



Лични подаци руководиоца пројекта

Име: Петар
Презиме: Ристић
Е-маил адреса: petris011@yahoo.com

Општи подаци и протокол истраживања

Назив пројекта: Утицај селективне блокаде елемената ткивног ренин ангиотензин алдостерон система на изоловано срце пацова у хемијски изазваном diabetes mellitus-у

Кључне речи: дијабетична кардиомиопатија, РААС, оксидативни стрес, L-аргинин-НО-систем, Langendorff-ов модел изолованог срца

Сажетак

Кардиоваскуларна обољења су водећи узрок смртности код оболелих од дијабетеса и значајно чешће и теже погађају оболеле од дијабетеса него општу популацију. Дијабетична кардиомиопатија води превасходно у дијастолну а касније и систолну дисфункцију и пре него што се испољи исхемиска болест срца. Кључни узрочник ремоделовања ткива је хронична хипергликемија а модулатор значајно појачана активност ренин ангиотензин алдостерон система (РААС) и то превасходно у ткивима. РААС превасходно делује модулацијом ефеката оксидативног стреса али и бројним другим механизмима. Сложеност произилази из ткивне синтезе бројних елемената РААС унутар миокарда те присуства њихових рецептора на ћелиској мембрани и унутар ћелија. Блокада РААС се данас постиже инхибиторима АЦЕ, блокаторима АТ1 рецептора, инхибиторима ренина и блокадом рецептора за алдостерон. Сваки од поменутих начина доприноси блокади РААС али међу њима постоје и значајне разлике. Експеримент ће бити вршен на пацовима рода Wistar старим 8 недеља којима ће хемиски бити изазван инсулинопенијски дијабетес употребом 60мг/кг стрептозоцина ип. Четири недеље након утврђене хипергликемије животиње ће бити жртвоване. Препарат срца ће бити припремљен модификованом техником изолованог ретроградно перфундованог срца по Langendorff-у.



Кардиодинамски параметри и опсег коронарне ауторегулације би се одређивали на задатим вредностима перфузионог притиска 40-120 cm H₂O. У узорцима коронарног венског ефлуента би се одређивали параметри оксидативног стреса и маркер L-arginin-NO-система. Сви наведени параметри би били мерени спектрофотометријски. Кардиодинамски параметри рада срца (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, MBP) би се мерили софтверски посредством сензора који би се уводио у леву комору. Блокада РААС ће се остваривати кроз перфузат - Krebs-Hensenleit-ов физиолошки раствор. Планирамо 11 група по 12 животиња: Са АЦЕИ – зофеноприл, блокатор АТ1 рецептора-валсартан, инхибитор ренина-алискирен, блокатор рецептора за алдостерон-спиринолактон, са чистим КХ раствором, здрави, здрави + алискирен. Ефекти комбиноване РААС блокаде испитаће се додавањем другог лека током експеримента и то: зофеноприл+валсартан, зофеноприл + спиринолактон, алискирен + спиринолактон, валсартан + спиринолактон. Лабораториски би из крви одредили ХБА1ц и БНП ради утврђивања евентуалне разлике у просечним вредностим гликемије током експеримента те разлике у параметру срчане слабости. Очекујемо да дијабетична кардиомиопатија доводи до дијастолне и у мањој мери систолне дисфункције миокарда и веће ригидности коронарног протока. Сваки од наведених начина блокаде ткивног РААС даје свој допринос умањивању ефеката појачане активности РААС. Разлике очекујемо у утицају на параметре оксидативног стреса и метаболизма NO као и на основу степена блокаде РААС имајући у виду потенцијал дејства на ткивни екстра и интрацелуларни РААС. Ефекти самосталне или комбиноване примене блокатора алдостеронског рецептора имајући у виду литературне контроверзе остају отворено питање на које ћемо потражити одговор.

Циљ истраживања

Циљеви истраживања су:

1. Утврдити измене у функцији миокарда и коронарног протока насталих у анималном моделу дијабетичне кардиомиопатије.
2. Утврдити промене у параметарима оксидативног стреса и L-аргинин-NO система у венском ефлуенту изолованог срца по Lagendorff-у у анималном моделу дијабетичне кардиомиопатије.
3. Селективном блокадом појединих елемената РААС давањем лека директно кроз перфузат испитати појединачни утицај такве блокаде на кардиодинамске параметре, коронарну ауторегулацију и метаболите оксидативног стреса и L-аргинин-NO система.



