19:419-21.
138. Zhu J, Rebecchi MJ, Wang Q, Glass PS, Brink PR, Liu L. Chronic Tempol treatment restores pharmacological preconditioning in the senescent rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013; 304:H649-59.
139. Bacaksiz A, Teker ME, Buyukpinarbasili N, et al. Does pantoprazole protect against reperfusion injury following myocardial ischemia in rats? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17:269-75.
140. Richardson P, Hawkey CJ, Stack WA. Proton pump inhibitors. Pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders. *Drugs*. 1998; 56:307-35.
141. Roche VF. The chemically elegant proton pump inhibitors. *Am J Pharm Educ*. 2006; 70:101.
142. Gesheff MG, Franzese CJ, Bliden KP, Contino CJ, Rafeedheen R, Tantry US, Gurbel PA. Review of pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling and safety of proton pump inhibitors and aspirin. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2014; 7:645-53.
143. Ward RM, Kearns GL. Proton pump inhibitors in pediatrics : mechanism of action, pharmacokinetics, pharmacogenetics, and pharmacodynamics. *Paediatr Drugs*. 2013; 15:119-31.

144. Shin JM, Sachs G. Pharmacology of proton pump inhibitors. *Curr Gastroenterol Rep.* 2008; 10:528-34.
145. Al-Badr AA. Omeprazole. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2010; 35:151-262.
146. Regårdh CG. Pharmacokinetics and metabolism of omeprazole in man. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1986; 118:99-104.
147. Cederberg C, Andersson T, Skånberg I. Omeprazole: pharmacokinetics and metabolism in man. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989; 166:33-42.
148. Rizwana I, Prakash KV, Mohan GK. Extractive Spectroscopic Determination of Lansoprazole in Pharmaceutical Dosage Form. *Chemical Science Transactions.* 2014; 3:1390-5.
149. Brittain GH. Analytical profiles of drug substances and excipients. 2001., Volume 28, pg 135-149. A hareourst science and technology company, San Diego, California, USA.
150. Kim KA, Shon JH, Park JY, et al. Enantioselective disposition of lansoprazole in extensive and poor metabolizers of CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 72:90-9.
151. Meyer UA. Metabolic interactions of the proton-pump inhibitors lansoprazole, omeprazole and pantoprazole with other drugs. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996; 8:21-5.
152. Stedman CA, Barclay ML. Review article: comparison of the pharmacokinetics, acid suppression and efficacy of proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000;14:963–78.
153. Radhofer-Welte S. Pharmacokinetics and metabolism of the proton pump inhibitor pantoprazole in man. *Drugs Today (Barc).* 1999; 35:765-72.
154. van Rensburg CJ, Cheer S. Pantoprazole for the treatment of peptic ulcer bleeding and prevention of rebleeding. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2012; 5:51-60.
155. Blume H, Donath F, Warnke A, Schug BS. Pharmacokinetic drug interaction profiles of proton pump inhibitors. *Drug Saf.* 2006; 29:769-84.
156. Parsons ME. Pantoprazole, a new proton-pump inhibitor, has a precise and predictable profile of activity. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996; 8:15-20.
157. Hayashi H, Shimamoto K, Taniai E, et al. Liver tumor promoting effect of omeprazole in rats and its possible mechanism of action. *J Toxicol Sci.* 2012; 37:491-501.

