



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Утицај селективне блокаде елемената ткивног ренин  
ангиотензин алдеостерон система на изоловано срце  
пацова у хемијски изазваном *diabetes mellitus*-у**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Др Петар Ристић**

**Ментор: проф. др Владимир Љ. Јаковљевић**

**Јануар, 2017. Крагујевац**

---

**САДРЖАЈ**

<b>1. УВОД</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Дијабетична кардиомиопатија</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Патогенеза дијабетичне кардиомиопатије</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Однос узрочника медијатора и ефектора у дијабетичној кардиомиопатији</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Ренин ангиотензин алдостерон систем</b>	<b>15</b>
<b>1.4.1 Улога ткивног РААС у дијабетичној кардиомиопатији</b>	<b>17</b>
<b>1.4.2. Дијабетична кардиомиопатија и модулатори РААС</b>	<b>18</b>
<b>1.5. Анимани модели дијабетеса</b>	<b>20</b>
<b>1.5.1. Индукција дијабетеса употребом стрептозотоцина</b>	<b>21</b>
<b>1.6. Оксидациони стрес</b>	<b>23</b>
<b>1.6.1. Однос хипергликемије оксидационог стреса и развоја ДКМП</b>	<b>25</b>
<b>1.6.2. Антиоксидациона заштита</b>	<b>25</b>
<b>1.7. L.-Аргинин NO систем</b>	<b>26</b>

---

<b>2 ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ И ХИПОТЕЗЕ</b>	<b>30</b>
2.1 Циљеви студије	31
2.2 . Главна хипотеза	31
2.3. Остале хипотезе	31
<b>3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>	<b>32</b>
3.1. Материјали	33
3.1.1. Сет реагенаса за припремање <i>Krebs-Hensenleit</i> -овог раствора	33
3.1.2. Сет реагенаса за одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	33
3.1.3. Сет реагенаса за одређивање водоник пероксида ( $H_2O_2$ )	33
3.1.4. Сет реагенаса за одређивање супероксид анјонског радикала ( $O_2^-$ )	33
3.1.5. Сет реагенаса за одређивање азот монооксида (NO ) у облику нитрита	34
3.2. Експериментални модел	34
3.2.1 Експериментални модел дијабетеса индукованог применом стрептозотоцина	34
3.2.2. Експериментални модел изолованог срца	34
3.3. Експериментални протокол	34
3.3.1. Изазивање дијабетеса код експерименталних животиња хемијском методом	35
3.3.2. Жртвовање животиња и зимање узорака крви	35
3.3.3. Припремање изолованог срца по модификованој <i>Lagendorff</i> методи	35
3.3.4. Експерименталне групе животиња	37
3.4. Аналитичке методе	37

3.4.1. Одређивање нитрита	37
3.4.2. Одређивање супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ )	37
3.4.3. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	37
3.4.4. Одређивање водоник пероксида ( $H_2O_2$ )	38
3.4.5. Статистичка обрада података	38
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b>	<b>40</b>
4.1. Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на кардиодинамске параметре и оксидациони стрес у изолованом срцу пацова	41
4.2. Ефекти Зофеноприла на кардиодинамске параметре и оксидациони стрес у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом	47
4.3. Ефекти Валсартана на кардиодинамске параметре и оксидациони стрес у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом	57
4.4. Ефекти Спиринолактона на кардиодинамске параметре и оксидациони стрес у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом	70
4.5. Ефекти Алискирена на кардиодинамске параметре и оксидациони стрес у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом	80
4.6. Упоредна анализа ефеката перфузије са испитиваним лековима у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом	90
4.6.1. Разлике пре и после перфузије лековима за $dp/dt \max.$	90
4.6.2. Разлике пре и после перфузије лековима за $dp/dt \min.$	92
4.6.3. Разлике пре и после перфузије лековима за $SLVP$	94
4.6.4. Разлике пре и после перфузије лековима за $DLVP$	95
4.6.5. Разлике пре и после перфузије лековима за $LVdevP$	96

---

4.6.6. Разлике пре и после перфузије лековима за <i>HR</i>	98
4.6.7. Разлике пре и после перфузије лековима за <i>CF</i>	99
4.6.8. Разлике пре и после перфузије лековима за <i>RPP</i>	100
4.6.9. Разлике пре и после перфузије лековима за $O_2^-$	102
4.6.10. Разлике пре и после перфузије лековима за $H_2O_2$	103
4.6.11. Разлике пре и после перфузије лековима за <i>NO</i>	104
4.6.12. Разлике пре и после перфузије лековима за <i>TBARS</i>	106
<b>5. ДИСКУСИЈА</b>	<b>108</b>
5.1. Разлике у кардиодинамским параметрима и параметрима оксидационог стреса између контролне и групе са дијабетесом	109
5.2. Утицај перфузије Зофеноприлом на кардиодинамске параметре и параметре оксидационог стреса у контролној и групи са дијабетесом	114
5.3. Утицај перфузије Валсартаном на кардиодинамске параметре и параметре оксидационог стреса у контролној и групи са дијабетесом	118
5.4. Утицај перфузије Спиринолактоном на кардиодинамске параметре и параметре оксидационог стреса у контролној и групи са дијабетесом	123
5.5. Утицај перфузије Алискиреном на кардиодинамске параметре и параметре оксидационог стреса у контролној и групи са дијабетесом	127
<b>6. ЗАКЉУЧАК</b>	<b>133</b>
6.1. Закључак за главну хипотезу	134
6.2. Закључци за остале хипотезе	134
6.3. Додатни закључци проистекли из истраживања	135
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b>	<b>138</b>

# I УВОД

*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.

Етиолошки разликујемо дијабетес настао превасходно након имунолошки условљене деструкције бета ћелија панкреасних острваца (*тип 1 дијабетеса*), затим дијабетес настао као последица продуженог исцрпљивања бета ћелија праћеног у прво време функционалним, а затим и физичким пропадањем ових ћелија (*тип 2 дијабетеса*). У трудноћи настао дијабетес се означава као *гестациони*, а може настати и након *специфичног* оштећења у различитим ендокринопатијама, инфекцијама, запаљењима, након операције или услед појаве тумора. Далеко најчешћи облик данас (85-95%), а са перспективом да се та преминација повећа и у будућности је тип 2 дијабетеса [1].

Дијабетес је болест растуће инциденце и преваленце. Процењено је да је 2000. године појава дијабетеса у свим старосним групама била 2.8%, односно 171 милион оболелих, а да ће у 2030. ове бројке износити 4.4%, односно 366 милиона. Посебно се истиче пораст броја оболелих преко 65 година и процена је да би до раста могло доћи све и да се заустави пандемија гојазности [2]. Новије процене из 2010. године указују на вероватно убрзавање овог тренда. У 2010. процењена је преваленца на 6.4% адултне популације (20-79 година), односно 285 милиона, а за 2030. предвиђа се пораст на 7.7% адултне популације, односно 439 милиона оболелих [3]. Пораст броја оболелих биће нарочито изражен међу неевропским популацијама које пролазе кроз процесе интензивне промене друштва и прихватања про-западних културолошких норми. [4].

Последице метаболичких поремећаја у дијабетесу захватају све органске системе и доводе до њихове дисфункције. Из тог ралога хроничне компликације дијабетеса представљају највећи изазов и захтевају издвајање највише средстава у лечењу ових болесника. И до 90% средстава је опредељених за ове пацијенте, што је и закључак опсежне студије о трошковима у лечењу дијабетеса тип 2 (енг. *The cost in type 2 diabetes; CODE 2*) [5].

На почетку двадесетог века, оболели од дијабетеса преживљавали су након постављене дијагнозе годину и по до две године, а умирали највише од последица акутних компликација болести. На почетку двадесетпрвог века морбидитет оболелих од дијабетеса је превасходно последица хроничних компликација ове болести, а лечење траје и по неколико деценија Хроничне компликације су последица лоше гликорегулације, али и удруженог дејства коморбидитета [5].

Ренин ангиотензин алдостерон систем (РААС) је сложен и физиолошки веома значајан систем одговоран за хомеостазу електролита, одржавање васкуларног тонуса, али и за модулацију ефеката физиолошких нокси на ткива [6]. Дијабетес карактерише појачана активност РААС [6]. Хипергликемија је најзначајнији метаболички узрочник ткивних промена и активације РААС. Последице активације РААС у срчаном ткиву су оксидациони стрес, фиброза и апоптоза [6, 7].

Системски РААС, испољава ефекте у циркулацији, а ткивни у паренхиму ткива и органа. За развој хроничних компликација дијабетеса од већег значаја је ткивни РААС.

Преко 90% активности РААС испољава се кроз интрацелуларне и екстрацелуларне ефекте ткивног РААС [8, 9]. Системски и ткивни РААС међусобно интерагују, али се и разликују по начину стварања кључних метаболита, а самим тим и реаговању на савремене терапијске опције модуларације РААС [10]. Стога разумевање механизма којима савремена терапијска средства могу утицати на компоненте ткивног РААС представља и потенцијал за допринос унапређивању терапије дијабетеса и компликација које се могу развити, посебно на срцу.

Истраживања на анималном моделу дијабетеса индукованог употребом стрептозотоцина (енг. *Streptozotocin; STZ*). омогућавају аналитичко сагледавање модулаторних механизма током активације ткивног РААС. Срце као ефекторни орган, постављено у оквиру експеримента на модификованом *Lagendorff* апарату, омогућава сагледавање како механичких тако и метаболичких одговора ткива при активацији и селективној блокади елемената ткивног РААС. Поред анализе кардиодинамских параметара и динамике коронарног протока, анализирали смо из венског ефлуента параметре оксидациног стреса и метаболизма *L*- аргинин *-NO* система који су од значаја за развој оштећења срца и крвних судова у дијабетесу, а уједно представљају и значајне параметре преко којих на развој болести утичу лекови који поседују потенцијал да модулирају РААС.

## 1.1. ДИЈАБЕТИЧНА КАРДИОМИОПАТИЈА

Кардиоваскуларна обољења су 2-4 пута чешћа међу оболелим од дијабетеса и водећи су узрок смртности у овој популацији. Оболели од дијабетеса имају већу смртност услед инфаркта миокарда и то четири пута за мушкарце и седам пута за жене. [11,12]. Према резултатима Фрамингамске студије, учесталост срчане слабости код мушкараца оболелих од дијабетеса је двоструко већа у односу на здраву популацију исте доби, а код жена је ова разлика петострука. Разлика уочена у Фрамингамској студији остаје и након статистичке корекције према годинама, липидном статусу, присуству хипертензије гојазности или исхемијске болести срца [13, 14].

Кардиоваскуларно оштећење у дијабетесу поред ефеката на срчани мишић подразумева и убрзану атеросклерозу како великих (макроангиопатске компликације), тако и малих крвних судова (микроангиопатске компликације) [14]. Присуство дијабетеса погоршава срчану слабост узроковану хипертензијом [15] атријалном фибрилацијом [16] и инфарктом миокарда [17, 18], а повећава и величину инфаркта након реперфузије чак и при уједначено побољшаном протоку крви [19, 20].

Колико је значајна сама контрола гликемије у дијабетесу потврђује извештај проспективне студије дијабетеса у Великој Британији (енг. *United Kingdom Prospective Diabetes Study; UKPDS*) у којој се проналази значајна корелација између нивоа гликозилираног хемоглобина А1ц (енг. *Hemoglobin A1c: HbA1c*) и кардиоваскуларног морбидитета [21]. Проблем дефинисања ДКМП је у њеној нераскидивој повезаности са



ефектима коморбидитета који је иначе прате, а ту су и дислипидемија, хипертензија и исхемијске промене. У функционалном смислу ДКМП карактерише се примарно дијастолном дисфункцијом на коју се касније надовезује систолна дисфункција. Развој ДКМП је бржи и интензивнији у присуству артеријске хипертензије [14].

Карактеристике измене ткива у ДКМП су интерстицијална и периваскуларна фиброза, задебљање базалних мембрана капиларне мреже и хипертрофија кардиомиоцита [25-27]. Значајна појава је тзв. *cross linking* између колагених влакана, односно успостављање веза међу колагеним влакнима које мењају конформациске карактеристике и функцију. Ова појава је последица хипергликемије [28] и гликације колагених влакана [29-31].

Маркери синтезе колагена су: проколаген тип 1 карбокси терминални пептид (енг. *procollagen type I carboxy terminal peptide; PICP*), аминотерминални пропептид проколагена тип 1 (енг. *procollagen type I amino terminal peptide; PINP*), карбокси терминални пропептид проколагена тип 3 (енг. *procollagen type III carboxyterminal propeptide; PIIICP*), аминотерминални пропептид проколагена тип 3 (енг. *procollagen type III aminoterminal propeptide; PIIINP*). Маркер динамике екстрацелуларног матрикса је матрикс металопроотеиназа (енг. *matrix metalloproteinase; MMP*) и ткивни инхибитор *MMP* (енг. *tissue inhibitor of metalloproteinase; TIMP*). У дијабетесу је уочен пораст *MMP-9* и пад односа *TIMP/MMP-9* [32].

Премда је хипертрофија миокарда честа у хроничном дијабетесу, посебно типу 2, код анималних модела ДКМП са хипоинсулинемијом, хипертрофија се не развија. У препаратима анималних модела типа 2 дијабетеса налази се повећање трансверзалног пресека кардиомиоцита, док се у моделима типа 1 уочава смањење ове површине [37]. *Fisher* је објавио да је узимајући исечке миокарда током хирургије на отвореном срцу код особа оболелих од дијабетеса и оних који то нису у патохистолошким препаратима уочено задебљање базалних мембрана у капиларима и едем ендотелних ћелија [38]. На аутопсијама се код оболелих од дијабетеса заједно проналазе хипертрофични и атрофични кардиомиоцити [25-27].

## 1.2. ПАТОГЕНЕЗА ДИЈАБЕТИЧНЕ КАРДИОМИОПАТИЈЕ

Присутне су бројне теорије патогенезе ДКМП што довољно говори о томе да не постоји једноставан одговор на ово питање. Оно у чему се сви аутори слажу је да је патогенеза ДКМП мултифакторијална и да се ови механизми међусобно преклапају и прожимају. Једна од предложених подела патогенетских механизма је: 1) поремећај хомеостазе калцијума, 2) активација РААС, 3) повећан оксидациони стрес, 4) поремећај метаболизма супстрата, 5) дисфункција митохондрија [14].

Контрактилност миокарда је у великој мери условљена правилним прометом калцијума унутар ћелије. У миру, калцијум је концентрисан у саркоплазматском ретикулуму (СР) са градијентом  $10^4$  у односу на цитоплазму. По активацији волтажне зависних *L*-тип  $Ca^{2+}$  канала на мембрани калцијум се ослобађа из СР путем

рианоидинских рецептора и доводи до контракције миофиламената. Након контракције долази до преузимања  $Ca^{2+}$  у СР у чему највећу улогу има саркоплазматско ендоплазматска  $Ca^{2+}$  АТПаза (енг. *sarcoplasmic/endoplasmic calcium ATPase*; *SERCA2a*), затим *Na-Ca<sup>2+</sup>* измењивач на сарколеми и сарколемална  $Ca^{2+}$  АТП-аза. У дијабетесу, поремећај настаје управо у преузимању калцијума назад у СР без измена у активности *L*-тип  $Ca^{2+}$  канала. Измењени су сви поменути механизми преузимања, а у експерименталном моделу је показано да прекомерна експресија гена за *SERCA2a* штити миокард од развоја ДКМП [39].

Данас се уочава значај РААС у развоју ДКМП, овај систем представља кључни медијатор у испољавању последица хроничне хипергликемије на ткива [40, 41]. Срце у дијабетесу има повећану експресију *mRNA* за рецептор за ангиотензин два (енг. *angiotensin II*; *ATII*) [42-44]. Последица активације РААС у дијабетичној кардиомиопатији је појачан оксидациони стрес и тиме узроковане измене у активацији гена које воде ка већој фибрози срчаног ткива те апоптози и некрози [45].

Истраживања на животињама пружила су сазнања о кардиопротективним ефектима блокатора РААС. Уочено је и да терапија блокаторима елемената РААС код животиња са спонтаним развојем дијабетеса има кардиопротективни ефекат [49]. У експерименту са дијабетесом индукованим стрептозотоцином протективни ефекат блокаде РААС повезан је са побољшањем преузимања калцијума у СР [46, 47] и смањењем концентрације реактивних кисеоничних једињења (енг. *reactive oxygen species*; *ROS*) слично ефектима антиоксиданаса [48].

Оксидациони стрес настаје када је стварање *ROS* веће од могућности организма да их неутралише. Последица је оксидационо оштећење, које доприноси развоју ДКМП [50, 51]. Реактивне кисеоничне врсте се појачано стварају у дијабетесу и типу 1 и типу 2 [52, 53, 56, 57]. Највећи део *ROS* у дијабетесу се ствара у митохондријама што је потврђено у *in vitro* истраживањима на ендотелним ћелијама [54]. Немитохондријани извори *ROS* су активности ензима никотин-амид динуклеотид фосфат (енг. *nicotinine amide dinucleotide phosphate*; *NADPH*) оксидазе, азот оксид синтазе (енг. *nitric oxide synthetasis*; *NOS*), активност ксантин оксидазе. Повећано стварање *ROS* доприноси развоју ДКМП [58], генератор је апоптозе [56], оштећења дезоксирибонуклеинске киселине (енг. *deoxyribonucleotic acid*; *DNA*) и смањења способности *DNA* репарације. У патогенези ДКМП, *ROS* потенцирају активност протеин киназе Ц (енг. *protein kinase C*; *PKC*), појачано стварање завршних продуката гликације (енг. *advanced glucose end-products*; *AGE*) и повећан флуks глукозе путем редуктазе алдозе [54].