4. Установити ефекат комбиноване блокаде елемената РААС на исте параметре и евентуалну корист која из таквог поступка проистиче-

Актуелност истраживања

Diabetes mellitus је обољење које карактерише хронична хипергликемија али и поремећај метаболизма других угљених хидрата, липида и протеина проистекао из недовољног стварања и /или ефикасности инсулина. Последице метаболичких поремећаја захватају све органске системе и доводе до њихове дисфункције. Из тог ралога хроничне компликације дијабетеса представљају највећи изазов и највећи трошак у лечењу ових болесника, што је и закључак опсежне CODE 2 студије (1).

Кардиоваскуларна обољења су 2-4 пута чешћа међу оболелим од дијабетеса и водећи су узрок смртности оболелих од дијабетеса, смртност је већа 3 пута у односу на осталу популацију. Оболели од дијабетеса имају већу смртност и у инфаркту миокарда и то 4 пута за мушкарце и 7 пута за жене. Све ово говори о специфичном оштећењу кардиоваскуларног система у дијабетесу (2, 3).

Дијабетична кардиомиопатија (ДКМП) је појам који се појављује још од 1972 године када је Rubler на патохистолошком препарату миокарда дијабетичара уочио промене настале у дијабетесу у одсуству хипертензије, исхемиске болести или алкохолизма (4). Карактерише је примарно дијастолна дисфункција коју прати каснија систолна дисфункција. Данас се у жижу научног интересовања када је у питању патогенеза дијабетичне кардиомиопатије поставља ренин ангиотензин алдостерон систем (РААС) за који се схватило да представља кључни медијатор у испољавању последица хроничне хипергликемије на ткива (5, 6).

Дијабетес карактерише појачана активност РААС. Хипергликемија је најзначајнији метаболички узрочник ткивних алтерација и активације РААС. Последице активације РААС у срчаном ткиву су појачани оксидативни стрес, фиброза те апоптоза (7, 8). Ова појачана активност се огледа и у ефектима на ткива која нису у вези са створеним ангиотензином 2 (АТ II) нпр. ефекти ренина на ренински рецептор (9). Ренин у срчаном ткиву је двојног порекла, и из самих ћелија, али и порекла из проренина интернализованог у ћелије из циркулације. У дијабетесу концентрација проренина у циркулацији је значајно повећана (10). Проренин се интернализује у ћелијама миокарда и ово повећање уз нормализацију концентрације ренина је разлог зашто у дијабетесу за разлику од системског АТ II чија се концентрација нормализује долази до значајног и дуготрајног повећања ткивног АТ II (11).

Преко 90 % РААС чини ткивни РААС с тим да и у овом случају разликујемо интрацелуларни и екстрацелуларни ткивни РААС (12). Ови системи међусобно интерагују али се и разликују по начину стварања кључних метболита а самим тим и реаговању на савремене тераписке опције блокаде РААС (7). Интрацелуларни ткивни АТ II је двојног порекла, са једне стране ствара се од унутарћелиски створених



ангиотензиногена, ренина и химаза а са друге стране бива након секреције интернализован путем АТ1 рецептора. Синтеза интрацелуларног АТ II највећим делом је посредована химазама а не АЦЕ, зато инхибитори АЦЕ не умањују значајно синтезу интрацелуларног АТ II.

Екстрацелуларни АТ II регулише артеријски притисак као и хомеостазу електролита и течности док интрацелуларни АТ II омогућава трајну активацију РААС повећавајући генску експресију за ангиотензиноген, ренин, и АТ1 рецептор и у кардиомиоцитима и у фибробластима (13). Ова два система унутар ткивног РААС делују синергистички. Хипергликемија је снажан стимуланс за активацију интрацелуларног РААС (14). Интрацелуларни АТ II корелира са хипергликемијом индукованим оксидативни стресом и апоптозом кардиомиоцита (15).

У стању хипергликемије у кардиомиоцитима АТ II ствара превасходно интрацелуларно дејством ренина и химаза а у фибробластима срца ткивни РААС се ствара дејством ренина и АЦЕ и интрацелуларно и екстрацелуларно (16). Инхибитори АЦЕ стога делују превасходно на ткивни РААС створен из фибробласта. Блокатори АТ1 рецептора не блокују у потпуности ткивне ефекте интрацелуларног РААС (17). За разлику од класичних блокатора РААС инхибитор ренина показује ефекат и на интрацелуларни и екстрацелуларни ткивни РААС (18).