158. Mefford IN, Wade EU. Proton pump inhibitors as a treatment method for type II diabetes. *Med Hypotheses*. 2009; 73:29-32.
159. Boj-Carceller D, Bocos-Terraz P, Moreno-Vernis M, Sanz-Paris A, Trincado-Aznar P, Albero-Gamboa R. Are proton pump inhibitors a new antidiabetic drug? A cross sectional study. *World J Diabetes*. 2011; 2:217-20.
160. Crouch MA, Mefford IN, Wade EU. Proton pump inhibitor therapy associated with lower glycosylated hemoglobin levels in type 2 diabetes. *J Am Board Fam Med*. 2012; 25:50-4.
161. Singh PK, Hota D, Dutta P, et al. Pantoprazole improves glycemic control in type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97:2105-8.
162. Barchetta I, Guglielmi C, Bertocchini L, et al. Therapy with proton pump inhibitors in patients with type 2 diabetes is independently associated with improved glycometabolic control. *Acta Diabetol*. 2015 Feb 27. [Epub ahead of print].
163. Matuzsca C, Lindner K, Haier J, Hummel R. Proton pump inhibitors as chemosensitizer: new indication for a well-known medication-Brief review. *Cancer Cell & Microenvironment*. 2015; 2:10-148.
164. Gomes OM, Magalhães Mde M, Abrantes RD. Myocardium functional recovery protection by omeprazole after ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2010; 25:388-92.
165. Gomes OM, Magalhães Mde M, Abrantes RD, Kallás E. Pantoprazole provides myocardial protection similar to ischemic preconditioning: experimental study of isolated hearts of rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2011; 26:433-9.
166. Booher AM, Dorsch M, Gurm HS. Case Report: The Effect of Proton Pump Inhibitor Administration on Hemodynamics in a Cardiac Intensive Care Unit. *Clinical cardiology*. 2010; 33:111-3.
167. Tanaka S, Nishigaki K, Ojio S, et al. Can negative cardiac effect of proton pump inhibitor and high-dose H2-blocker have clinical influence on patients with stable angina? *J Cardiol*. 2008; 52:39-48.

168. Sorgeloos P, Remiche-Van Der Wielen C, Persoone G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests--a critical analysis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1978; 2:249-55.
169. Rocha-Filho CA, Albuquerque LP, Silva LR, et al. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere.* 2015; 132:188-92.
170. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-8.
171. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126:131-8
172. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research.* CRC Press Une, Boca Raton, pp 123-132.
173. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980; 38:161-70.
174. Xia A, Xue Z, Li Y, Wang W, Xia J, Wei T, Cao J, Zhou W. Cardioprotective effect of betulinic Acid on myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:573745.
175. 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 Nov;301(5):H1723-41.
176. Li J, Iorga A, Sharma S, Youn JY, Partow-Navid R, Umar S, et al. Intralipid, a clinically safe compound, protects the heart against ischemia-reperfusion injury more efficiently than cyclosporine-A. *Anesthesiology.* 2012;117(4):836-46.
177. Ghyasi R, Sepehri G, Mohammadi M, Badalzadeh R, Ghyasi A. Effect of mebudipine on oxidative stress and lipid peroxidation in myocardial ischemic-reperfusion injury in male rat. *J Res Med Sci.* 2012;17(12):1150-5.
178. Grimm AF, Katele KV, Klein SA, Lin HL. Growth of the heart. Left ventricular morphology and sarcomere lengths. *Growth.* 1973;37(2):189-206.