У више истраживања показано је да подстицање антиоксидационе заштите у митохондријама доводи до превенције ДКМП што потврђује значај антиоксиданаса у очувању функције митохондрија у дијабетесу [55, 60, 59]. Наведено намеће закључак да је смањивање стварања *ROS* и појачање антиоксидативне способности кључно за поправљање миокардне функције у дијабетесу. У току развоја дијабетеса у митохондријама се развијају прво функционалне, а затим и структурне промене. Смањује се капацитет за оксидацију [69-72], смањује се експресија гена за оксидативну фосфорилацију, а повећава за  $\beta$ -оксидацију [73, 74]. Ово потенцира настанак супероксид

анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) и смањује ефикасност стварања аденозин три фосфата (енг. *adenosine three phosphate; ATP*). Нарушено је и преузимање калцијума у митохондрије [70]. Премда се број митохондија повећава, ово није праћено повећаним стварањем *ATP* [72, 73]. Побољшање антиоксидационе заштите нпр. у моделима са прекомерном експресијом гена за манган супероксид дисмутазу, каталазу или металотионеин, поништавају ефекте дијабетеса на дисфункцију митохондрија што потенцира значај оксидативног стреса у развоју ДКМП [50, 55, 75].

Карактеристика метаболичких процеса у дијабетесу је смањење метаболизма глукозе и лактата уз повећан метаболизам слободних масних киселина (СМК) [61, 62, 64, 65]. Повећаном коришћењу СМК у дијабетесу доприносе са своје стране повећано присуство СМК, успорен инсулински сигнални пут и активност *PPAR $\alpha$ /PGC-1* сигналног пута, чија активност потенцира такозвани метаболички *switch*. Активација *PPAR $\alpha$ /PGC-1* сигналног пута повећава генску експресију CD 36 и малонил СоА декарбоксилазе што води појачаном преузимању СМК у ћелије. *PPAR $\alpha$*  је пероксизом пролифератор активирајући рецептор алфа (енг. *peroxisome proliferator alpha receptor; PPAR $\alpha$* ), важан нуклеарни рецептор који препознаје присуство СМК, контролише експресију бројних гена и усмерава одговор ћелије на нутритивни статус у организму. *PGC-1* је пероксизом пролифератор гама коактиватор (енг. *peroxisome proliferator gamma coactivator 1*). И поред преусмеравања метаболизма ка употреби СМК, због повећаних концентрација СМК и њиховог преузимања у ћелије расте концентрација СМК интрацелуларно, што ствара услове за испољавање липидне токсичности. Липидни метаболити потенцирају апоптозу што је додатни фактор за развој ДКМП [57]. Услед липидне токсичности активирају се и проинфламаторни сигнални путеви и потенцира инсулинска резистенција [63-68].

### 1.3. ОДНОС УЗРОЧНИКА, МЕДИЈАТОРА И ЕФЕКТОРА У РАЗВОЈУ ДКМП

У покушају дефинисања универзалне патогенезе ДКМП, *Poornima* и сар. 2006. године предложили су сагледавање односа најважнијих узрочника, медијатора и ефектора за кључне догађаје у развоју ДКМП (табела 1). Из овог аналитичког поступка може се уочити значајан степен интеракције кључних метаболичких путева који воде развоју ДКМП.

Табела број 1: Узрочници, медијатори и ефектори у развоју ДКМП [76].

узрочник	медијатор	ефектор	циљни догађај
неестерификоване масне киселине	$\uparrow acyl Co A$	$\uparrow K^+ ATP$ канал	$\downarrow$ промета $Ca^{2+}$
	$\uparrow$ атипични <i>PKC</i> $\uparrow PTEN$	$\downarrow$ активација <i>Akt-1</i>	инсулинска резистенција
	$\uparrow TNF\alpha$	$\uparrow$ церамид	апоптоза миоцита
хиперинсулинемија	<i>PI3K/ Akt-1</i>	$\downarrow GSK-3\beta$ $\uparrow mTOR$	хипертрофија миоцита
	$\uparrow$ МАП киназа	$\uparrow RAS/\uparrow Rho$	$\uparrow$ синтеза протеина
хипергликемија	$\uparrow ROS$	$\uparrow AGE$ $\uparrow PKC$	хомеостаза $Ca^{2+}$
	$\uparrow PARP$	$\uparrow$ хексозамин	контракtilни протеини
	$\downarrow GAPDH$	$\uparrow$ полиолски флуks	протеини матрикса

*PTEN* (енг. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*); *PI3K* –фосфатидил инозитол киназа 3 (енг. *phosphatidil inositol kinas 3*); *Akt1* (енг. *alpha serin/threonin kinase 1*, алфа серин-треонин киназа 1; МАП киназа-митоген активирајуће протеин киназа; *GSK-3 $\beta$* - киназа синтезе гликогена 3  $\beta$  (енг. *glycogen synthesis kinas 3  $\beta$* ); *mTOR*- (енг. *mamarian target of rapamycin*); *PARP*- енг. *poly (ADP ribose) polymerase*;, поли аденозин ди фосфатна полимераза; *ADP* (енг. *adenosine diphosphate*) аденозин ди фосфат; *GAPDH* (енг. *glyceraldehyde phasphat dehidrogenasis*) глицералдеhid фосфат дехидрогеназа.

Слободне масне киселине потенцирају развој инсулинске резистенције, што води у последичну хиперинсулинемију и са тим повезану хипертрофију кардиомиоцита. Слободне масне киселине потенцирају активност атипичне *PKC*, што води активирању инхибитора капа бета киназе (енг. *inhibitor of kapa beta kinas 1; IkB* ). Ова киназа повећава активност нуклеарног фактора *кВ*, стварајући услове за синтезу проинфламаторних медијатора и потенцирање апоптозе, а смањује *PI3K*, чиме се успоравају сигнални путеви активације субстрата инсулинског рецептора и узрокује инсулинска резистенција (ИР) [77,78].

Слободне масне киселине утичу на развој ИР додатно путевима који нису у вези са *PI3K* већ доводе до мање активности алфа серин треонин киназе 1 (енг. *alpha serin threonine kinas 1; Akt-1*). Активирајући *PPAR $\gamma$* , СМК преко *PTEN* умањују активност *Akt-1*. Сигнални пут *PI3K-Akt-1* инхибира *GSK-3 $\beta$*  која узрокује хипертрофију кардиомиоцита. У стању смањене активности *Akt-1* долази до хипертрофије због смањене инхибиције *GSK-3 $\beta$*  [79, 80].

Показано је да хиперинсулинемија доводи до појачане активности *Akt-1*. За овај ефекат значајна је хронична симпатичка активност и сигнални путеви који воде од активације  $\beta_2$  адренергичких рецептора, преко протеин киназе А и калцијумске калмодулин зависне киназе. *Akt-1* стимулише *mTOR* што води појачаној синтези протеина. У стањима када је успорен сигнални пут преко *PI3K*, као што је ИР, овај пут потенцира хипертрофију кардиомиоцита [80]. Хиперинсулинемија може изазивати хипертрофију и *Akt-1* независним путем, преко МАП киназа. Овим путем се потенцира и стварање екстрацелуларног матрикса што доприноси развоју ДКМП. Слободне масне киселине могу потенцирати развој ДКМП и без утицаја на инсулинемију повећавајући присуство

естара ацетил коензима А (енг. *acyl coenzim A: Acyl Co A*) у кардиомиоцитима, што моделира контрактилност отварањем *ATP* зависних  $K^+$  канала, узрокујући скраћивање акционог потенцијала. Ово омета транспорт  $Ca^{2+}$  у саркоплазматски ретикулум и смањује контрактилност [76].

Хипергликемија доводи до појачане оксидације глукозе, што повећава стварање *ROS* које затим доводе до оштећења *DNA* и активације *PARP*. *PARP* са своје стране утиче и на инхибицију глицералдехид фосфат дехидрогеназе – *GAPDH* чиме се метаболизам глукозе усмерава ка алтернативним правцима и повећава стварање завршних продуката гликације-*AGE*, флуks хексозамина и полиола као и активација *PKC*. Интензивно стварање *AGE* води појачаном стварању веза између влакана колагена и смањеној контрактилности. Истовремено се смањује и ослобађање  $Ca^{2+}$  из *CP*, чиме се нарушава еластичност комора и потенцира дијастолна дисфункција. Појачан хексозамински флуks доводи до мање активности *SERCA2a*, што умањује контрактилну способност и релаксацију у дијастоли. Хипергликемија интензивирњем полиолског флуksа доводи до умањене регенерације редукованог глутатиона чиме се потенцира оксидациони стрес, повећава оштећење *DNA* и стварање сорбитол индукованих *AGE*. Наведено води ка појачаној апоптози и већој крутости комора [76]. Активност *PKC* узрокована хипергликемијом повећава стварање екстрацелуларног матрикса и смањује функцију *SERCA2a*, што додатно умањује способност релаксације и потенцира крутост комора [76].

Дијабетична кардиомиопатија се развија у почетку превасходно као дијастолна, а затим и систолна дисфункција. Према литератури, до развоја дијастолне дисфункције на моделу изолованог срца пацова протиче 7 дана (повећање притиска у левој комори на крају дијастоле) до 3 недеље (промена притиска у зиду коморе у јединици времена  $dp/dt$ ) а пуна клиничка слика систолне дисфункције се развија током годину дана. [81]. Овде је значајно нагласити да се умањена способност релаксације, односно повећана крутост комора развија у одсуству хипертрофије миокарда какву иначе видимо код инсулин резистентних ДКМП [87-90]. За развој ових промена у хипоинсулинемијској ДКМП кључна је дисфункција *SERCA2a*, а доприносе јој и смањена активност  $Na^+/K^+$  *ATP*-азе,  $\alpha$  актин и миозин *ATP*-азе, као и измена изотипских облика миозина од  $\alpha$  ка  $\beta$  изооблицима, чиме се смањује контрактилна способност [83-86]. У истраживачким студијама уочено је да међу пацијентима са добро регулисаним дијабетесом 47-75% има елементе дијастолне дисфункције леве коморе [91-93]. Дијастолна дисфункција леве коморе је повезана са слабијом прогнозом и када је латентна, односно када не узрокује клиничке знаке код пацијената [94].

*Borlaug* и сар. су 2011. године указали да је кардиомиопатија са очуваном ејекционом фракцијом препознатљива карактеристика ДКМП и да је најбољи терапијски приступ и даље предмет истраживања [95]. Терапија са инхибиторима ангиотензин конвертујућег ензима (енг. *angiotensin converting enzyme inhibitors; ACEI*) или блокаторима *AT1* рецептора за *AT II* су актуелно први терапијски избор у лечењу ДКМП [96-100].

Повећан оксидациони стрес је уочен у перикардној течности животиња са срчаном слабошћу [101, 102]. Такође, схваћено је да антиоксиданси успоравају развој срчане слабости [103]. Суперокид дисмутаза (енг. *superoxide dismutasis; SOD*), каталаза (енг.

*catalase*; *CAT*), глутатион пероксидаза (енг. *glutathione peroxidase*; *GPx*) и пероксиредоксини чине основну антиоксидациону одбрану у организму, а њихово слабљење може водити оксидационом оштећењу. Код сисара се разликују три изоформе *SOD*: *Cu/Zn SOD* у цитосолу, *Mn-SOD* у митохондријама и екстрацелуларна *SOD*. *Cu/Zn SOD* чини 90% ткивне супероксид дисмутазе.

Када се инфузијом мишевима апликује АТ II, настаје развој оксидационог стреса [104, 105]. Такође, инфузија АТ II доводи и до појачаног стварања колагена тип 1 и 3 и фибронектина у култури фибробласта [106-110]. Ови ефекти су спречени употребом блокатора АТ<sub>1</sub> рецептора, али не и за АТ<sub>2</sub> рецепторе. Реактивне кисеоничне врсте створене након стимулације са АТ II активирају митохондријалне АТФ зависне K<sup>+</sup> канале, што додатно потенцира стварање ROS. Ово се назива ROS индуковано ослобађање ROS [111]. Ефекти АТ II на продукцију колагена се остварују активацијом *TGF-β1*, чија се продукција при стимулацији са АТ II смањује у присуству блокатора АТ<sub>1</sub> рецептора [112].

Следећи у низу фактора значајних за настанак појачане кардијалне фиброзе при стимулацији са АТ II је мембранска *NADPH* оксидаза [113]. Овај ензим је главни извор супероксида у срчаним фибробластима. Мембранска *NADPH* оксидаза појачано ствара ROS услед стимулације АТ II преко АТ<sub>1</sub> рецептора. У даљем току, модулирају се сигнални путеви преко МАПК, *p38* киназе регулисане екстрацелуларним сигналимa (енг. *extracellular Signal Regulated Kinase*; *ERK1/2*) и јанус киназа (енг. *janus kinase*; *JNK*) чиме се активирају процеси апоптозе и настанка хипертрофије. Сигнални путеви преко *ERK1/2* и *JNK* утичу на стварање остеопонтина који промовише синтезу и акумулацију колагена. Са друге стране, АТ II активира и транскрипционе факторе *AP-1* и *NFκB* чијим деловањем настају раније поменути проинфламаторни медијатори [114].

На појачано стварање колагена 1 и 3 након стимулације са АТ II утиче појачана експресија гена за стварање колагена, док на екстрацелуларне концентрације утиче АТ II индуковано смањење активности матрикс металопротеиназе 1 (енг. *matrix metalloproteinase 1*; *MMP-1*) до чега долази због активације ткивног инхибитора металопротеиназе 1 (енг. *tissue inhibitor of metalloproteinase 1*; *TIMP1*), што је посредовано преко АТ II [113]. Са друге стране, за разлику од фибробласта, кардиомиоцити, ендотелне ћелије и кожни фибробласти појачавају активност MMP1 на стимулацију са АТ II [115-117]. Алдостерон подстиче фиброзу миокарда модулирајући оксидациони стрес механизмима који укључују РААС, односно активност АТ II [118].

Постоје бројни докази да повећан оксидациони стрес, који се огледа у хронично повећаним ROS доприноси ремоделовању ткива и развоју ДКМП. Овај процес у фибробластима срца доводи до повећаног стварања колагена и модулиран је РААС-ом, пре свега активношћу АТ II преко АТ<sub>1</sub> рецептора. Митохондрије су доминантни извор ROS, а АТ II стимулише митохондријалну продукцију ROS у срчаним фибробластима и умањује стварање митохондријалне *Mn-SOD* – прве линије антиоксидационе заштите у митохондријама. Из овог разлога се сматра да терапија која умањује активност АТ II или повећава активност *SOD* може допринети превенцији развоја ДКМП [119].

#### 1.4. РЕНИН АНГИОТЕНЗИН АЛДЕСТЕРОН СИСТЕМ

*Tigerstedt* и *Bergman* су открили ренин пре око 100 година [120]. Ренин ангиотензин алдостерон систем је сложен систем који се састоји од низа биоактивних пептида који настају из истог прекурсора - ангиотензиногена. Пептиди настају деловењем више ензима и имају јединствену функцију у разним ткивима [121]. Завршни елемент овог низа, мада и сви претходни имају ткивне ефекте, је стероид алдостерон, који се ствара у надбубрегу, али и другим ткивима, укључујући срце [122-124].

Поред контроле крвног притиска модулацијом тонуса крвног суда, концентрације електролита и воде, РААС у ткивима утиче и на развој хипертрофије и фиброзе што је опсежно испитивано на примеру срца. Системски ефекти РААС одражавају се преваходно на електролите, волумен и тонус крвних судова, док ткивни РААС, поред утицаја на локалне васкуларне структуре, модулацијом оксидативног стреса утиче на стварање екстрацелуларног матрикса, али и покретање процеса фиброзе и апоптозе [125-126].

Ангиотензиноген створен у јетри под утицајем ренина створеног у јукстагломеруларним ћелијама бубрега постаје ангиотензин 1 (АТ I). У циркулацији овај пептид под утицајем ангиотензин конвертујућег ензима (енг. *angiotensin converting enzyme* - ACE), створеног у ендотелним ћелијама плућа постаје АТ II са снажним утицајем на тонус крвних судова, промет воде и електролита, а подстиче и стварање алдостерона у кори надбубрега [126]. Ангиотензин II делује преко АТ<sub>1</sub> и АТ<sub>2</sub> рецептора, који припадају групи рецептора повезаних са Г протеинима. Већина ефеката карактеристичних за АТ II настаје након стимулације АТ<sub>1</sub> рецептора. Ови рецептори се налазе на мембранама, али и интрацелуларно, у епителним ћелијама бубрега. Активацијом АТ<sub>1</sub> рецептора подстиче се ретенција натријума. У надбубрегу, активацијом ових рецептора подстиче се синтеза алдостерона, а у можданом ткиву осећај жеђи, ослобађање антидиуретског хормона и симпатичка активност. Активација АТ<sub>1</sub> рецептора у срцу доводи до фиброзе, хипертрофије, а има и позитивно инотропно и хронотропно дејство. У крвним судовима, ефекат активације АТ<sub>1</sub> рецептора је вазоконстрикција, а дуготрајни ефекти могу изазвати хипертрофију [126].

Медијатори АТ<sub>1</sub> рецептора су бројни интрацелуларни сигнални путеви. Активацију Г протеина и фосфолипазе прати повећање интрацелуларног инозитол три фосфата и калцијума [127-129]. Појачана је и активност PKC, Ras и RhoA, затим тирозин киназна каскада, што све води појачаној активности елемената MAP киназног система, JAK-STAT, p38, ERK 1/2. На крају, појачана је активност транскрипционих фактора као што су AP1, NFκB и STAT, што води појачаној експресији гена одговорних за раст. Синтеза протеина је додатно појачана активацијом mTOR/s6 сигналног пута. У ћелији, активација АТ<sub>1</sub> рецептора потенцира активност NADPH оксидазе, чиме се ствара вишак ROS. Ово води активацији рецептора за епидермални фактор раста и минералокортикоидни рецептор (MR) [130].

Интрацелуларни ткивни АТ II је двојног порекла, са једне стране ствара се од унутарћелијски створених ангиотензиногена, ренина и химаза, а са друге стране бива

након секреције интернализован путем  $AT_1$  рецептора. Синтеза интрацелуларног  $AT II$  у кардиомиоцитима највећим делом је посредована химазама, а не  $ACE$ , зато  $ACEI$  не умањују значајно синтезу интрацелуларног  $AT II$ . У фибробластима са друге стране интрацелуларни  $AT II$  се ствара под дејством ренина и  $ACE$  [9].