Апсолутна блокада РААС не може сама по себи бити циљ. У децембру 2012 велика међународна група објављује резултате по којима додавање алискирена класичним блокаторима РААС није довело до бољитка, напротив студија је прекинута и овакво се поступање не препоручује (18).

Сматрало се да се протективни ефекти инхибитора АЦЕ и блокатора АТ1 остварују делимично и механизмима независним за РААС као што су каликреин-кинин систем и ППАР γ активација (19, 20). У новије време уочава се значај ткивног АЦЕ 2 чији производ Ангиотензин има вазодилататорна својства преко NO. Вазодилатативни ефекат преко NO није блокиран инхибитором брадикинина већ инхибитором АТ (21).

Ефекти алдостерона на ткива могу бити геномски и негеномски. У експерименту на изолованом срцу пацова перфузија и спиролактоном и алдостероном води у акутно негеномско појачање контрактилности, што се додатно појачава комбинованом перфузијом. Са друге стране алдостерон пре свега потенцирањем ефеката АТ II преко АТ1 рецептора доприноси развоју кардијалне фиброзе (22). Алдостерон се и директно синтетише у ткивима (23). У дуготрајној блокади РААС са АЦЕИ и АРБ долази до бега алдостерона односно до његовог пораста и поред великих доза и/или комбинованог дејства (24). Наведено чини испитивање акутних и хроничних ефеката спиролактона на дијабетичну кардиомиопатију изазовним. Разлике међу резултатима у групама са спиролактоном у акутном и хроничном експерименту би могле указати на значај геномских односно негеномских ефеката алдостерона у дијабетичној кардиомиопатији.

Апсолутна блокада РААС не може сама по себи бити циљ. У децембру 2012 велика међународна група објављује резултате по којима додавање алискирена



класичним блокаторима РААС није довело до бољитка, напротив студија је прекинута и овакво се поступање не препоручује (25).

Оксидативни стрес доприноси кардијалном ремоделовању и срчајној слабости. Свака терапија која умањује оксидативни стрес (антиоксиданси, блокатори РААС) води умањењу његових последица по ткива (8). Раније је уочен пораст елемената оксидативног стреса у перикардној течности код животиња са срчаном слабошћу (26).

Предмет и опис истраживања

Студија је експерименталног карактера. Експериментална истраживања у нашем раду ће бити спроведена на изолованом срцу пацова Wistar соја, мушког пола, старости 8 недеља, просечне телесне масе 180-200 грама према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по Langendorff-у, са променама коронарног перфузионог притиска у опсегу од 40-120 cm H₂O. Дијабетес мелитус би био изазван хемиском методом. Експерименталним животињама би се у 4. недељи живота интраперитонеално убризгало 60 мг/кг Стрептозоцина у 1 мл цитратног пуфера рН 4.5, с тим да би контролна група добила цитратни пуфер у истој количини. Хипергликемија би очекивано наступила након 48-76 сати. Експерименталне животиње код којих се верификује хипергликемија из узорка крви добијеног пункцијом репне вене биле би чуване још 4 недеље у стандардним лабораториским условима уз воду и храну *ad libidum*.

Кардиодинамски параметри (dp/dt max – максимална вредност промене притиска у левој комори, dp/dt min – минимална вредност промене притиска у левој комори, SLVP – систолни притисак у левој комори, DLVP – дијастолни притисак у левој комори, HR– срчана фреквенца, MBP- средњи перфузиони притисак) и опсег коронарне ауторегулације би се одређивали на свакој од задатих вредности перфузионог притиска. У узорцима коронарног венског ефлуента би се одређивали параметри оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS), супероксид ањон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2), као и количина ослобођеног NO (мерен у облику нитрита) као маркера L-аргинин-NO-система. Сви наведени параметри би били мерени спектрофотометријски.

Прво би били установљени ефекти дијабетичне кардиомиопатије у експерименталном моделу. Блокада РААС у анималном моделу дијабетичне кардиомиопатије би се остваривала на два начина.