179. Domenech-Mateu JM, Boya-Vegué J. An ultrastructural study of sinoatrial node cells in the embryonic rat heart. *J Anat.* 1975;119(Pt 1):77-83.
180. Anversa P, Loud AV, Vitali-Mazza L. Morphometry and autoradiography of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat: an electron microscopic study. *Lab Invest.* 1976;35(5):475-83.
181. Moffat MP, Karmazyn M. Protective effects of the potent Na/H exchange inhibitor methylisobutyl amiloride against postischemic contractile dysfunction in rat and guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1993; 25:959-71.
182. Budzynski J, Klopocka M, Pulkowski G, et al. The effect of double dose of omeprazole on the course of angina pectoris and treadmill stress test in patients with coronary artery disease: a randomised, double-blind, placebo controlled, crossover trial. *Int J Cardiol.* 2008; 127:233-9.
183. Siegel JH, Sonnenblick EH. Isometric time-tension relationships as an index of myocardial contractility. *Circ Res.* 1963; 12:597-610.
184. 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; 17:662-8.
185. Gomes OM, Gomes ES, Faraj M. Doença da discinesia miocárdica de estresse. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2004; 19:378-85.
186. Schillinger W, Teucher N, Sossalla S, Kettlewell S, Werner C, Raddatz D, Elgner A, Tenderich G, Pieske B, Ramadori G, Schöndube FA, Kögler H, Kockskämper J, Maier LS, Schwörer H, Smith GL, Hasenfuss G. Negative inotropy of the gastric proton pump inhibitor pantoprazole in myocardium from humans and rabbits: evaluation of mechanisms. *Circulation.* 2007 Jul 3;116(1):57-66.
187. Thompson DS, Waldron CB, Juul SM, et al. Analysis of left ventricular pressure during isovolumic relaxation in coronary artery disease. *Circulation.* 1982; 65:690-7.
188. Lee SM, Hutchinson M, Staikopoulos V, Saint DA. Amitriptyline pharmacologically preconditions rat hearts against cardiac ischemic reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2015 Jul 1;190:353-9.

189. Kim EJ, Lee RK, Lee SM, Kim DY. General pharmacology of IY-81149, a new proton pump inhibitor. *Arzneimittelforschung*. 2001 Jan;51(1):51-9.
190. Lascano EC, Negroni JA, del Valle HF, Crottogini AJ. Left ventricular regional systolic and diastolic function in conscious sheep undergoing ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 1999 Jan;41(1):77-86.
191. Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1984 Nov;16(11):969-85.
192. Pedro Joya-Vazquez¹, M Asuncion Bacaicoa², Raul Velasco¹, Jose L. Chicon¹, Sara Trejo¹, M. Antonia Carrasco², N. Roberto Robles³ and Juan F. Sanchez Munoz-Torrero. Proton-Pump Inhibitors Therapy and Blood Pressure Control. *IJPR Volume 4 Issue 3 (2014) 142-147*.
193. Gautam CS, Utreja A, Goel D, Sandhu G, Gogia N. Negative chronotropic effect of proton pump inhibitors on frog-heart preparation. *Indian J Gastroenterol*. 2009;28(4):147-9.
194. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*. 1997;96(5):1641-6.
195. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):1043-65.
196. Heart rate variability for risk stratification of life-threatening arrhythmias. American College of Cardiology Cardiovascular Technology Assessment Committee. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Sep;22(3):948-50.
197. Hagar JM, Hale SL, Kloner RA. Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res*. 1991 Jan;68(1):61-8.
198. El-Charabaty E, Saifan C, Abdallah M, Naboush A, Glass D, Azzi G, Azzi Y, Khan A, Baydoun H, Rondla C, Parekh N, El-Sayegh S. Effects of proton pump inhibitors and electrolyte disturbances on arrhythmias. *Int J Gen Med*. 2013 Jun 28;6:515-8.