Поред  $ACE$  у ткивима се ствара и  $ACE 2$  чији је производ не  $AT II$ , већ  $AT 1-7$ . Овај полипептид има вазодилататорна својства и данас се сматра разлогом за ефикасност  $ACEI$ , што је до скоро приписивано брадикинин-каликреин систему, односно успореној разградњи брадикинина. Ангиотензин 1-7 делује преко  $\Gamma$ -везаног протеинског рецептора *Mas*. Овај рецептор је највише заступљен у мозгу и тестисима, али га има и у срцу, бубрезима и крвним судовима. Овај систем ( $AT1-7-Mas$ ) делује супротно утицају појачане активности  $AT II$  у циљним органима [131].

Мождани РААС модулира ефекте кардиоваскуларног система, хомеостазе течности и електролита, утичући на аутономни нервни систем, осовину хипоталамус-хипофиза, ослобађање вазопресина, осетљивост барорецептора и потребу за сољу. Појачана активност можданог РААС превасходно повећава волумен крви и васкуларни тонус али има утицаја и на когнитивне функције, меморију, осећај бола, сексуално понашање и стрес [132, 133]. Сви елементи РААС се синтетишу у можданом ткиву, укључујући  $AT II$ ,  $ACE 2$ , проренински рецептор,  $AT1-7$ , *Mas* [134-136]. Систем  $AT1-7-Mas$  делује тако што повећава сензитивност барорецептора, смањује артеријску тензију, али утиче и на понашање кроз измену функција хипокампуса [132].

Бубрег је место где се синтетише ренин који се ослобађа у циркулацију. И други елементи РААС се такође синтетишу у ткиву бубрега. У бубрезима РААС има значај и за саму органогенезу овог органа, што је разлог зашто су  $ACEI$  и  $AT_1$  рецепторски антагонисти контраиндиковани у трудноћи. Појачана активност ткивног РААС у бубрезима доводи до повећаног оксидационог стреса, проинфламаторних процеса и подстицања фиброзе. Систем ( $AT1-7-Mas$ ) се синтетише и делује антагонизмом класичном РААС и у бубрезима. Алдостерон поред својих познатих ефеката на хомеостазу електролита додатно делује потенцирајући ефекте  $AT II$  [137].

У ткиву васкуларног зида стварају се ангиотензиноген и  $AT II$  док се ренин једва детектује. Насупрот овоме, преузимање проренина из циркулације је описано у литератури [138]. Ангиотензин II повећава концентрацију интрацелуларног калцијума, што узрокује констрикцију и повећање васкуларног тонуса. Он узрокује и појачано стварање *ROS* у ткиву зида крвног суда. Вишак *ROS* поспешује хипертрофију и инфламацију, а умањује стварање *NO*. Систем  $AT1-7-Mas$  поспешује стварање *NO* а смањује *ROS*. Укупни ефекат на тонус васкуларног зида зависи од односа активности ових супротстављених система [138].

У срчаном ткиву  $AT_1$  рецептори су испољени на кардиомиоцитима, кардијалним фибробластима, али и на симпатичким нервним завршецима [139-141]. Њихова активација испољава се кроз позитивно инотропно дејство и хомеостазу калцијума [142-144].



Стварање интрацелуларних ROS је подстакнуто активношћу AT II. Активацијом рецептора за ендотелни фактор раста (енг. *endotelic growth factor receptor - EGFR*) и минералокортикоидног рецептора (MP) AT II води у хипертрофију [145].

Истежањем индукована хипертрофија миокарда је модулирана активношћу РААС. Овај процес је показан и код анималних модела без AT II или AT<sub>1</sub> рецептора. Утврђено је да је за настанак фиброзе узроковане активношћу срчаних фибробласта потребан стимуланс са кардиомиоцита који ослобађају трансформишући фактор раста бета (енг. *transforming Growth Factor  $\beta$ ; TGF $\beta$* ) [146]. У другом експерименту је уочено да је и директна стимулација фибробласта са AT II могућа [145]. Активност систем AT1-7-Mas превенира настанак хипертрофије код мишева и пацова [147, 126].

#### 1.4.1. УЛОГА ТКИВНОГ РААС У ДИЈАБЕТИЧНОЈ КАРДИОМИОПАТИЈИ

Данас се у жижу научног интересовања, када је у питању патогенеза дијабетичне кардиомиопатије, поставља РААС за који се схватило да представља кључни медијатор у испољавању последица хроничне хипергликемије на ткива [40, 41].

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 и апоптоза [6, 7]. Ова појачана активност се огледа и у ефектима на ткива која нису у вези са створеним AT II нпр. ефекти ренина на ренински рецептор [150].

Ренин у срчаном ткиву је двојног порекла, и из самих ћелија, али и из проренина преузетог у ћелије из циркулације. Ренин у срчаном ткиву је у највећој мери преузет у ћелије из циркулације или добијен из проренина. Синтетише се у минималним количинама [148]. Ренин може настати и у маст ћелијама које су мигрирале у ткиво из циркулације [149]. У дијабетесу концентрација проренина у циркулацији је значајно повећана [151]. Проренин се преузима у ћелије миокарда из циркулације и ово повећање уз нормализацију концентрације ренина је разлог зашто у дијабетесу за разлику од системског AT II чија се концентрација нормализује долази до значајног и дуготрајног повећања ткивног AT II [152]. Проренински рецептор је протеин који након везивања са проренином активира ренин, али има утицаја и на сигналне путеве, нпр. *ERK* 1/2 [151]. Ткивни РААС у срцу синтетишу и кардиомиоцити и срчани фибробласти [9].

Ангиотензин II има директан ефекат на ћелијске сигналне путеве, доводи до хипертрофије кардиомиоцита и пролиферације срчаних фибробласта [81]. Екстрацелуларни AT II регулише артеријски притисак као и хомеостазу електролита и течности док интрацелуларни AT II омогућава трајну активацију РААС, повећавајући генску експресију за ангиотензиноген, ренин и AT<sub>1</sub> рецептор и у кардиомиоцитима и у фибробластима. Ова два система унутар ткивног РААС делују синергистички [153].

Хипергликемија је снажан стимуланс за активацију интрацелуларног РААС [154]. Интрацелуларни AT II корелира са хипергликемијом индукованим оксидационим стресом

и апоптозом кардиомиоцита [155]. У дијабетесу, концентрација интрацелуларног АТ II расте 3,4 пута у односу на здраве, а још двоструко више ако је придружена хипертензија [156]. Након примене електронске микроскопије, имунофлуоресценце и имуноцитохемијских техника утврђено је присуство АТ<sub>1</sub> рецептора у једру, сарколеми и Т тубулима кардиомиоцита [157]. Методом *Western Blot* анализе и конфокалне микроскопије АТ<sub>1</sub> и АТ<sub>2</sub> рецептори виђени су у једру кардиомиоцита [158]. Интрацелуларно, АТ II подстиче активност *NF κB*, повећава концентрацију  $Ca^{2+}$  у цитосолу и једру [158, 159], а по принципу позитивне повратне спреге поспешује и експресију ренина, ангиотензиногена и АТ<sub>1</sub> рецептора у ћелијама [153].

Колико је сложен и до сада недовољно схваћен РААС указује и откриће новог места везивања за АТ II независно од АТ<sub>1</sub> и АТ<sub>2</sub> рецептора које се означава као варијанта неуролизина везаног за мембране. Неуролизин је ендопептидаза које има у цитосолу, митохондријама и плазма мембранама [160, 161]. Стога се може рећи да АТ II поред ендокриних, паракриних и аутокриних, има и интракрине ефекте [162].

*Sing* и сар. 2008. године су у експерименталном моделу дијабетеса индукованог стрептозотоцином показали да је ткивни АТ II значајно повишен већ након 7 дана хипергликемије и да се ово повећање не смањује давањем кандесартана, што указује да је АТ II створен у ћелији, а не интернализован из екстрацелуларног простора. Пораст интрацелуларног АТ II је спречен употребом директног инхибитора ренина - алискирена али не и са *ACEI* бензеприлатом [163]. *Sequat* и сар. су објавили 2011. године рад у коме су на мурином моделу дијабетеса индукованог стрептозотоцином ултразвучном методологијом утврдили развој дијастолне кардиомиопатије после 10 недеља и уочили да се ово може превенирати са све три групе лекова (алискиреном, бензеприлатом и кандесартаном) [164].

#### 1.4.2. ДИЈАБЕТИЧНА КАРДИОМИОПАТИЈА И МОДУЛАТОРИ РААС

У стању хипергликемије у кардиомиоцитима се ствара АТ II превасходно интрацелуларно дејством ренина и химаза, а у фибробластима срца ткивни РААС се ствара дејством ренина и *ACE* и интрацелуларно и екстрацелуларно [165, 166].

Инхибитори *ACE* стога делују превасходно на ткивни РААС створен из фибробласта. Антагонисти АТ<sub>1</sub> рецептора не блокирају у потпуности ткивне ефекте интрацелуларног РААС [155, 167]. Апликовани интрацелуларно, за разлику од екстрацелуларне примене, блокатори АТ<sub>1</sub> рецептора смањују инфлукс екстрацелуларног  $Ca^{2+}$ , што је карактеристично за стимулацију са АТ II [168]. Повећање концентрације интрацелуларног АТ II доводи до хипертрофије ћелија и ово није супримирано екстрацелуларном применом блокатора АТ<sub>1</sub> рецептора [169].

У последње време се увиђа да досадашњи начини блокаде РААС, инхибиторима *ACE* и блокаторима АТ<sub>1</sub> рецептора, нису довољно ефикасни у супресији ткивног РААС, а овакви медикаменти треба да представљају окосницу у терапији хроничних компликација

дијабетеса [170]. За разлику од класичних блокатора РААС, директни инхибитор ренина показује ефекат и на интрацелуларни и екстрацелуларни ткивни РААС [155, 171].

Инхибитори *ACE*,  $AT_1$  рецепторски антагонисти, директни инхибитори ренина и блокатори минералокортикоидног рецептора остварују протективни ефекат на развој кардијалне хипертрофије или ремоделовања након инфаркта и у дозама које немају системски ефекат [172, 173].

Комбинована употреба модулатора РААС није без ризика. У децембру 2012. године велика међународна група објавила је резултате по којима додавање директног инхибитора алискирена класичним блокаторима РААС није довело до бољитка, напротив, студија је прекинута због повећаног кардиоваскуларног морталитета. Комитет европских медицинских агенција за медицинске производе је 2014. ограничио употребу комбинације РААС модулатора на основу резултата више спроведених студија [174-177]. Механизам који доводи до ових нежељених ефеката постаје важно истраживачко питање. Жеља нам је да овим истраживањем допринесемо схватању акутних ефеката модулатора РААС у дијабетичној кардиомиопатији.

Сматрало се да се протективни ефекти инхибитора *ACE* и блокатора  $AT_1$  остварују ефекте делимично и механизмима независним за РААС, као што су каликреин-кинин систем и активација пероксизом пролифератор активирајућег рецептора  $\gamma$  (енг. *peroxisome proliferator activating receptor gamma*; *PPAR*  $\gamma$ ) [178-181]. У новије време уочава се значај ткивног *ACE 2* чији производ ангиотензин (1-7) испољава вазодилаторна својства преко *NO*. Инхибитори *ACE*, блокадом *ACE1*, омогућавају да његов супстрат АТI постаје у већој мери доступан алтернативном *ACE2* чији производ није вазоконстрикторни АТ II већ вазодилаторни АТ (1-7). Вазодилаторни ефекат преко *NO* није блокиран инхибитором брадикинина, већ инхибитором АТ (1-7) [182-184]. Имајући ово у виду, као и чињеницу да се при хроничној примени *ACEI* количина створеног АТ II не смањује (ефекат химаза), инхибитори *ACE* се могу сматрати стимулаторима РААС, односно стимулаторима вазодилаторног пута РААС преко АТ (1-7). Данас се *ACEI* разликују по молекуларној структури, односно присуству одређених група. Сулфхидрилну групу има зофеноприл, дикарбоксилатну има рамиприл, а фосфатну групу фосиноприл. Зофеноприл и фосиноприл имају израженије ткивно везивање од рамиприла. Већина инхибитора *ACE* ефекте остварује након естерификације у јетри, а зофеноприл може да делује на ткивни РААС и без естерификације. [185]

Зофеноприл је липофилни инхибитор *ACE* са сулфхидрилном групом (-SH). Активни метаболит након естерификације у јетри или ткивима је зофеноприлат. И сам зофеноприл остварује ефекте на ткива са *IC50%* (концентрација која омогућава 50% инхибиције циљног ензима) од 59 *nM* за срце пацова. У истом ткиву *IC50%* за зофеноприлат је 0.9 *nM*. Зофеноприл је супериоран у доносу на остале инхибиторе *ACE* по способности за ткивно везивање што је између осталог последица липофилности. У ткиву срца након 60 минута инхибира се 91% *ACE*, а након једног дана ова инхибиција се одржава на 46% [185].

Ефекти алдостерона на ткива могу бити геномски и негеномски [186]. У експерименту на изолованом срцу пацова перфузија и спиронолактоном и алдостероном води у акутно негеномско појачање контрактилности, што се додатно појачава комбинованом перфузијом [186]. Са друге стране, алдостерон пре свега потенцирањем ефеката АТ II преко АТ<sub>1</sub> рецептора доприноси развоју кардијалне фиброзе [187]. И неки нежељени ефекти алдостерона на миокард остварују се преко минералокортикостероидног рецептора (MR) [188]. Алдостерон се и директно синтетише у ткивима [189]. У дуготрајној блокади РААС са инхибиторима АСЕ и блокаторима АТ<sub>1</sub> рецептора долази до бега алдостерона, односно до његовог пораста и поред великих доза и/или комбинованог дејства [190]. Наведено чини испитивање акутних и хроничних ефеката спиронолактона на дијабетичну кардиомиопатију изазовним.

### 1.5. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ ДИЈАБЕТЕСА

Развијени су различити анимални модели којима се тежи што бољој имитацији природних процеса, што је посебно значајно ако се подражава развој типа два дијабетеса који настаје процесима који подразумевају инсулинску резистенцију и постепено исцрпљивање и пропаст  $\beta$  ћелија панкреаса. Свеобухватну анализу постојећих модела дао је *Sirinvasan* 2007. године [191].

Најчешће се за анималне моделе користе глодари. Доступни су, отпорни, брзо се разножавају, цена је сразмерно ниска. Проблем може представљати особина нпр. пацова да обнављају  $\beta$  ћелије панкреаса (имају такозвани *turn over* од 30% док је код људи после 20-е године проценат  $\beta$  ћелија које се обнављају испод 1%).

Хируршки модели се заснивају на ресекцији дела панкреаса чиме се смањује могућност стварања инсулина. Предност је што остали органи нису изложени дејству хемијских нокси. Проблем је релативно захтевна хируршка техника и постоперативно праћење те развој дигестивних сметњи због смањене егзокрине способности панкреаса.

Хемијски индуковани модели настали су употребом алоксана или стрептозотоцина. Предност ових модела је селективно оштећење бета ћелија панкреаса док су алфа и делта ћелије неоштећене. Чињеница да преостаје део функционалних бета ћелија омогућава дуготрајније праћење животиња без додатка инсулина. Наравно употребом већих концентрација активне супстанце може се добити модел са апсолутном инсулинопенијом и тада је за продужавање преживљавања животиња неопходно додати егзогени инсулин. Правилним дозирањем хемијске супстанце избегава се кетоза и последични морталитет. Ово је релативно једноставна и сразмерно јефтина метода. Нажалост, овакав модел не може да имитира развој дијабетеса проистекао из инсулинске резистенције и преоптерећења бета ћелија. Овај дијабетес се може изгубити због способности бета ћелија код пацова да се обнављају - мање је стабилан. Додатно, у хемијском моделу не можемо избећи дејство хемикалија и на друге органске системе. Степен хипергликемије код различитих животиња са истом дозом хемијске супстанце може да варира [191].

Нутритивно индуковани модели добро опонашају развој дијабетеса повезаног са гојазношћу и поступним исцрпљивањем бета ћелија. Избегава се токсичност хемијских

супстанци. Мана оваквих модела је потреба да се дијабетес развије кроз дужи временски период [191].

Спонтани дијабетични модели настају као последица генетског фактора, а дијабетес се развија асоцирајући на тип 2 дијабетеса. Животиње се добијају укрштањем у сродству. Ово су теже доступни и скупи модели. Тешко се одржавају. Код ових модела мера се и појединачна генска специфичност која стоји иза развоја дијабетеса, што се разликује од хетерогености у развоју дијабетеса тип 2 код људи [191].

Трансгени/*knock out* (КО) модели омогућавају испитивање појединачних мутација *in vivo*. Могућа је анализа појединачних елемената у иначе сложеној и хетерогеној патогенези. Мана је изузетна сложеност и велики трошкови стварања и одржавања оваквих модела. Тешко су доступни [191].

### 1.5.1. ИНДУКЦИЈА ДИЈАБЕТЕСА УПОТРЕБОМ СТРЕПТОЗОТОЦИНА

Стрептозотоцин је синтетски нитрозоуреидо гликопиранозни дериват изолован из ферментата гљиве *Streptomyces acchomogenes*. У основи то је цитостатски антибиотик из групе нитрозоуреја. Активна супстанца је 2-деокси-2[(метилнитрозоамино)-карбонил]амино]-Д-глукопираноза. Изгледом је бледожути прах који се чува на ниској температури. Стрептозотоцин се раствара у стерилном расхлађеном цитратном пуферу рН 4.5. Може се давати 150 *mg/kg* код мишева или 80 *mg/kg* код пацова. Дијабетес се развија постепено уобичајено након 4 дана код мишева, а 7 код пацова [192]. Други аутори као *S. Lenzen* наводе да се дуготрајна хипергликемија развија након 48-72 часова [193]. Гликемије се најчешће крећу 180-500 *mg/dl* [192]. Проблем може представљати спонтани опоравак од дијабетеса или чак развој инсулинома. Чести су и тумори бубрега и јетре. У пракси најчешће се користи доза од 60 *mg/kg* за пацове чиме се постиже хипергликемија која траје недељама. *Pellegrino* је 1998. предложио комбинацију са 120 *mg* никотинамида и 60 *mg* стрептозотоцина чиме се постиже стабилан дијабетес који интензитетом асоцира на тип 2 дијабетеса [194].