Првим начином би испитивали акутни ефекат блокаде РААС на развијени анимални модел у коме је хипергликемијом изазвана ткивна активација РААС, код животиња које током почетног развоја дијабетичне кардиомиопатије нису добијале медикаменте за блокаду активације и ефеката РААС. Планирано је 11 група по 12 животиња и то:

1. Здраве са чистим Krebs-Hensenleit-овим физиолошким раствором,



2. Дијабетична кардиомиопатија(ДКМП) са чистим Krebs-Hensenleit-овим физиолошким раствором,
3. Здрави+Алискирен (4.5 μ М),
4. ДКМП+Зофеноприл (1.5 μ М),
5. ДКМП+Валсартан (3 μ М),
6. ДКМП+Алискирен (4.5 μ М),
7. ДКМП+Спиринолактон (3 μ М),
8. ДКМП+Зофеноприл (1.5 μ М)+Валсартан (3 μ М),
9. ДКМП+Зофеноприл (1.5 μ М)+Спиринолактон (3 μ М),
10. ДКМП+Валсартан (3 μ М)+Спиринолактон (3 μ М),
11. ДКМП+Алискирен (4.5 μ М)+Спиринолактон (3 μ М)

Други начин би подразумевао свакодневну примену различитих медикамената за блокаду РААС чиме би се анализирали протективни ефекти различитих облика хроничне блокаде РААС примењене током развоја дијабетичне кардиомиопатије.

У анализи акутних ефеката селективне блокаде РААС медикаменти би након 4 недеље хипергликемијом узроковане појачане активности ткивног РААС и неометаног развоја дијабетичне кардиомиопатије били апликовани перфузијом изолованог срца припремљеног методом по Lagendorff-у: директним инхибитором ренина-алискирен, инхибитором ангиотензин конвертујућег ензима зофенаприл (са израженим ткивним ефектом), затим блокатором АТ1 рецептора за ангиотензин II–валсартан и блокатором ефеката алдостерона- спиринолактон. Планира се и комбинована перфузија додавањем спиринолактона класичним блокаторима РААС (зофеноприл, валсартан, алискирен) ради увида у евентуалну вредност ефеката блокаде ткивног минералокортикоидног рецептора при већ оствареној блокади РААС на данас уобичајен начин. Упоредили би и комбиновану блокаду РААС перфузијом са АЦЕ инхибитором (зофеноприл) и АТ1 антагонистом (валсартан) према ефектима алискирена. Ради утврђивања појачане активности РААС у студиској групи постојала би и група здравих који би добили алискирен кроз перфузат. Израженији ефекти на миокард код дијабетичних животиња доказали би већи степен активности РААС. Контролна група здравих и група дијабетичних са чистим Krebs-Hensenleit-овим физиолошким раствором би употпунили овај део експеримента.

У анализи хроничних ефеката селективне блокаде РААС експерименталне животиње би након утврђивања постојања дијабетеса биле подељене у 6 група по 12 животиња. Прва група би од дана утврђивања хипергликемије добијала Алискирен у дози од 30 мг/кг дневно, друга би добијала зофеноприл 10мг/кг трећа група би добијала валсартан 20 мг/кг четврта спиринолактон 20 мг/кг уз додатак још две групе са инхибитором ангиотензин конвертујућег ензима–рамиприл 5 мг/кг који нема изражено ткивно везивање попут зофенаприла и групе са фосиноприлом 10 мг/кг као представника АЦЕ инхибитора са фосфатном групом и како се у литератури наводи значајним ефектима на централни нервни систем. Додатну седму групу чиниле би



животиње којима би дали алискирен 30мг/кг + спиринолактон 20мг/кг ради процене протективних ефеката хроничног додавања спиринолатона у групи у којој је очекивано блокада претходних елемената РААС најизраженија.

Десет недеља након започете терапије животиње би биле измерене, жртвоване, одредила би се маса срца ради индиректне процене степена апоптозе и поновио експеримент на изолованом срцу по Langendorffu-у стим да би у овом случају перфузија била остваривана чистим Krebs-Hensenleit-овим физиолошким раствором.

Експерименталним животињама би након жртвовања биле одређене следеће лабораториске анализе. Маркери инфламације: Ц реактивни протеин и интерлеукин 6. Маркер срчане слабости БНП (brain natriuretic peptid). Маркери квалитета гликорегулације и функције преосталог панкреаса: гликемија наше, гликозилирани хемоглобин (Hb1c), инсулин, Ц пептид, проинсулин наше. Липидни профил: холестерол, триглицериди, ХДЛ, ЛДЛ, слободне масне киселине.