199. Bibawy JN, Parikh V, Wahba J, Barsoum EA, Lafferty J, Kowalski M, Bekheit S. Pantoprazole (proton pump inhibitor) contributing to Torsades de Pointes storm. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013 Apr;6(2):e17-9.
200. Pagliaro P, Penna C, Gattullo D. The effects of ischemic preconditioning on resting coronary flow and reactive hyperemia: involvement of A1 adenosine receptors. *Life Sci*. 1999;64(12):1071-8.
201. Cannon RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*. 1998 Aug;44(8 Pt 2):1809-19. Review. Erratum in: *Clin Chem* 1998 Sep;44(9):2070.
202. Sadigh B, Shahgaldi K, Sylvén C, Quintana M, Winter R. Preconditioning effects of adenosine in patients with severe coronary artery disease but preserved coronary flow reserve. *Coron Artery Dis*. 2009 Aug;20(5):354-9.
203. Lefer DJ, Nakanishi K, Johnston WE, Vinten-Johansen J. Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor following acute myocardial ischemia and perfusion in dogs. *Circulation* 1993;88:2337-2350.
204. Džoljić E, Nešić ZI, Stojanović RM, et al. Azotni oksid, neurodegeneracija i Parkinsonova bolest. *Vojnosanitetski pregled*. 2005; 62:751-6.
205. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364:626–32.
206. Kurzelewski M, Czarnowska E, Beresewicz A. Superoxide- and nitric oxide-derived species mediate endothelial dysfunction, endothelial glycocalyx disruption, enhanced neutrophil adhesion in the post-ischemic guinea-pig heart. *J Physiol Pharmacol*. 2005; 56:163–78.
207. Itoh T, Haruna M, Abe K. Differential regulation of the nitric oxide-cGMP pathway exacerbates postischemic heart injury in stroke-prone hypertensive rats. *Exp Physiol*. 2007 Jan;92(1):147-59.
208. Bagi Z, Koller A, Kaley G. Superoxide-NO interaction decreases flow- and agonist-induced dilations of coronary arterioles in Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Oct;285(4):H1404-10.

209. Bagi Z, Koller A, Kaley G. PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Feb;286(2):H742-8.
210. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003 Feb 7;92(2):e31-40.
211. Goswami SK, Maulik N, Das DK. Ischemia-reperfusion and cardioprotection: a delicate balance between reactive oxygen species generation and redox homeostasis. *Ann Med*. 2007;39(4):275-89.
212. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*. 2012 Feb;133(2):230-55.
213. Nonami Y. The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J*. 1997 Feb;61(2):119-32.
214. Pagliaro P, Penna C. Redox signalling and cardioprotection: translatability and mechanism. *Br J Pharmacol*. 2015 Apr;172(8):1974-95
215. Lalu MM, Wang W, Schulz R. Peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Heart Fail Rev*. 2002 Oct;7(4):359-69.
216. Wandall JH. Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, superoxide production, degranulation and translocation of cytochrome b-245. 1992; 33:617-21.
217. Omar BA, Hanson AK, Bose SK, McCord JM. Ischemic preconditioning is not mediated by free radicals in the isolated rabbit heart. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(5):517-20.
218. Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol*. 2003 Feb;138(4):532-43.
219. Valen G, Starkopf J, Takeshima S, Kullisaar T, Vihalemm T, Kengsepp AT, Löwbeer C, Vaage J, Zilmer M. Preconditioning with hydrogen peroxide (H₂O₂) or ischemia in H₂O₂-induced cardiac dysfunction. *Free Radic Res*. 1998 Sep;29(3):235-45.

220. Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15;81(3):457-64.
221. Simon WA, Sturm E, Hartmann HJ, Weser U. Hydroxyl radical scavenging reactivity of proton pump inhibitors. *Biochemical Pharmacology.* 2006; 71:1337–41.
222. Hackert T, Tudor S, Felix K, et al. Effects of pantoprazole in experimental acute pancreatitis. *Life Sci.* 2010; 87:551-7.
223. Biswas K, Banyopadhyay U, Chattopadhyay I, Varadaraj A, Ali E, Banerjee RK. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J Biol Chem* 2003;278:993– 1001.
224. Gozal Y, Chevion M, Elami A, Berenshtein E, Kitrossky N, Drenger B. Ischaemic preconditioning but not isoflurane prevents post-ischaemic production of hydroxyl radicals in a canine model of ischaemia-reperfusion. *Eur J Anaesthesiol.* 2005 Jan;22(1):49-55.
225. Hayashi H, Shimamoto K, Taniai E, Ishii Y, Morita R, Suzuki K, Shibutani M, Mitsumori K. Liver tumor promoting effect of omeprazole in rats and its possible mechanism of action. *J Toxicol Sci.* 2012; 37:491-501.
226. Petronilho F, Araújo JH, Steckert AV, et al. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides.* 2009; 30:1460-5.