Стрептозотоцин улази у ћелије које испољавају *GLUT 2* рецепторе. Ово је уочено након верификованих оштећења и других органа који испољавају *GLUT 2*, као што су бубрези и јетра [195]. Механизам дејства је алкилизација унутар ћелије и оштећење *DNA*. У покушају поправке у ћелији се прекомерно активира поли *ADP*-рибоза полимераза (енг. *poly ADP ribose polymerase; PARP*), што доводи до смањења целуларног *NAD* и последичног губитка *ATP*. Енергетски дефицит води бета ћелије у некрозу [196]. За ефекте стрептозотоцина у мањој мери заслужни су и донирање *NO* и појачано стварање *ROS* [197].

Након 1 сата од давања стрептозотоцина настаје прва хипергликемијска фаза узрокована хипоиснулинемијом због смањене синтезе инсулина. Морфолошки, у овој фази се види вакуолизација ћелије, дилатација ендоплазматског ретикулума, смањен простор Голџијевог апарата и смањен број секреторних гранула испуњених инсулином. У следећој фази, која наступа за 4-8 часова, настаје хипогликемија. Ова фаза настаје због

флукса инсулина из руптурираних гранула и ћелија. Може трајати неколико часова. Неопходно је обезбедити исхрану или глукозу. Након 48 часова, настаје трајна хипергликемија. Ћелије *Langenhansen*-ових острваца које нису бета ћелије нису оштећене.

У анималним моделима дијабетеса анализиране су промене функције срца *in vivo* (ехокардиографски) и *ex vivo* (модели са изолованим срцем). Постоје разлике зависно од тога ради ли се о моделу који опонаша тип 1 или тип 2 дијабетеса. Разлике су приказане у табели број 2.

**Табела број 2:** Разлике у параметрима срчане функције код неких анималних модела типа 1 и типа 2 дијабетеса [14].

	Тип 1 <i>diabetes mellitus</i> -a					Тип 2 <i>diabetes mellitus</i> -a			
	<i>OVE</i> 26	<i>NOD</i>	<i>BB</i> пацови	<i>STZ</i>	<i>Alloxan</i>	<i>ob/ob</i>	<i>db/db</i>	<i>ZF/ZDF</i>	<i>GK</i>
срчана фреквенца			↓						
сistolна функција	↓	↓		↓	↓		↓	↓	
дијастолна функција	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
хипертрофија леве коморе						↑			↑
$\pm dp/dt$		↓	↓	↓		↑	↑		
инотропни одговор					↓	↓			
толеранција на исхемију			↓	↓	↑		↓	↓ ↑	↑

Стрелице на горе и на доле указују на повећање односно смањење. Код *ZF/ZDF* у категорији толеранције на исхемију постоје различити резултати код раличитих група аутора; *OVE* 26: Животиње са прекомерном експресијом калмодулина у бета ћелијама; *NOD* енг. *nonobese diabetic*; негојазни дијабетични; *GK Goto-Kakizaki* пацови.

Аутори су уочили смањење срчане функције код дијабетичних животиња, изузев у почетку код анималних модела који опонашају тип 2 дијабетеса. Ово се објашњава појачаним волуменом плазме и симпатичком активношћу узрокованих делом и гојазношћу [198, 199]. За моделе који опонашају тип 2 дијабетеса уочено је да смањеној способности опоравка од исхемије миокарда доприносе и инсулинска резистенција, која је у основи болести, и развој хипергликемије.

У истраживању са анималним моделима дијабетеса треба узети у обзир и разлике у односу на хумани дијабетес чему доприносе разлике у срчаној фреквенци, концентрацији хормона те отпорност пацова на развој атеросклерозе која је веома значајна за срчано оштећење код људи. И поред разлика анимални модели су од изузетног значаја за разумевање природе болести, деловања лекова и стицања искустава која ће касније бити примењена на хуманој популацији.

## 1.6. OKSIDACIONИ СТРЕС

Аеробни организми имају способност да користе молекуларни кисеоник за оксидацију глукозе у митохондријама чиме се хемијска енергија веза између молекула угљеника преноси на молекуле *ATP* и даље користи за одржавање живота]. Током процеса редуковања молекула  $O_2$  до  $H_2O$  губи се део електрона (0.1-0.5%) транспорваних преко митохондријалног транспортног ланца (енг *electron transfer chain* - *ETC*) и везује за молекуле  $O_2$  стварајући супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) или се везује за друга једињења која садрже кисеоник стварајући слободне радикале [200].

Слободним радикалима називамо атоме или једињења која садрже један или више неспарених електрона у спољашњој орбити. Ово су веома реактивна једињења која затим реагују са свим органским молекулима, што доводи до пролазног или трајног оштећења функције ћелије [201]. Око 5% удахнутог кисеоника се трансформише у *ROS* [202].

Предоминација оксидационих процеса и ставарања слободних радикала које не прати повећана антиоксидациона активност означава се као оксидациони стрес.

Нису само слободни радикали одговорни за развој оксидационог стреса. Одређена једињења, тзв. нерадикалски агенси (који немају неспарен електрон у спољашњој орбити) могу довести до оксидационог стреса. Заједно ове две групе једињења се означавају као *ROS*. [201]. Табеле број 3 и 4.

**Табела број 3:** ROS - слободни радикали

Назив	Ознака
Супероксид анјон радикал	$O_2^{\cdot-}$
Реактивни азот моноксид	$NO \cdot$
Хидроксилни радикал	$OH \cdot$
Хидроксипероксидни радикал	$\cdot HO_2^{\cdot}$
Алоксилни радикал	$RO \cdot$
Пероксилни радикал	$ROO \cdot$

**Табела број 4:** ROS- нерадикали

Назив	Ознака
Водоник пероксид	$H_2O_2$
Хидроксипероксид	$ROOH$
Хипохлораста киселина	$HOCl$
N-хлорамин	$RNHCl$

Порекло *ROS* може бити ендогено и егзогено. Најзначајнији ендогени извор је *ETC* у митохондријама, активност *NADPH* синтетазе, ксантин оксидазе, *NOS*, ензими

цитохрома *P-450* који су значајни и у метаболисању лекова и других ксенобиотика. У егзогене изворе убрајају се повећано искориштавање кисеоника, озон, јонизујуће зрачење, пушење и јони тешких метала [203, 204].

У физиолошким условима *ROS* имају значајну улогу у процесима преноса сигнала који посредују у одржавању васкуларног тонуса и у процесима као што су промена облика ћелије и регенеративни процеси. У циклусу слободних радикала описују се фаза иницијације, пропагације и терминације. *Иницијација* је фаза када слободни радикали губе или добијају електрон од других молекула чиме им мењају својства. *Пропагација* настаје када се ланчано ова промена преноси на околне структуре, а *терминација* подразумева престанак активности слободних радикала настао сударом два слободна радикала или активношћу антиоксидационе заштите.

Оксидациони стрес се данас сматра основом настанка многих хроничних незаразних обољења, као што су дијабетес, карциноми, неуролошки поремећаји, хипертензија, атеросклероза, исхемијско реперфузиона повреда, акутни респираторни дистрес синдром, астма, хронична обструктивна болест плућа, идиопатска фиброза плућа [206]. Узрок бројности и разноликости ових паталогских процеса је што *ROS* “нападају” све органске молекуле. Липидна пероксидација је покретач оштећења функције и структуре мембрана. Оксидационо оштећење *DNA* потенцира карциногенезу, појаву аутоимунских и неуродегенеративних обољења: Мењају се ефекти транскрипционих фактора и регулаторних гена [205]. Оксидација сулфхидрилних група доводи до функционалних и структурних промена у протеинима [207, 208]. Оксидационо оштећење мембранских липида као и рецептора и ензимских протеина доводи и до појачане пропустљивости ћелијске мембране [209]. Оксидирани липопротеини мале густине (енг. *low density lipoproteins; LDL*) мењају своје особине и потенцирају атерогенезу. Поремећај сигналних путева води појачаној активности проинфламаторног *NFκβ*, затим протеин активирајућег фактора 1 (енг. *protein activating factor 1; AP-1*), хипоксијом индукованог фактора 1 (енг. *hypoxia induced factor 1; HIF-1*). Активирање транскрипционих фактора путем *ROS* значајно утиче на измену функције ћелија и укупно ремоделовање ткива [205].

Реактивност различитих *ROS* се значајно разликује. Тако  $O_2^{\cdot -}$  не утиче значајно на аминокиселине и нуклеинске киселине, али дисмутацијом  $O_2^{\cdot -}$  настају  $H_2O_2$  и  $OH^{\cdot}$  који су значајно реактивнији. Важни за ефекте *ROS* су и њихова концентрација и дужина задржавања у ткивима. Супероксид и хидроксил радикал имају кратко полувреме трајања процењено  $T_{1/2}$   $10^{-6}$  и  $10^{-9}$  секунде. Притом, налазе се и у ниској концентрацији -  $10^{-10}$  и  $10^{-15}$  М. Са друге стране,  $H_2O_2$  има дуже време  $T_{1/2}$   $10^{-5}$  [211]. Хидроксил радикал реагује са већином биомолекула укључујући липиде, аминокиселине и нуклеинске киселине [210]. Супероксид може да реагује и са протеинима који садрже *4Fe-4S* групе, а водоник пероксид оксидира сулфхидрилне ( $-SH$ ) и метионинске ( $-SCH_3$ ) групе на протеинима. У реакцији  $O_2^{\cdot -}$  и *NO* настаје веома реактивни пероксинитрит (*ONOO-*). Овај веома токсични радикал може да дифундује у околно ткиво знатно даље у односу на друге радикалске врсте, изазивајући притом опсежну деструкцију прво функција, а затим и структуре ћелија. (референца)



### 1.6.1. ОДНОС ХИПЕРГЛИКЕМИЈЕ, ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА И РАЗВОЈА ДИЈАБЕТИЧНЕ КАРДИОМИОПАТИЈЕ

Водећи узрок настанка компликација у дијабетесу је потенцирање ефеката оксидационог стреса хипергликемијом [212-216]. Нису сва ткива једнако подложна поремећају функције и ремоделовању узрокованом хипергликемијом. Ткива која су подложна развоју компликација узрокованих дијабетесом немају способност да смање улазак глукозе у ћелије у хипергликемији јер не користе глукозни транспортер завистан од инсулина. Механизам којим се то даље преноси карактерише један заједнички узрочник, а то је појачано стварање  $O_2^{\cdot -}$  у митохондријама. Супероксид се ствара у митохондријама и због повећања супстрата – глукозе, али и због умањене антиоксидационе активности, пре свега *Mn SOD*. За оболеле од дијабетеса значајна је и синтеза  $O_2^{\cdot -}$  узрокована *NADPH* оксидазом која је активирана ткивним РААС чија је активност појачана у условима хипергликемије [217, 218]. Овако створен супероксид активира *PARP*, нуклеарни фактор чија активност повећава присуство *ADP*-рибозе која затим инхибира глицер алдехид фосфат дехидрогеназу (енг. *glyceraldehyde phosphat dehydrogenasis; GAPDH*). Овај догађај активира пет кључних патогенетских механизма за развој дијабетичних компликација: Појачану активност полиолског и хексозаминског пута, повећано стварање *AGE* и повећану експресију њихових рецептора (енг. *receptor for advanced glycated endproducts: RAGE*) и појачану активност *PKC*. Поред овога, хипергликемија доводи и до смањене активности два важна антиатерогенетска ензима ендотелне азот оксид синтазе (енг. *endothelial nitic oxide synthase; eNOS*) и простаглицин синтетазе. За разумевање и лечење хроничних компликација значајно је да појачана експресија гена одговорних за патогенезу хроничних компликација заостаје и након уклањања хипергликемије - ово се означава као гликемијска меморија [219].

### 1.6.2. АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА

Антиоксиданти су супстанце које у малој концентрацији могу да механизмом конкуренције инхибирају или одложе оксидацију других материја [81].

Антиоксидациона заштита може бити примарна, секундарна и терцијерна. Примарна, у којој антиоксиданти прекидају ланац ширења *ROS* донацијом електрона. Секундарна антиоксидативна заштита се још назива и превентивна са улогом да врши секвестрацију јона прелазних метала, уклањање *ROS* и пероксида да се не би у реакцији са јонима прелазних метала стварале нове *ROS*. Терцијални или репараторни антиоксиданти учествују у уклањању оштећених молекула пре него што се накупе и доведу до оштећења ћелија [81].

Антиоксиданти могу деловати превенирањем настанка *ROS*, неутрализацијом односно отклањањем *ROS* пре него што оштете друге молекуле као и поправком или *de novo* синтезом оксидисаних молекула [81].

Подела антиоксиданаса може бити према месту деловања на интраћелијске, мембранске и екстраћелијске. Место деловања је условљено тиме да ли су то хидрофилни или липофилни молекули. Једна од подела антиоксиданаса је и на ензимске односно неензимске. Ензимски учествују у отклањању  $O_2^-$ , пероксида, еоксида, али и репараторним процесима. Ензими као што су *SOD*, *CAT*, *GPx*, глутатион редуктаза, тиол ди сулфид оксидоредуктаза и пероксиредоксини делују на месту настанка *ROS*. Три основна типа *SOD* су *Mn SOD* са доминантним дејством у митохондријама, *Cu/Zn SOD* која делује у цитосолу и екстрацелуларна (енг. *extracellular superoxide dismutase*; *EC SOD*) са преваходним дејством у екстрацелуларном матриксу [217]. Са друге стране ензими који учествују у репарацији и уклањању оксидисаних супстрата су ендо и егзонуклеазе, *DNA* лигазе и полимеразе [219]. Неензимски антиоксиданти лимитирају оксидационе процесе. Липосолубилни, попут витамина А и Е, затим коензима *Q*, флавоноида, бета каротена и фенола делују у липидној фази ћелијске мембране. Хидросолубилни, попут витамина Ц, глутатиона, церулоплазмина, трансферина и мокраћне киселине делују у воденом медијуму [220]. Транспортни и металопотеини као што су албумин, трансферин, феритин и церулоплазмин спадају у неензимске антиоксиданте. Они садрже  $Fe^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  а њихова улога је у спречавању учешћа ових јона у стварању *ROS* [220].

### 1.7. L-АРГИНИН NO СИСТЕМ

Слој ендотелних ћелија који облаже унутрашњост крвних судова својом метаболичком активношћу је покретач бројних хомеостатских процеса и патолошких промена. Унутрашњост срчаних шупљина облаже ендокард са истим својствима [11].

Измењена функција ендотела/ендокарда у дијабетесу је у највећој мери последица хипергликемијом узрокованог оксидационог стреса [221, 222].

Улога ендотела у регулацији васкуларног тонуса је изузетно значајна. Уочено је присуство молекула који регулише вазодилатацију, тзв. ендотелног фактора релаксације (енг. *endotel derived relaxation factor*; *EDRF*). За *EDRF* се данас зна да је *NO*.

Азот оксид има један неспараени електрон па се понаша и као слободни радикал. Ствара се у ћелијама ендотела/ендокарда из *L*-аргинина под утицајем ензима азот оксид синтаза (енг. *nitric oxide synthase*; *NOS*). Створени *NO* утиче на релаксацију глатких мишића васкулатуре преко цикличног гуанозин монофосфата, али има и бројне друге ефекте. Прекурсор *NO* је *L*-аргинин, семиесенцијална аминокиселина. Транспорт *L*-аргинина из екстрацелуларне средине у цитоплазму врши се високоафинитетним за супстрат  $Na^+$ -катјонским аминокиселинским транспортером. Овај транспортни систем, за сада регистрован у три изоформе, није завистан од ацидобазног статуса и концентрације натријума и омогућава релативно константну концентрацију *L*-аргинина у цитоплазми.

Реакција трансформације *L*-аргинина у цитрулин и *NO* у присуству ензима *NOS* је једини извор *NO* у организму. За активност *NOS* потребни су следећи кофактори: *NADPH*, флавин аденин динуклеотид (енг. *flavin adenin dinucleotide; FAD*), флавин аденин мононуклеотид (енг. *flavin adenin mono nucleotide: FMN*), тертрахидробиоптерин (*H<sub>4</sub>B*) [223].

Азот оксид је липофилан гас и то му омогућава да слободно дифундује кроз мембране. Поред паракриних *NO* испољава и аутокрине ефекте. Утиче на ангиогенезу, инхибицију агрегације тромбоцита, има улогу сигналног молекула у бројним системима и регулише бројне биолошке одговоре: индукцију и активацију гена, апоптозу, стимулацију имунског одговора [223]. Када је ослобођен из ћелија попречно-пругасте мускулатуре, у интеракцији са ријанодинским рецепторима или посредством *cGMP*, утиче на ослобађање калцијума из саркоплазматског ретикулума, па тиме и мишићну надражљивост и контрактилност, што је веома значајно за срчану функцију. Може функционисати као неуротрансмитер, утиче на метаболизам глукозе, зарастање рана, регулацију перисталтике и функционисање репродуктивних ткива [224].