Значај истраживања

Подаци добијени из оваквог истраживања омогућили би увид у ефекте појачане активности и блокаде елемената РААС на функционисање миокарда и коронарне васкулатуре у условима хроничне хипергликемије. Стекао би се увид у најефикаснији и најрационалнији приступ блокади РААС имајући у виду постојање више тераписких опција које су у начину деловања више паралелене него што се преклапају. Утицај блокаде ефеката ткивног алдостерона у дијабетичној кардиомиопатији самостално или удружено са класичним блокаторима РААС је мање истражена тема у доступној литератури те су подаци стечени овим испитивањем веома актуелни. Инхибитори ренина преваходно дугоделујући препарати какав је Алискирен су интригантна и нова тераписка опција која за сада није могућа у нашој земљи али која се очекује у наредном периоду .

Додатно значају овог експеримента доприносе могућности анализе утицаја блокаде РААС на друга ткива:

1. Анализа патохистолошких промена у миокарду, панкреасу, ретини, бубрегу, јетри
2. Процена ефеката блокаде РААС на апоптозу миокарда (однос масе срца и тела)
3. Анализа функционалне способности резидуалног панкреаса (НОМАВ, проинсулин /Ц пептид)
4. Утицај селективне блокаде РААС на инсулинску резистенцију (НОМА IR)
5. Процена ткивне експресије АТ 1-7 и TGF-1 у различитим видовима блокаде РААС
6. Утицај блокаде РААС на синтезу :
 - липопотеина и концентрацију слободних масних киселина.
 - параметре хроничне инфламације (ЦРП, ИЛ 6)



- Васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF) у ретини

Временски оквир (50 речи)

Планирано је да истраживање траје две године.

Литература

1. Massi M. The cost of diabetes in Europe CODE 2 study 2002 *Diabetologia* Jul;45(7):S1-4.
2. Hayat SA. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms diagnosis and treatment *Clinical Science* (2004) 107, 539–557.
3. Li YW. Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. (2011) *J Clinic Experiment Cardiol* 2:114.
4. Rubler S. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972;30:595– 602.



5. Watanabe K. Role of differential signaling pathways and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy *Current Cardiology Reviews*, 2010, 6, 280-290.
6. Hunyady L. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II *Molecular Endocrinology* 2006 20(5):953-970.
7. Singh VP. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress and cardiac fibrosis *Diabetes* 57:3297-3306, 2008.
8. Lijnen PJ. Modulation of reactive Oxygen species and collagen synthesis by angiotensin II in cardiac fibroblasts *The open Hypertension Journal*, 2011;4, 1-17.
9. Nguyen G. Pivotal role of renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J.Clin Invest* 109:1417-1427, 2002.
10. Krop M. Circulating vs tissue renin angiotensin system: on the origin of (pro)renin *Current Hypertension Reports* 10:112-118, 2008.
11. Kumar R. Review: intracardiac cellular angiotensin system in diabetes *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 302: R510-R517 2012.
12. Lim HS. Diabetes mellitus the renin angiotensin aldosterone system, and the heart. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1737-1748.
13. Singh VP. Intracellular angiotensin II is positive regulator of cardiac renin angiotensin system *Hypertension* 52:E91-E92, 2008.
14. Singh VP. Activation of intracellular renin angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: role in extracellular matrix production. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol* 294:H 1675-H 1684, 2008.
15. Singh VP. High glucose induced regulation of intracellular angiotensin II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol* 293 H939-H948, 2007.
16. Singh VP. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress and cardiac fibrosis *Diabetes* 57:3297-3306 2008.
17. Baker KM. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II induced cardiac hypertrophy *Regul Pept* 120:5-13 2004.



18. Seqqat R. Aliskiren prevents diabetic cardiomyopathy independent of blood pressure in mouse model: comparison with an ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker. *Hypertension* 58:e128 2011.
19. Erdos EG. Angiotensin I converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of in in B1 and B2 receptor function. *hypertension* 55:214-220, 2010.
20. Rong X. Angiotensin II type 1 receptor independent beneficial effects of telmisartan on dietary induced obesity insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia* 53:1727-1731, 2010.
21. Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:93-101.
22. Robert V. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone salt induced fibrosis. *Hypertension* 1999;33:981-986.
23. Lombes M. Identification and role of aldosterone receptors in the cardiovascular system. *Ann Endocrinol* 2000;61:41-46.
24. Mc Kalvie RS. Comparison of candesartan, enalapril and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction RESOLVED pilot study Investigators. *Circulation* 1999 100:1056-1064.
25. Parving HH. Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *NEJM* 2012 Dec 6;367(23):2204-13.
26. Mallat Z. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ in pericardial fluid of patients with heart failure a potential role for *in vivo* oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure *Circulation* 1998;97:1536-9.