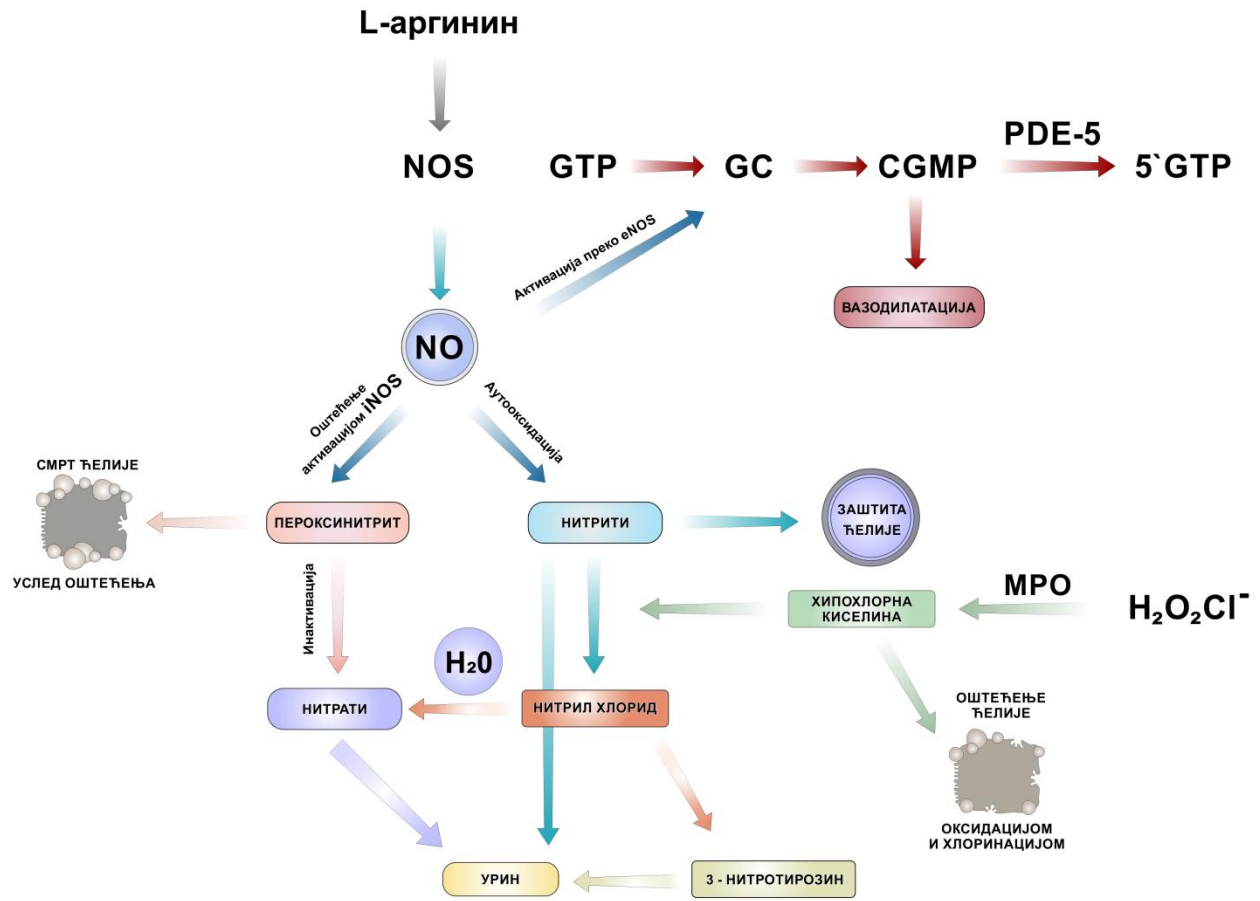
Ензим *NOS*, који омогућава реакцију у којој се из *L*-аргинина добија *L*-цитрулин уз ослобађање *NO*, испољава се у три изотопска облика. Два су конститутивна неуронска азот оксид синтазе (енг. *neuronal nitric oxide synthase; nNOS*) и *eNOS*. Индуцибилна азот оксид синтаза (енг. *inducible nitric oxide synthase; iNOS*) активира се у различитим нефизиолошким стањима нпр. у сепси, али и продуженој хипергликемији. Она се доминантно налази у леукоцитима и макрофагима. Конститутивне *NOS* стварају физиолошке количине *NO* са  $T_{1/2}$  од 3-5 секунди. Индуцибилна форма *NOS* постиже концентрацију створеног *NO* у року од неколико сати. Ефекат овако створеног *NO* траје много дуже, и до 36 сати. Активност индуцибилне *NOS* је транскрипционо детерминисана док су активности конститутивних *NOS* регулисане концентрацијом калцијума и калмодулина [225, 218].

Након стварања *NO* може активирати солубилну гуанинил циклазу (енг. *soluble guaninil cyclase; sGC*) након чега долази до стимулације настанка цикличног гуанозин монофосфата (енг. *cyclic guanosin monophosphate: cGMP*). Ефекти овога су вазодилатација, смањена агрегација тромбоцита и трансмисија у неуронима. Други пут метаболичке судбине *NO* подразумева реакцију са  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  са којима ствара нову групу реактивних азотних једињења (енг. *reactive nitric species; RNS*) која доводе до негативних ефеката на протеине, липиде, угљене хидрате, *DNA* и *RNA* [226, 227]. Аутоксидацијом *NO* стварају се *RNS*: азот диоксид ( $NO_2$ ) и азот триоксид ( $N_2O_3$ ). У реакцији *NO* и *ROS* ствара се и високореактивни  $ONOO^-$  који за разлику од *NO* прави иреверзибилан ефекат. Веома токсични  $ONOO^-$  покреће каскаду у којој се стварају липидни пероксиди, што води оштећивању мембрана. И његови метаболити хидроксил радикал  $\cdot OH$  и азот диоксид радикал  $NO_2\cdot$  су снажни активатори липидне пероксидације [218]. Најважнији пут резградње *NO* је реакција којом се у контакту са оксихемоглобином ствара нитрат ( $NO_3^-$ ) За одстрањивање *NO* значајни су и реверзибилно везивање за деоксихемоглобин и реакција са  $O_2^-$  [228].

У дијабетесу се јавља смањена биорасположивост *NO* [229]. За ефекте *NO* у дијабетесу пре свега је значајна активност *eNOS*, која је под утицајем сигналних путева који мењају концентрацију калцијума. Инфламаторна каскада преко активiranог *NFκβ* утиче на ендотелну дисфункцију и метаболизам *NO*. Хронична инфламација је карактеристика дијабетеса и у корелацији је са квалитетом гликорегулације у дијабетесу и развојем хроничних компликација болести. West и сар. су 2008. године објавили рад у коме, поред навода да је у дијабетесу смањена укупна синтеза и биорасположивост *NO*, као кључни фактор наводе увећану реактивност *NO* и *ROS* (пре свега  $O_2^{\cdot-}$ ). Хипергликемијом узроковани пораст  $O_2^{\cdot-}$ , уз измењени метаболизам *NO* потенцира реакцију *NO* са  $O_2^{\cdot-}$  која је 30-50 пута бржа од система за уклањање  $O_2^{\cdot-}$  путем *SOD*. Ово за полсецицу има стварање веома активног *ONOO^{\cdot}*. West и сар. такође примећују да надокнада *L*-аргинина опоравља смањену концентрацију и биорасположивост *NO* и неутралише метаболичке процесе који воде хроничним компликацијама дијабетеса [230].

Ефекти *NO* у зиду крвог суда су пре свега везани за активацију *sGC* и акумулацију *cGMP*, чиме се преко активације *cGMP*-зависних киназа узрокује вазодилатација. Ефекторни механизам је активација калијумских канала, чиме се мембрана доводи у стање хиперполаризације и последичне вазодилатације [231]. Два механизма могу довести до активације калијумских канала [231]. Један је описан преко *cGMP*, а други је *cGMP* независан и укључује редуковање тиола Следећи механизам којим делује *NO* је утицај на синтезу вазодилататорног простагландина *PGI\_2*. Интеракција *NO* и *ROS*, а посебно стварање *ONOO^{\cdot}* води у преминацију антагонисту тромбоксана *A2* (енг. *thromboxan A2*; *TXA\_2*) над простагландином *I\_2* (енг. *prostaglandine I\_2*; *PGI\_2*), што потенцира агрегацију и протромботичке ефекте. Вазоактивни ефекти *NO* остварују се и инхибицијом ензимског система цитохрома *P450* који су укључени у метаболизам арахидонске киселине и стварање бројних вазоактивних супстанци у ендотелу [231]. Вазоконстрикторни молекули из ендотела су *AT II* и ендотелин, док су вазодилатори простагландин, брадикинин, *NO* и ендотел зависни хиперполаришући фактор. Пораст концентрације брадикинина води већој биорасположивости *NO* [231]

Инхибитори *ACE*, који између осталог доводе до пораста брадикинина, сматрају се лековима првог избора код лечења хипертензије и кардиомиопатије у дијабетесу [231,232]. Апоптоза је један од значајних механизма ткивног ремоделовања у дијабетесу. Ефекти *NO* на апоптозу зависе од концентрације и могу бити антиапоптотички и проапоптотички. Антиапоптотички су процеси нитрозилација и инактивација каспаза 1, 3 и 8, затим активација *p53* и *heat shock* протеина која смањује активност каспазе 9 а појачавају активности антиапоптотичких фактора означених као *Bcl-2* и *Bcl-XL* (енг. *B cell lymphoma*; *Bcl*). Ова активност смањује ослобађање цитохрома *Ц* из митохондрија и активирање сигналног пута преко *cGMP* и *cGMP* зависних киназа, што води ка смањеној активности каспаза и смањеној активацији *p38*. Са друге стране, проапоптотички механизми су узроковани цитотоксичким ефектима. Смањење респирације доводи до смањења мембранског потенцијала митохондрија и отварања пора након чега излазак цитохрома *Ц* покреће каскаду. *NO* се директно везује за сигналне протеине у унутрашњости ћелија [233, 234]. Метаболизам *NO* је приказан на слици број 1.



Слика број 1: Метаболизам NO [234].

# II

## Циљеви студије

## 2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

1. Индуковати дијабетес код *Wistar albino* пацова интраперитонеалном применом 60 mg/kg стрептозотоцина.
2. Одредити кардиодинамске параметре и коронарни проток на изолованом срцу пацова код здравих и дијабетичних животиња након 4 недеље хипергликемије.
3. Одредити параметре оксидационог стреса и метаболита азот монооксида у коронарном ефлуенту код здравих и дијабетичних животиња након 4 недеље хипергликемије.
4. Утврдити разлике у кардиодинамским параметрима након селективне блокаде елемената РААС код здравих и дијабетичних животиња након 4 недеље хипергликемије.
5. Утврдити разлике у параметрима оксидационог стреса и метаболита азот монооксида након селективне блокаде елемената РААС код здравих и дијабетичних животиња након 4 недеље хипергликемије.

## 2.2. ГЛАВНА ХИПОТЕЗА

Хронична хипергликемија доводи до дијастолне и у мањој мери систолне дисфункције миокарда и повећане ригидности коронарних крвних судова.

## 2.3. ОСТАЛЕ ХИПОТЕЗЕ

1. Модулатори РААС остварују различит утицај на миокард и крвне судове код здравих и дијабетичних животиња.
2. Модулатори РААС имају већи утицај на миокард и крвне судове на срцу пацова којима је индукован дијабетес.
3. Директни инхибитор ренина Алискирен има већи утицај на срца пацова којима је индукован дијабетес од инхибитора АСЕ Зофеноприла и АТ1 рецепторског антагониста Валсартана.
4. Највећи утицај на метаболизам *L*-аргинин/*NO* система има инхибитор АСЕ-Зофеноприл.
5. Највећи утицај на метаболите оксидационог стреса има блокатор АТ1 рецептора – Валсартан.
6. Блокатор минералокортикостероидног рецептора - Спиринолактон повећава метаболите оксидационог стреса у коронарном ефлуенту.

# III

## Материјал и методе



### 3.1. МАТЕРИЈАЛ

У овом истраживању за потребе аналитичког одеђивања параметара оксидативног статуса за припрему пуфера и перфузионих раствора коришћени су комерцијални реагенси који задовољавају критеријуме *pro analysis* квалитета.

#### 3.1.1. СЕТ РЕАГЕНСА НЕОПХОДНИХ ЗА ПРИПРЕМАЊЕ *KREBS HENSENLEIT*-ОВОГ ПЕРФУЗИОНОГ РАСТВОРА

Натријум хлорид ( $NaCl$ , 27.216 g/4L), Калцијум хлорид ( $CaCl_2$  (anh), 1.117 g/4L), Калијум хлорид ( $KCl$ , 1.4g/4L), Калијум дихидроген фосфат ( $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.0644 g/4L), Натријум бикарбонат ( $NaHCO_3$ , 8.36g/4L, *glukoza* ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ , 8.8 g/4L), Магнезијум сулфат ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.636 g/4L), *MERCK*.

#### 3.1.2. СЕТ РЕАГЕНСА ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ИНДЕКСА ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ (*TBARS*)

2-тиобарбитуратна киселина (*TBA*,  $C_4H_4N_2O_2S$ ), *Mr* 144.15 *SIGMA*; Натријум хидроксид ( $NaOH$ ) *Mr* 40, 00 *MERCK*.

#### 3.1.3. СЕТ РЕАГЕНСА ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ВОДНИК ПЕРОКСИДА ( $H_2O_2$ )

Калијум хидрогенфосфат дихидрат ( $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) *Mr* 214, 23 *MERCK*, 37% Хлороводонична киселина ( $HCl$ ),  $X=1.19gcm^{-3}$ , *Mr* 36.5 *MERCK*;  $Na_2EDTA$ , *Mr* 372,24 *MERCK*; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (*NBT*,  $C_4O_3N_4O_6$ ), *Mr* 817.6 *SIGMA* Желатин, *MERCK*.

#### 3.1.4 СЕТ РЕАГЕНСА ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИДНОГ АНЈОНСКОГ РАДИКАЛА ( $O_2^{\cdot-}$ )

ТРИС (трис хидроксиметил аминотетан,  $C_4H_{11}NO_3$ ), *Mr* 214.23 *MERCK*, Нитротетразолијум плаво хлорид (*NBT*,  $C_4O_3N_4O_6$ ) *Mr* 817.6 *SIGMA*, 37% Хлороводонична киселина ( $HCl$ ),  $X=1.19gcm^{-3}$  *Mr* 36.5 *MERCK*,  $Na_2EDTA$ , *Mr* 372,24 *MERCK*; Желатин *MERCK*

### 3.1.5 СЕТ РЕАГЕНСА ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ АЗОТ ОКСИДА У ФОРМИ НИТРИТА

Сулфанилна киселина (4-амино-бензо-сулфонска киселина,  $C_6H_7NO_3S$ ),  $Mr$  173.19 SIGMA; Амонијум хлорид ( $NH_4Cl$ ),  $Mr$  53.49 MERCK; Натријум нитрит ( $NaNO_2$ ),  $Mr$  69 MERCK; N-(1-нафтил)-етилендиамид дихидродехидрат (NEDA,  $C_{12}H_{15}C_{12}N$ ),  $Mr$  259.18 SIGMA; Боракс ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ),  $Mr$  381.4 SIGMA; 85% ортофосфорна киселина ( $H_3PO_4$ ),  $X=1.685\text{ gcm}^{-3}$  MERCK.

## 3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ

### 3.2.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ ДИЈАБЕТЕСА ИЗАЗВАН ХЕМИЈСКОМ МЕТОДОМ ПОМОЋУ СТРЕПТОЗОТОЦИНА

За изазивање *diabetes mellitus*-а код експерименталних животиња изабрали смо хемијску методу са употребом стрептозотоцина помоћу које добијамо код животиње стабилну хипергликемију у дужем периоду. Ефекат се постиже деструкцијом дела бета ћелија панкреаса тако да је дијабетес хипоинсулинемијски. Изабрали смо модел у коме се користи 60 mg/kg стрептозотоцина зато што је актуелно најпопуларнији метод међу истраживачима јер очекивано омогућава стабилну више недељну хипергликемију без развоја тешког метаболичког поремећаја.

### 3.2.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА

Кардиодинамске параметре и квалитет коронарне ауторегулације испитивали смо на моделу изолованог срца код *Wistar* албино пацова по модификованој методи *Oscara Lagendorffa*. Модел изолованог срца по *Lagendorff*-у познаје две варијанте. Прва, у којој је проток кроз васкуларно корито константан док је притисак променљива величина. И други, у коме је притисак у васкуларном кориту константан, а проток променљива величина. Имајући у виду да се у интактној циркулацији перфузиони притисак одржава константним у нашем експерименту определили смо се за модел у коме се остварује константан проток у васкуларном кориту док је притисак променљива величина. Са жељом да истражимо посматране параметре у различитим условима оксигенације и напрезања ткива, мерења су вршена на перфузионим притисцима од 40, 60, 80, 100 и 120 cm H<sub>2</sub>O.

## 3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Све активности са животињама током експеримента биле су у складу са Правилником о раду са експерименталним животињама и одобрене од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу.

### 3.3.1. ИЗАЗИВАЊЕ ДИЈАБЕТЕСА КОД ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ЖИВОТИЊА ХЕМИЈСКОМ МЕТОДОМ

Истраживање је обухватило пацове, *Wistar* соја, мушког пола, старости 8 недеља, просечне телесне масе 180-200 грама. Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима у металним кавезима са изменама светлости и таме на 12 сати. Температура је била подешена на  $22 \pm 1$  степена Целзијусове скале, влажност ваздуха 50%. Вода и уобичајена лабораторијска исхрана *ad librum*. Пре индукције дијабетеса постојао је адаптациони период од две недеље.

Дијабетес је индукован након 12-очасовног гладовања давањем  $60 \text{ mg/kg}$  Стрептозоточина раствореног у  $1 \text{ ml}$   $0.05 \text{ M}$  раствора цитратног пуфера *PH* 4.5 убрзо након вађења из фрижидера. Администрација је урађена интраперитонеално у дорзалом положају у каудални део абдоминалне шупљине након премазивања места убода повидон јодом. Употребили смо стерилну иглу  $25 \text{ G}$ . Гликемија преко  $11.1 \text{ mmol/l}$  дуже од 24 часа након дате терапије (очекивано после 48-72 часа) сматрала се доказом за постојање дијабетеса. Гликемије су биле одређиване након пункције репне вене. Дијабетичне животиње биле су надаље чуване при истим условима следеће 4 недеље.

### 3.3.2. ЖРТВОВАЊЕ ЖИВОТИЊА И УЗИМАЊЕ УЗОРКА КРВИ

Непосредно пре жртвовања експерименталне животиње су добијале анестезију. Изабрали смо краткотрајну етарску анестезију као ефикасну методу уз ограду да би дуготрајна могла довести до срчане слабости и угрозити експеримент. Жртвовање је вршено цервикалном дислокацијом. Маказама су пресецање структуре врата и брзо се након тога сакупила крв ради потребних анализа.

### 3.3.3. ПРИПРЕМАЊЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПО МОДИФИКОВАНОЈ LAGENDORFF МЕТОДИ

Након жртвовања отворан је абдомен, пресечена дијафрагма са лева на десно те отворен грудни кош дуж мамиларне линије. Док су извођене претходно наведене радње срце је поливано расхлађеним физиолошким раствором ( $+4^\circ\text{C}$ ). Ово је рађено како би се срце што дуже одржало у релативној хомеостази. По отварању перикарда на врху срца приступа се крвним судовима на бази срца, они се пресецају, срце се вади из грудне дупље и одмах урања у физиолошки раствор расхлађен на ( $-4$  до  $-10^\circ\text{C}$ ). Ова такозвана „физиолошка клешта“ смањују метаболичке процесе у миокарду на минимум. Генерално, максимално се покушава да се цео процес препарације изолованог срца и постављање на модификовани систем по *Lagendorff*-у изведе за 2-3 минута како би се што мање утицало на метаболичке процесе у срцу. Након што је срце уроњено у ледени раствор, уклањају се сви делови са базе срца изузев аорте преко које ће се вршити ретроградна перфузија. У овако препарисану аорту поставља се канила за ретроградну перфузију па се овакав препарат поставља на модификовано постоље за изоловано срце по *Lagendorff*-у. Следеће

се врши дисекција митралних залистака кроз претходно проширен отвор плућних вена како би се притисак у десној комори довео на нулу и онемогућио његов утицај на коронарну циркулацију односно чиме се искључује сваки утицај на коронарну циркулацију који не зависи од функције леве коморе. Овим путем у леву комору се такође уводи балон од латекса у коме се налази раствор без мехурића који је повезан за сензор притиска (*transducer BS4 73-0184, Experimentia Ltd, Budapest, Hungary*), а чиме се континуирано региструју жељени кардиодинамски параметри. Апаратура по *Lagendorff*-у којом се испитују кардиодинамски и параметри коронарне циркулације на изолованом срцу:

Систем цеви у којем се постиже жељени перфузиони притисак, са помоћним системом цеви за гасификацију раствора, инфузију супстанци које испитујемо, као и тако званог *Water Jacket*-а који елиминише разлику у температури просторије и температуре раствора. Воденог купатила помоћу кога се одржава изотермичност, односно одржава температура физиолошког раствора на 37 °C. Резервоара запремине 4 литра за *Krebs Hensenleit*-ов раствор којим се врши перфузија изолованог срца. Боца у којој се држи смеша за гасирање физиолошког раствора а која садржи кисеоник и угљендиоксид у односу 95%  $O_2$ :5%  $CO_2$ . Помоћу ове смеше се одржава физиолошки парцијални притисак ових гасова у перфузионом раствору и путем негативног притиска одређује смер тока раствора. Инфузиона пумпа којом се врши администрација жељених супстанци у аортну канилу. Електростимулатор којим се постиже константна фреквенца, а тиме обезбеђује регуларнији и дужи рад препарата изолованог срца. Након постављања изолованог срца на *Lagendorff* систем врши се стабилизација препарата око 30 минута на константном перфузионом притиску од 60 *cm H<sub>2</sub>O*.

Испитивање функционалности коронарне циркулације, односно испитивање опсега њеног ауторегулаторног ранга, вршено је прво при притиску од 60 *cm H<sub>2</sub>O*, затим је смањен перфузиони притисак на 40 *cm H<sub>2</sub>O*, а затим и подизан на 80, 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O*. Сваки пут при промени перфузионог притиска препарат је стабилизован 5 минута након чега би се одређивао проток, али и други тражени кардиодинамски параметри. Када је у питању регистровање протока у функцији промене константног перфузионог притиска добијена крива омогућава одређивање опсега перфузионих притисака у којима коронарне артерије одржавају приближно исти проток односно остварују ауторегулацију протока кроз коронарно васкуларно корито и миокард.

Кардиодинамски параметри које испитујемо: максимална брзина промене притиска у јединици времена кроз зид леве коморе ( $dp/dt \max$ ), минимална брзина промене притиска у јединици времена кроз зид леве коморе ( $dp/dt \min$ ), притисак у левој комори током систоле (енг. *sistolic left ventricle pressure; SLVP*), притисак у левој комори током дијастоле (енг. *diastolic left ventricle pressure; DLVP*), срчана фреквенца (енг. *heart rate: HR*), су мерени софтверски посредством сензора који је уведен у леву комору. Коронарни проток (енг. *coronary flow; CF*) је одређиван флоуметријски.

Параметри: развојни притисак у левој комори *LVdevP* и производ фреквенце и притиска на зид леве коморе *RPP* (енг. *rate pressure product*) су израчунати према формулама.

$$LVdevP = SLVP-DLVP \text{ и } RPP = (HR * LVdevP)/1000$$

Истраживање је спроведено у Лабораторији за експерименталну кардиоваскуларну физиологију Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу.

### 3.3.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ГРУПЕ ЖИВОТИЊА:

1. Здраве животиње пре и после перфузије са Зофеноприлом  $1.5\mu M$
2. Дијабетичне животиње пре и после перфузије са Зофеноприлом  $1.5\mu M$
3. Здраве животиње пре и после перфузије са Валсартаном  $1\mu M$
4. Дијабетичне животиње пре и после перфузије са Валсартаном  $1\mu M$
5. Здраве животиње пре и после перфузије са Спиринолактоном  $0.1\mu M$
6. Дијабетичне животиње пре и после перфузије са Спиринолактоном  $0.1\mu M$
7. Здраве животиње пре и после перфузије са Алискиреном  $1\mu M$
8. Дијабетичне животиње пре и после перфузије са Алискиреном  $1\mu M$

Изабране концентрације агенаса одређене су на основу доступне литературе и претходних експеримената. Групе су се састојале од по 12 животиња.

## 3.4. АНАЛИТИЧКЕ МЕТОДЕ

Параметри оксидативног стреса и *L*-аринин *NO* система су одређивани спектрофотометрички из коронарног ефлуента у Лабораторији за експерименталну кардиоваскуларну физиологију Медицинског Факултета Универзитета у Крагујевцу. Концентрација *TBARS* је изражавана у  $\mu M$  а осталих параметара у  $nM$  због разлике у укупној концентрацији која је у случају *TBARS* много већа.

### 3.4.1. ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИД АНИОН РАДИКАЛА ( $O_2^{\cdot-}$ )

Приликом одређивања концентрације  $O_2^{\cdot-}$  коришћена је особина  $O_2^{\cdot-}$  да се у реакцији са нитро тетразолијум плавим (енг. *nitro tetrazolium blue*; *NTB*) ствара нитроформозан плаво. Пре употребе есејне смеше раствор се гасира азотом током сат времена. Есејна смеша се састоји од  $0.1mM$  *EDTA*, *NTB*,  $50mM$  *TRIS-HCL* пуфера ( $pH= 8.6$ ),  $0.1mM$  *NBT*,  $0.1mg/ml$  желатина. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћен је чист *Krebs-Hensenleit*-ов раствор. Спектрофотометријско мерење се врши при таласној дужини  $\lambda=550nm$ .

### 3.4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ ИНДЕКСА ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ (*TBARS*)

Одређивање индекса липидне пероксидације рађено је индиректном методом, а базирано на стварању реактивних продуката при реакцији са тиобарбитуратном

киселином (енг. *thiobarbituric acid reactive substances; TBARS*). Ми смо се определили да резултат добијемо на основу мерења производа малонилдиалдехида (*MDA*) са тиобарбитуратном киселином (енг. *thiobarbituric acid TBA*). У епруветама су помешани  $800\mu\text{L}$  коронарног венског ефлуента и  $200\mu\text{L}$   $0.05\text{M NaOH}_2$ . Спектрофотометријско мерење се врши при таласној дужини  $\lambda=530\text{nm}$ . Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћен је чист *Krebs-Hensenleit*-ов раствор.

### 3.4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ ВОДОНИК ПЕРОКСИДА ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  се одређује након оксидације фенол црвеног коју у присуству  $\text{H}_2\text{O}_2$  катализује ензим пероксидаза из рена (енг *Horse Radish Peroxidase HRPO*). Добијено једињење се спектофотометријски одређује на таласној дужини  $\lambda=610\text{nm}$ . Као слепа проба, уместо коронарног венског ефлуента, коришћен је чист *Krebs-Hensenleit*-ов раствор. У епрувете се ставља  $200\mu\text{L}$  коронарног венског ефлуента и  $800\mu\text{L}$  непосредно направљеног раствора фенол црвеног који садржи  $140\text{ mM NaCl}$ ,  $10\text{ mM}$  калијум фосфатног пуфера ( $\text{pH}=7$ ),  $5.5\text{ mM D+}$  глукозе и  $0.28\text{ mM}$  фенол црвеног. Потом се додаје *HRPO* (1:20)  $10\mu\text{L}$ . Након боравка на собној температури 10 мин. подеси се  $\text{pH}$  на 12 помоћу  $1\text{ M NaOH}$ . Концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  у узорку који се испитује добија се на основу калибрационе криве претходно добијене мерењем узорака познате концентрације.

### 3.4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ НИТРИТА

Количина ослобођеног *NO* у коронарном венском ефлуенту се процењује индиректним методом – одређивањем нитрита захваљујући чињеници да се *NO* у реакцији са кисеоником претвара у нитрит у еквимоларном односу. Одређивање нитрита је доступно за разлику од директног мерења *NO*. Метода мерења нитрита се у биохемијском смислу заснива на реакцији нитрита са *Griess*-овим реагенсом чиме се добија диазо-комплекс који даје раствору љубичасту боју. Након стабилизације боје по додавању *Griess*-овог реагенса (5 мин) резултат се добија након спектофотометријског мерења на таласној дужини  $\lambda=550\text{nm}$ . Концентрација нитрита у узорку који се испитује добија се на основу калибрационе криве претходно добијене мерењем узорака познате концентрације. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћен је чист *Krebs-Hensenleit*-ов раствор.

### 3.4.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Од параметара дескриптивне статистике коришћени су средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (енг *standard deviation SD*), минимална и максимална вредност. Провера нормалности дистрибуције података извршена је применом Колмогоров-Смирнов теста.

Поређење зависних варијабли извршено је применом анализе варијансе за понављана мерења (*post hoc Bonferroni*). За поређење независних група коришћена је анализа варијансе у 1. правцу (*post hoc Tukey*). У случају поређења две независне групе статистичка значајност између група је утврђивана применом Студентовог т-теста за независна обележја. Статистички значајна разлика процењивана је на минималном нивоу од  $p < 0,05$ . Комплетна статистичка анализа података извршена је помоћу комерцијалног статистичког софтвера *SPSS statistics 18* (САД).

# **IV**

# **РЕЗУЛТАТИ**



#### 4.1. ЕФЕКТИ ХИПЕРГЛИКЕМИЈЕ УЗРОКОВАНЕ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ИЗОЛОВАНОМ СРЦУ ПАЦОВА

Након 4 недеље хипергликемије праћене и потврђене дневником гликемија група којој је изазван дијабетес имала је мању телесну масу и масу срца, приказано у табели број 5. Укупно је и однос масе срца према маси тела био мањи у овом моделу дијабетичне кардиомиопатије.

**Табела број 5:** Поређење масе тела, масе срца и њиховог односа (маса срца\*1000/маса тела) између контролних и дијабетичних животиња. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

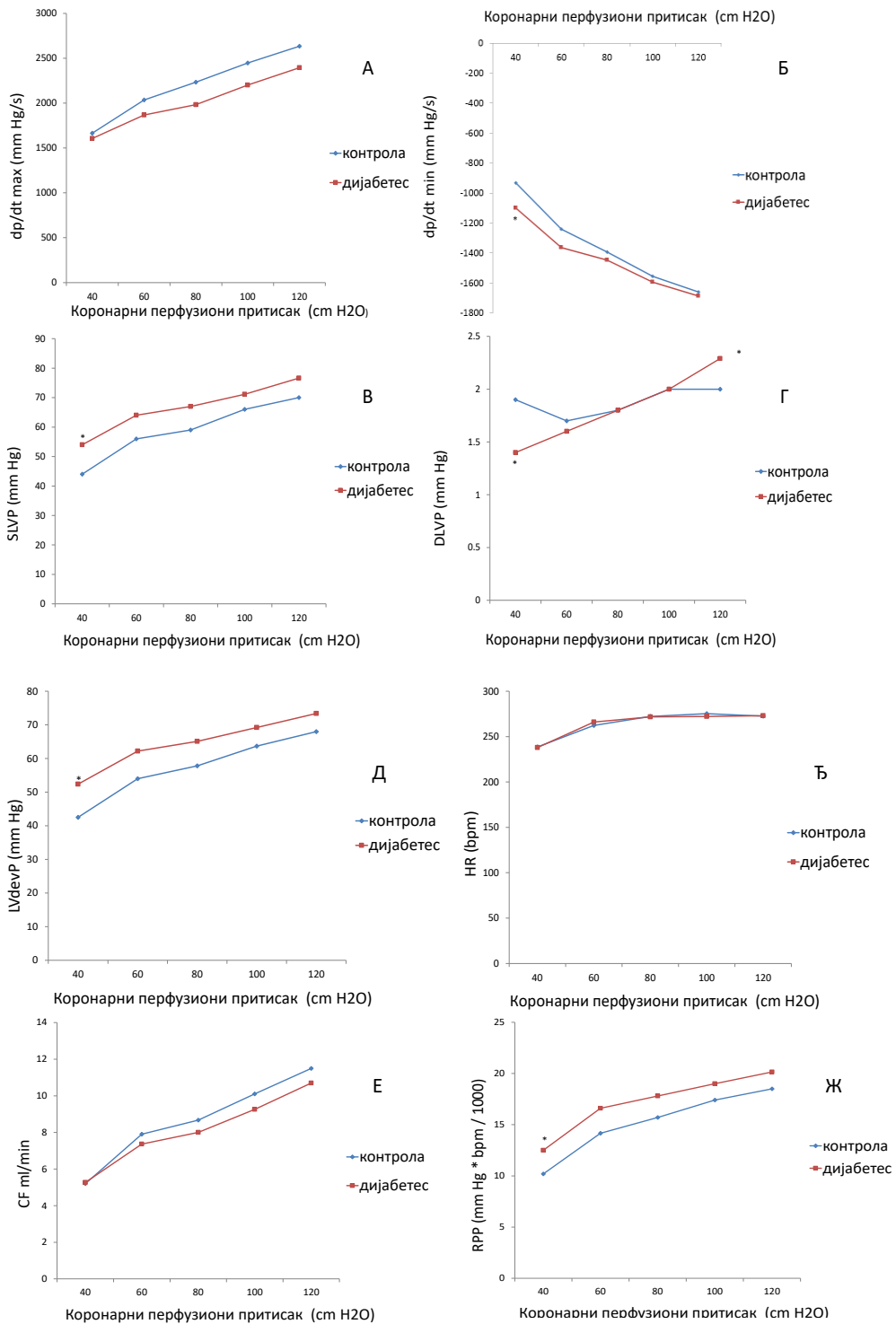
Групе	маса срца	маса тела	однос
контрола	1.22±0.24	219.00±17.09	5.55±0.79
дијабетес	0.95±0.14	191.51±25.17	5.04±0.87
значајност	p<0.05	p<0.05	p<0.05

Испитивање максималне брзине промене притиска у зиду леве коморе ( $dp/dt \max$ ) није указало на значајне разлике између контролних и дијабетичних животиња. Параметар расте са порастом коронарног перфузионог притиска ( $CPP$ ) али нешто спорије код дијабетичних животиња: Графикон број 1 А.

Брзина смањивања притиска у зиду леве коморе  $dp/dt \min$  је на најмањем коронарном перфузионом притиску (који представља хипотензивне, хипоксичне услове) била значајно већа код дијабетичних животиња. Ова се карактеристика губи са порастом  $CPP$ . Параметар расте у обе групе са порастом  $CPP$ . Табела број 6 и графикон број 1 Б.

**Табела број 6:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на  $dp/dt \min$  ( $mm \text{ Hg/s}$ ) код контролних и дијабетичних животиња. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	$CPP$ ( $cm \text{ H}_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
$dp/dt \min$ $\bar{x} \pm SD$	40	-933.50±214.48	-1099.48±301.87*	p<0.05
	60	-1239.93±202.79	-1364.17±307.12	н.с.
	80	-1393.80±266.00	-1448.05±328.71	н.с.
	100	-1556.92±285.62	-1594.82±408.38	н.с.
	120	-1659.74±287.72	-1686.91±404.97	н.с.



**Графикон број 1:** Утицај стрептозотоцином индукованог дијабетеса на кардиодинамске параметре изолованог срца пацова.

И систолни притисак у левој комори је био статистички значајно већи при најнижем *CPP* што се касније губи. Обе криве се међају паралелно при повећању *CPP*. Табела број 7 и графикон број 1 В.

**Табела број 7:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на *SLVP* (*mm Hg*) код контролних и дијабетичних животиња. (*p* – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
<i>SLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	44.46±7.59	53.74±12.73*	p<0.05
	60	55.77±8.45	63.80±13.34	н.с.
	80	59.64±9.79	66.93±13.68	н.с.
	100	65.71±10.49	71.18±14.77	н.с.
	120	70.12±10.31	76.64±14.76	н.с.

Дијастолни притисак у левој комори је на *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* значајно нижи код пацова којима је индукован дијабетес што се постепено изједначава са порастом перфузионог притиска да би при супранормалном *CPP* 120 *cm H<sub>2</sub>O* (који репрезентује хипертензију и механичко оптерећење на зиду леве коморе) био статистички значајно већи него код контролне групе. Табела број 8 и графикон број 1 Г.

**Табела број 8:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на *DLVP* (*mm Hg*) код контролних и дијабетичних животиња. (*p* – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
<i>DLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	1.92±1.58	1.37±0.66*	p<0.05
	60	1.70±1.07	1.59±0.79	н.с.
	80	1.81±1.06	1.81±0.85	н.с.
	100	2.02±1.29	1.98±1.04	н.с.
	120	2.05±1.06	2.29±1.07*	p<0.05

Развојни притисак у левој комори (*LVdevP*) добијен као разлика систолног и дијастолног притиска поступно је растао са порастом *CPP*. Све време био је нешто виши у дијабетичној групи али је статистичка значајност уочена само при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 9 и графикон број 1 Д.

**Табела број 9:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на  $LVdevP$  ( $mmHg$ ) код контролних и дијабетичних животиња. ( $p$  – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
$LVdevP$ $\bar{X} \pm SD$	40	42.53±9.95	52.36±16.89*	p<0.05
	60	54.07±11.71	62.21±13.54	н.с.
	80	57.83±12.79	65.12±18.86	н.с.
	100	63.69±13.68	69.20±20.00	н.с.
	120	68.08±13.59	73.45±20.14	н.с.

Фреквенца срчаног рада ( $HR$ ) се није разликовала међу групама. Графикон број 1 Ђ. Коронарни проток ( $CF$ ) је поступно растао са повећањем  $CPP$ , нешто спорије у дијабетичној групи али без уочене статистички значајне разлике. Графикон број 1 Е.

Производ фреквенце и притиска ( $RPP$ ) добијен је из вредности срчане фреквенце и развојног притиска у левој комори. Овај параметар указује на напрезање зида леве коморе. При поређењу контрола и срца дијабетичних животиња уочен је паралелан пораст вредности параметра са порастом  $CPP$  с тим да су вредности код дијабетичних срца биле нешто више а статистички значајно више само при  $CPP$  40  $cm H_2O$ . Табела број 10 и графикон број 1 Ж.

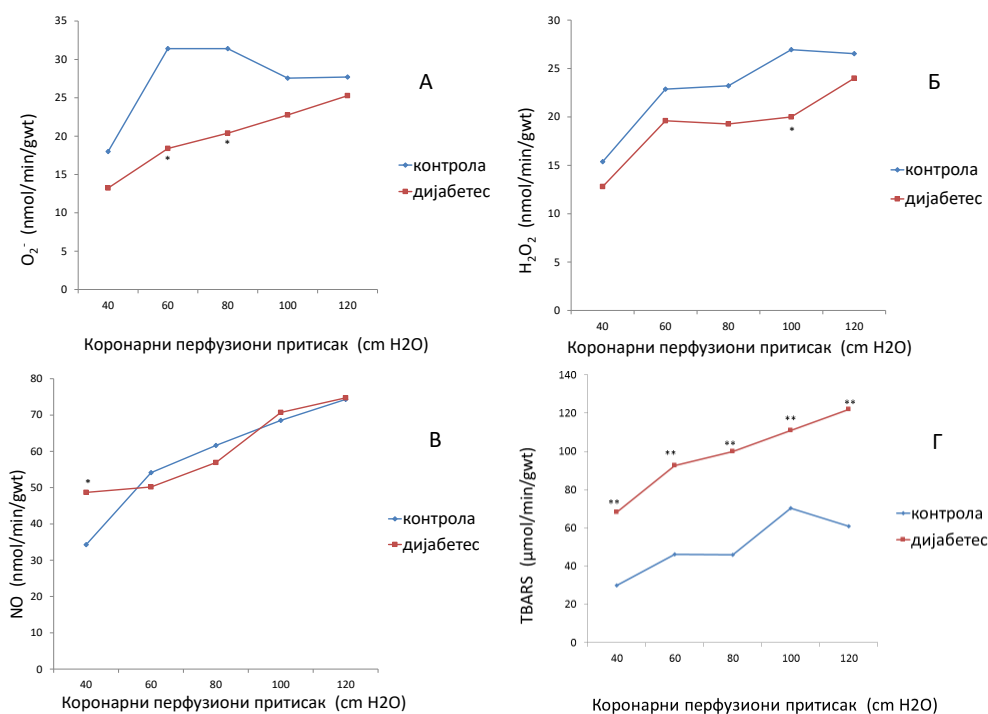
**Табела број 10:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на  $RPP$  ( $mmHg \cdot bpm/1000$ ) код контролних и дијабетичних животиња. ( $p$  – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
$RPP$ $\bar{X} \pm SD$	40	10.22±2.83	12.50±4.29*	p<0.05
	60	14.16±3.39	16.61±5.43	н.с.
	80	15.73±3.69	17.80±5.95	н.с.
	100	17.41±3.60	18.95±6.24	н.с.
	120	18.51±3.66	20.15±6.37	н.с.

У дијабетичној групи  $O_2^-$  је измерен нижи уз значајну разлику при  $CPP$  60 и 80  $cm H_2O$ . Табела број 11 и графикон број 2 А.

**Табела број 11:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на  $O_2^-$  ( $nmol/min/gwt$ ) код контролних и дијабетичних животиња. ( $p$  – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
$\frac{O_2^{\cdot -}}{\bar{x} \pm SD}$	40	18.08±16.93	13.24±4.37	н.с.
	60	31.42±17.31	18.39±6.05*	p<0.05
	80	31.46±12.69	20.38±8.03*	p<0.05
	100	27.57±15.61	22.75±7.97	н.с.
	120	27.77±13.36	25.28±9.90	н.с.



**Графикон број 2:** Ефекти стрептозотоцином индукованог дијабетеса на параметре оксидационог стреса у коронарном ефлуенту изолованог срца пацова.

Вредности  $H_2O_2$  су одређиване из коронарног ефлуента. Концентрација је расла са порастом CPP а у нашим групама вредности су биле ниже у дијабетичној групи уз статистичку значајност при CPP 100 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 12 и графикон број 2 Б.

**Табела број 12:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на  $H_2O_2$  (nmol/min/gwt) код контролних и дијабетичних животиња. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
$\frac{H_2O_2}{\bar{x} \pm SD}$	40	15.37±5.94	12.81±6.77	н.с.
	60	22.87±8.40	19.58±9.00	н.с.
	80	23.21±7.32	19.27±8.82	н.с.
	100	26.94±10.97	20.04±9.14*	p<0.05
	120	26.53±9.54	24.05±11.88	н.с.

Азот оксид расте паралелено са порастом CPP али је при CPP 40 cm H<sub>2</sub>O уочена статистичка значајност уз вишу вредност у групи са дијабетесом. Табела број 13 и графикон број 2 В.

**Табела број 13:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на NO (nmol/min/gwt) код контролних и дијабетичних животиња. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
$\frac{NO}{\bar{x} \pm SD}$	40	34.28±16.95	48.73±23.38*	p<0.05
	60	54.12±23.21	50.22±25.72	н.с.
	80	61.64±25.29	56.92±27.90	н.с.
	100	68.52±30.28	70.72±20.75	н.с.
	120	74.30±31.38	74.74±28.70	н.с.

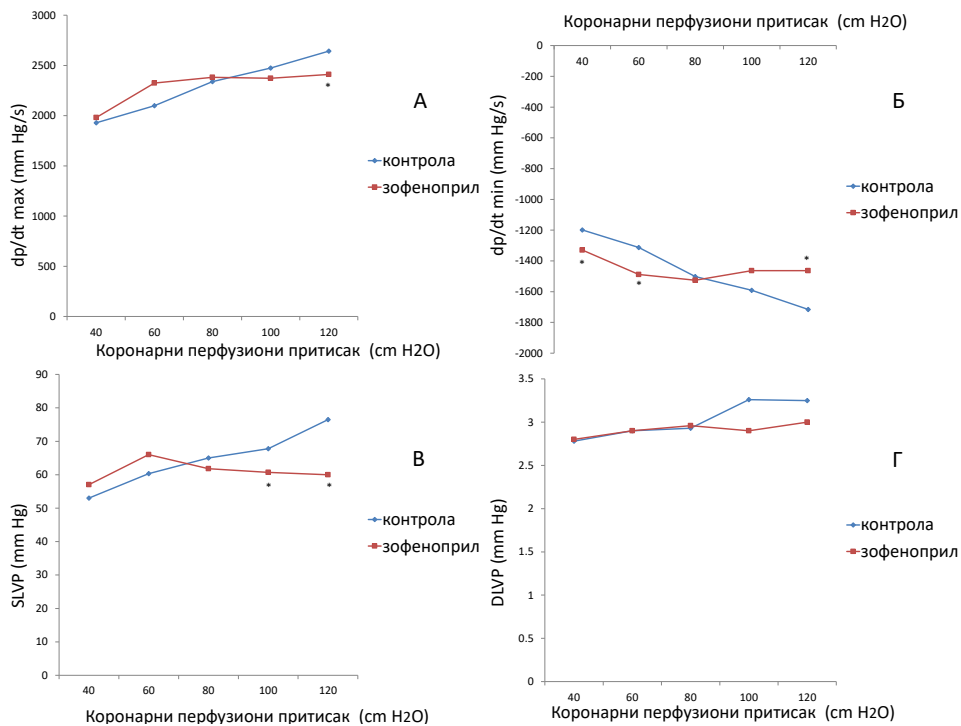
TBARS су били значајно виши у дијабетичној групи. Уочена је високон значајна разлика при свим вредностима CPP уз поступни пораст вредности при порасту CPP. Табела број 14 и график број 2 Г.

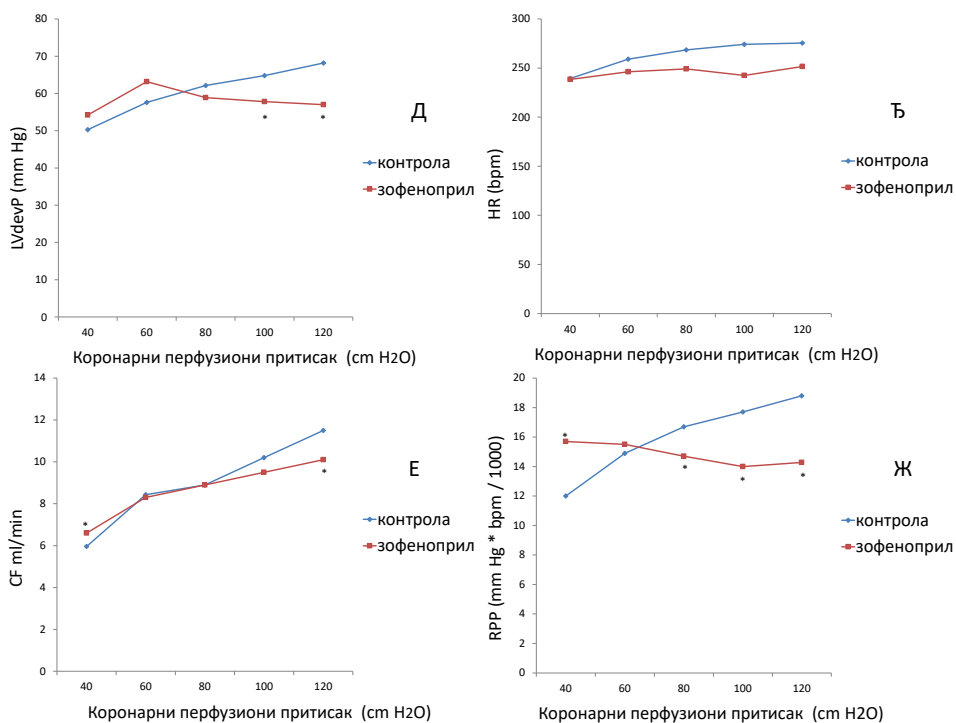
**Табела број 14:** Ефекти хипергликемије узроковане стрептозотоцином на TBARS (μmol/min/gwt) код контролних и дијабетичних животиња. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Дијабетес	
<i>T</i> BARS $\bar{x} \pm SD$	40	29.91±11.68	68.32±15.58**	p<0.01
	60	46.20±18.57	92.73±17.95**	p<0.01
	80	45.89±19.50	99.90±18.96**	p<0.01
	100	70.46±29.78	110.88±23.72**	p<0.01
	120	60.90±27.40	122.06±27.33**	p<0.01

#### 4.2. ЕФЕКТИ ЗОФЕНОПРИЛА НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ИЗОЛОВАНОМ СРЦУ ПАЦОВА СА СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ ИНДУКОВАНИМ ДИЈАБЕТЕСОМ

Након перфузије зофеноприлом у контролној групи *dp/dt max* на нижим CPP расте, највише на 60 cm H<sub>2</sub>O, без достигања прага статистичке значајности. Затим се изједначава на CPP 80 cm H<sub>2</sub>O, и даље постаје нижи уз статистичку значајност при супрафизиолошком CPP 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 15 и графикон број 3 А.





**Графикон број 3:** Ефекти перфузије зофеноприлом на кардиодинамске параметре у изолованом срцу пацова.

**Табела број 15:** Ефекти зофеноприла на  $dp/dt\ max$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

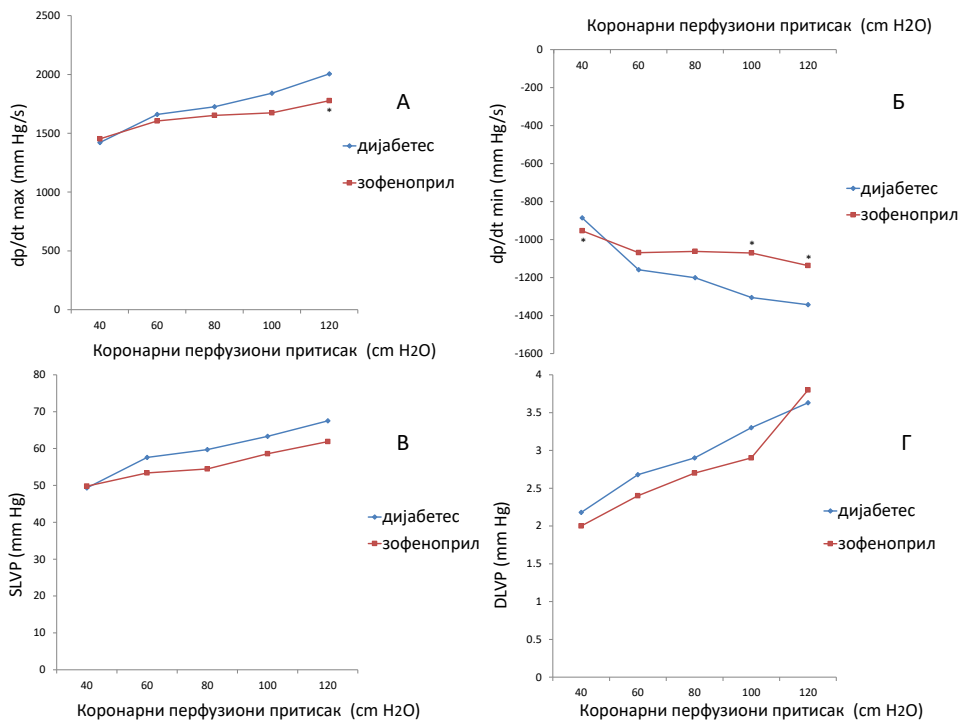
Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Зофеноприл 1.5 $\mu$ M	
$dp/dt\ max$ $\bar{x} \pm SD$	40	1928.46±269.09	1981.48±276.31	н.с
	60	2098.86±293.87	2325.25±269.95	н.с
	80	2338.55±324.88	2381.48±364.61	н.с
	100	2473.35±358.44	2372.25±337.98	н.с.
	120	2643.01±403.89	2409.83±467.00*	p<0.05

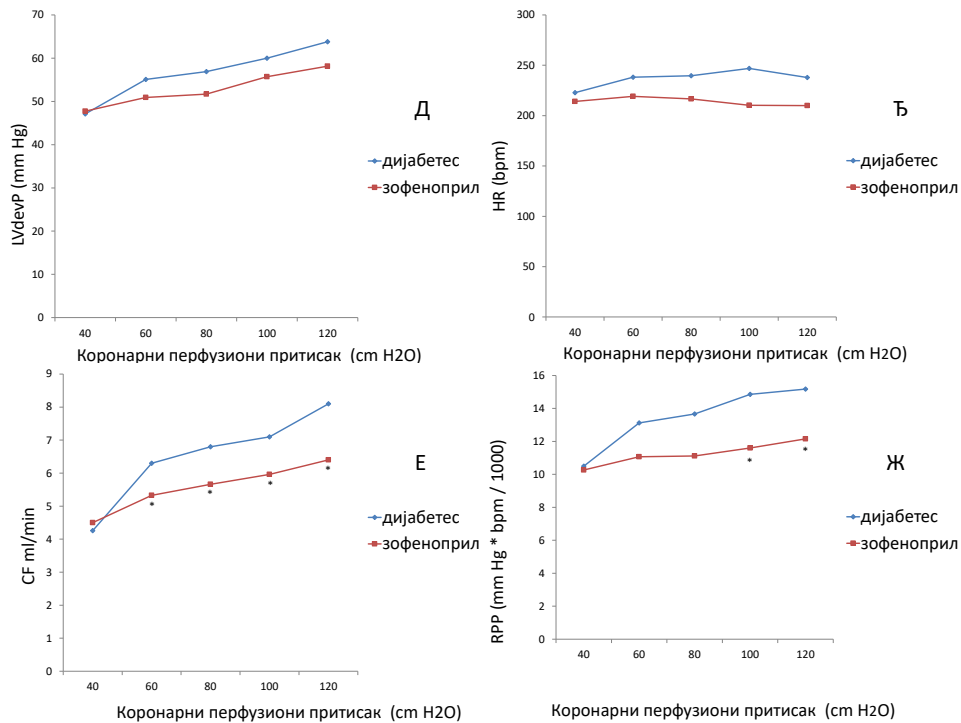
За разлику од контролних животиња изолована срца дијабетичних пацова не приказују почетно повећање  $dp/dt\ max$  већ се од старта уочава смањење овог параметра уз достизање статистичке значајности при CPP 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела 16 и графикон 4 А.



**Табела број 16:** Ефекти зофеноприла на  $dp/dt\ max$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Зофеноприл 1.5 $\mu$ M	
$dp/dt\ max$ $\bar{X} \pm SD$	40	1421.06 $\pm$ 199.86	1452.06 $\pm$ 218.02	н.с
	60	1660.26 $\pm$ 151.38	1604.40 $\pm$ 187.30	н.с
	80	1725.48 $\pm$ 116.05	1651.55 $\pm$ 191.82	н.с
	100	1839.98 $\pm$ 128.66	1673.02 $\pm$ 256.11	н.с.
	120	2005.45 $\pm$ 139.06	1777.16 $\pm$ 256.44*	p<0.05





**Графикон број 4:** Ефекти перфузије зофеноприлом на кардиодинамске параметре у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

При мерењу ефеката перфузије зофеноприлом на  $dp/dt \min$  у контролној групи почетни ефекат је повећање брзине смањивања притиска у левој комори на нижим CPP уз статистичку значајност при CPP 40 и 60 cm H<sub>2</sub>O. Након тога ефекат се губи да би резултат био статистички значајно мањи на CPP 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 17 и графикон број 3 Б.

**Табела број 17:** Ефекти зофеноприла на  $dp/dt \min$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Зофеноприл 1.5 $\mu$ M	
$dp/dt \min$ $\bar{x} \pm SD$	40	-1199.38±154.17	-1329.61±143.68*	p<0.05
	60	-1312.55±200.68	-1488.51±175.19*	p<0.05
	80	-1502.18±202.1	-1525.75±273.93	н.с
	100	-1591.36±339.44	-1463.15±254.94	н.с
	120	-1716.63±378.94	-1463.02±320.31*	p<0.05

У дијабетичној групи ефекат на убрзање  $dp/dt \min$  је одржан при  $CPP$  40  $cm H_2O$  али се брже мења ка смањењу овог параметра и постаје статистички значајно мањи при  $CPP$  100 и 120  $cm H_2O$ . Табела број 18 и графикон број 4Б.

**Табела број 18:** Ефекти зофеноприла на  $dp/dt \min$  ( $mm Hg/s$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Дијабетес	Зофеноприл 1.5 $\mu M$	
$dp/dt \min$ $\bar{x} \pm SD$	40	-885.75 $\pm$ 142.50	-953.88 $\pm$ 120.46*	p<0.05
	60	-1158.51 $\pm$ 158.50	-1069.08 $\pm$ 167.02	н.с
	80	-1201.36 $\pm$ 125.31	-1062.15 $\pm$ 144.54	н.с
	100	-1304.96 $\pm$ 158.38	-1071.48 $\pm$ 140.16*	p<0.05
	120	-1342.70 $\pm$ 208.28	-1137.45 $\pm$ 173.97*	p<0.05

Резултати за  $SLVP$  у контролној групи прате ефекте на  $dp/dt \max$ , пораст вредности на нижим  $CPP$  не достиже статистичку значајност док је смањење при  $CPP$  100 и 120  $cm H_2O$  статистички значајно. Табела број 19 и графикон број 3 В.

**Табела број 19:** Ефекти зофеноприла на  $SLVP$  ( $mm Hg$ ) у изолованом срцу пацова. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Зофеноприл 1.5 $\mu M$	
$SLVP$ $\bar{x} \pm SD$	40	53.06 $\pm$ 8.63	56.98 $\pm$ 8.49	н.с.
	60	60.33 $\pm$ 11.25	66.05 $\pm$ 15.09	н.с.
	80	65.06 $\pm$ 15.80	61.86 $\pm$ 15.24	н.с.
	100	67.88 $\pm$ 16.21	60.73 $\pm$ 15.17*	P<0.05
	120	71.46 $\pm$ 17.73	60.01 $\pm$ 17.04*	P<0.05

У групи са дијабетесом перфузија зофеноприлом доводи до смањења овог параметра, криве се на исти начин мењају са променом  $CPP$  а разлика на појединачним притисцима није статистички значајна. графикон број 4 В.

Дијастолни притисак у левој комори код контролне групе није се мењао након перфузије Зофеноприлом на  $CPP$  40-80  $cm H_2O$ . Након тога постаје нижи али без статистичке значајности. Графикон број 3 Г. У дијабетичној групи  $DLVP$  паралелно расте при повећању  $CPP$  са и без примене зофеноприла. Ниже су вредности након перфузије

зофеноприлом сем при  $CPP$  120  $cm H_2O$ . При овим мерењима није достигнута статистичка значајност. Графикон број 4 Г.

Развојни притисак у левој комори  $LVdevP$  се добија као разлика  $SLVP$  и  $DLVP$ . Резултати прате виђено за  $SLVP$ . Пораст вредности у контролној групи на нижим  $CPP$  не достиже статистичку значајност док је смањење при  $CPP$  100 и 120  $cm H_2O$  статистички значајно. Табела број 20 и графикон број 3 Д.

**Табела број 20:** Ефекти зофеноприла на  $LVdevP$  ( $mmHg$ ) у изолованом срцу пацова. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	$CPP$ ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Зофеноприл 1.5 $\mu M$	
$LVdevP$ $\bar{x} \pm SD$	40	50.28±8.85	54.18±8.90	н.с.
	60	57.60±11.12	63.15±15.32	н.с.
	80	62.13±15.55	58.90±15.11	н.с.
	100	64.78±16.40	57.80±15.13*	p<0.05
	120	68.21±17.76	57.00±16.94*	p<0.05

Након готово идентичних вредности  $LVdevP$  у групи са дијабетесом при  $CPP$  40  $cm H_2O$ , параметар паралелно расте са порастом  $CPP$ , нешто је нижи након перфузије зофеноприлом али без статистичке значајности. Графикон број 4 Б.

Срчана фреквенца у контролној групи након перфузије зофеноприлом поступно опада. При порасту  $CPP$  промена срчане фреквенце одвија се на исти начин пре и након примене зофеноприла. Највећа је разлика при  $CPP$  100  $cm H_2O$  али без постигнуте значајности разлике. Графикон број 3 Ђ.

И у групи са дијабетесом срчана фреквенца на исти начин опада након перфузије Зофеноприлом без достизања статистичке значајности. Графикон број 4 Ѓ

Коронарни проток код контролних животиња је повећан након перфузије зофеноприлом на  $CPP$  40  $cm H_2O$  да би након тога спорије растао са порастом  $CPP$  што је довело до статистички значајно ниже вредности при  $CPP$  120  $cm H_2O$ . Табела 21 и графикон 3 Е.

У групи са дијабетесом зофеноприл нема ефекат на  $CF$  на најнижем  $CPP$  да би затим при порасту  $CPP$  био статистички значајно нижи на  $CPP$  60-120  $cm H_2O$ . Табела 22 и графикон 4 Е.

**Табела број 21:** Ефекти зофеноприла на  $CF$  ( $ml/min$ ) у изолованом срцу пацова. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Зофеноприл 1.5 $\mu M$	
$CF$ $\bar{x} \pm SD$	40	5.96±0.61	6.66±1.13*	p<0.05
	60	8.43±1.28	8.33±0.81	н.с.
	80	8.90±1.31	8.93±1.00	н.с.
	100	10.26±1.39	9.50±1.28	н.с.
	120	11.50±1.34	10.10±1.31*	p<0.05

**Табела број 22:** Ефекти зофеноприла на  $CF$  ( $ml/min$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Дијабетес	Зофеноприл 1.5 $\mu M$	
$CF$ $\bar{x} \pm SD$	40	4.26±0.70	4.53±0.76	н.с.
	60	6.30±1.04	5.33±1.12*	p<0.05
	80	6.83±1.29	5.66±1.24*	p<0.05
	100	7.13±1.12	5.96±1.18*	p<0.05
	120	8.13±1.18	6.40±1.11*	p<0.05

**Табела број 23:** Ефекти зофеноприла на  $RPP$  ( $mmHg \cdot bmr/1000$ ) у изолованом срцу пацова. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Зофеноприл 1.5 $\mu M$	
$RPP$ $\bar{x} \pm SD$	40	12.07±2.47	15.69±3.84*	p<0.05
	60	14.92±3.16	15.52±3.58	н.с.
	80	16.73±4.40	14.74±4.08*	p<0.05
	100	17.76±4.60	13.98±3.48*	p<0.05
	120	18.83±5.01	14.28±3.94*	p<0.05

*RPP* (енг. rate pressure product) је параметар напрезања зида леве коморе. Након примене зофеноприла долази до повећања овог параметра у контролној групи на *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O*. Након тога параметар постаје значајно нижи од *CPP* 80 -120 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела 23 и графикон 3 Ж.

У групи са дијабетесом *RPP* је готово индентичан након перфузије зофеноприлом при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* да би затим са повећањем *CPP* постајао све нижи у односу на вредности пре перфузије са статистички значајном разликом на *CPP* 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 24 и графикон број 4 Ж.

**Табела број 24:** Ефекти зофеноприла на *RPP* (*mmHg\*bmp/1000*) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Дијабетес	Зофеноприл 1.5 $\mu$ M	
<i>RPP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	10.51 $\pm$ 1.45	10.26 $\pm$ 1.75	н.с.
	60	13.12 $\pm$ 1.29	11.07 $\pm$ 1.43	н.с.
	80	13.66 $\pm$ 2.43	11.12 $\pm$ 2.06	н.с.
	100	14.86 $\pm$ 1.47	11.63 $\pm$ 1.78*	p<0.05
	120	15.18 $\pm$ 1.95	12.15 $\pm$ 1.98*	p<0.05

Супероксид анјон радикал  $O_2^-$  је значајно нижи након перфузије са зофеноприлом при *CPP* 40, 60, 80 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* (p<0.05). На *CPP* 100 *cm H<sub>2</sub>O* је нижи али без значајности. Табела број 25 и графикон број 5 А.

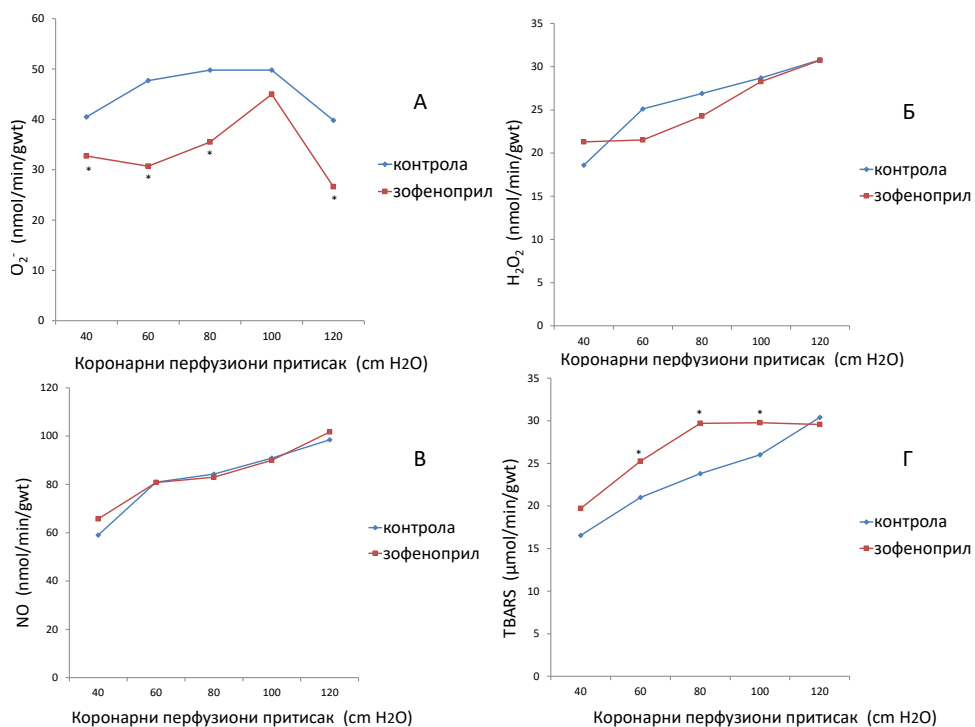
**Табела број 25:** Ефекти зофеноприла на  $O_2^-$  (*nmol/min/gwt*) у изолованом срцу пацова. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Зофеноприл 1.5 $\mu$ M	
$O_2^-$ $\bar{x} \pm SD$	40	40.49 $\pm$ 24.41	32.74 $\pm$ 19.47*	p<0.05
	60	47.72 $\pm$ 28.62	30.75 $\pm$ 22.58*	p<0.05
	80	49.78 $\pm$ 19.87	35.50 $\pm$ 15.46*	p<0.05
	100	49.83 $\pm$ 22.50	45.07 $\pm$ 21.20	н.с.
	120	39.78 $\pm$ 20.12	26.59 $\pm$ 10.92*	p<0.05

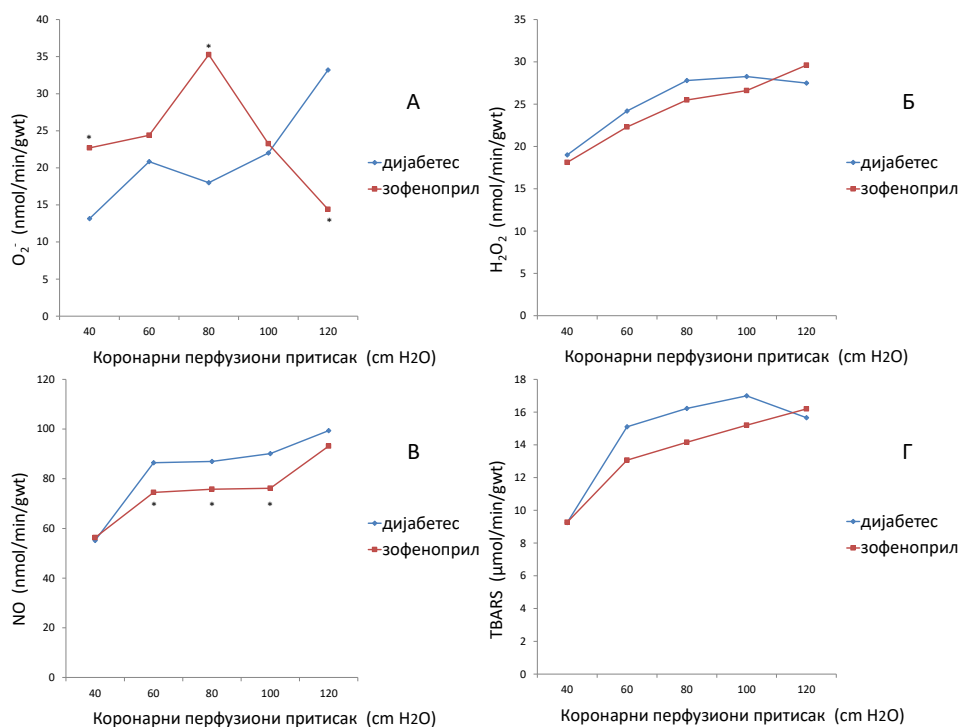
Примена зофеноприла довела је до пораста  $O_2^-$  код дијабетичних животиња на CPP 40-80 cm H<sub>2</sub>O уз статистичку значајност на 40 и 80 cm H<sub>2</sub>O. Са друге стране при CPP 120 cm H<sub>2</sub>O  $O_2^-$  је значајно нижи након перфузије зофеноприлом. Табела број 26 и графикон број 6 А.

**Табела број 26:** Ефекти зофеноприла на  $O_2^-$  (nmol/min/gwt) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Зофеноприл 1.5 μM	
$O_2^-$ $\bar{x} \pm SD$	40	13.16±10.75	22.74±12.86*	p<0.05
	60	20.84±8.72	24.44±16.03	н.с
	80	18.04±9.98	35.27±15.99*	p<0.05
	100	22.09±11.00	23.26±12.08	н.с
	120	33.23±18.83	14.41±13.04*	p<0.05



**Графикон број 5:** Ефекти перфузије зофеноприлом на параметре оксидационог стреса у изолованом срцу пацова.



**Графикон број 6:** Ефекти перфузије зофеноприлом на параметре оксидационог стреса у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом

Параметар оксидационог стреса  $H_2O_2$  се није статистички значајно мењао након перфузије зофеноприлом. Пораст параметра са повећањем *CPP* уочава се на исти начин код срца контролних и дијабетичних животиња. У оба случаја вредности су нешто ниже након перфузије зофеноприлом при *CPP* 60-100 *cm H<sub>2</sub>O*. Код контролних животиња параметар је нешто виши након примене зофеноприла при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* а код дијабетичних на *CPP* 120 *cm H<sub>2</sub>O*. Графикони број 5 Б и 6 Б.

Азот оксид је молекула од изузетног значаја за кардиоваскуларну хомеостазу. У нашем експерименту примена зофеноприла код здравих животиња није довела до измене вредности *NO*. Графикон број 5 В

За разлику од контролне групе код дијабетичних животиња дошло је до редукције *NO* након примене зофеноприла са статистичком значајношћу на *CPP* 60-100 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 39 и графикон број 6 В.

**Табела број 27:** Ефекти зофеноприла на *NO* (nmol/min/gwt) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).



Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Зофеноприл 1.5 μM	
<i>NO</i> $\bar{x} \pm SD$	40	55.16±11.13	56.29±15.14	н.с.
	60	86.48±24.78	74.55±23.04*	p<0.05
	80	87.09±22.38	75.87±20.33*	p<0.05
	100	90.12±23.31	76.21±19.12*	p<0.05
	120	85.16±11.13	83.15±26.81	н.с.

*TBARS* (енг. *Thiobarbituric reactive substances*) је параметар липидне пероксидације. Овај параметар расте након примене зофеноприла у контролној групи уз статистичку значајност на CPP 60-100 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 28, графикон број 5 Г.

**Табела број 28:** Ефекти зофеноприла на *TBARS* (μmol/min/gwt) у изолованом срцу пацова. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Зофеноприл 1.5 μM	
<i>TBARS</i> $\bar{x} \pm SD$	40	16.54±3.46	19.71±3.30	н.с.
	60	21.08±5.24	25.26±4.38*	p<0.05
	80	23.83±5.97	29.72±4.72*	p<0.05
	100	26.07±6.85	29.78±4.82*	p<0.05
	120	30.46±8.07	29.57±5.56	н.с.

Дијабетес је довео до значајног пораста *TBARS* у односу на здраве животиње како је претходно већ приказано. У овој групи за разлику од контролне перфузија зофеноприлом доводи до смањења нивоа *TBARS* при CPP 60-100 cm H<sub>2</sub>O, без статистичке значајности. На CPP 40 и 120 cm H<sub>2</sub>O није било утицаја на ниво *TBARS*. Графикон број 6 Г.

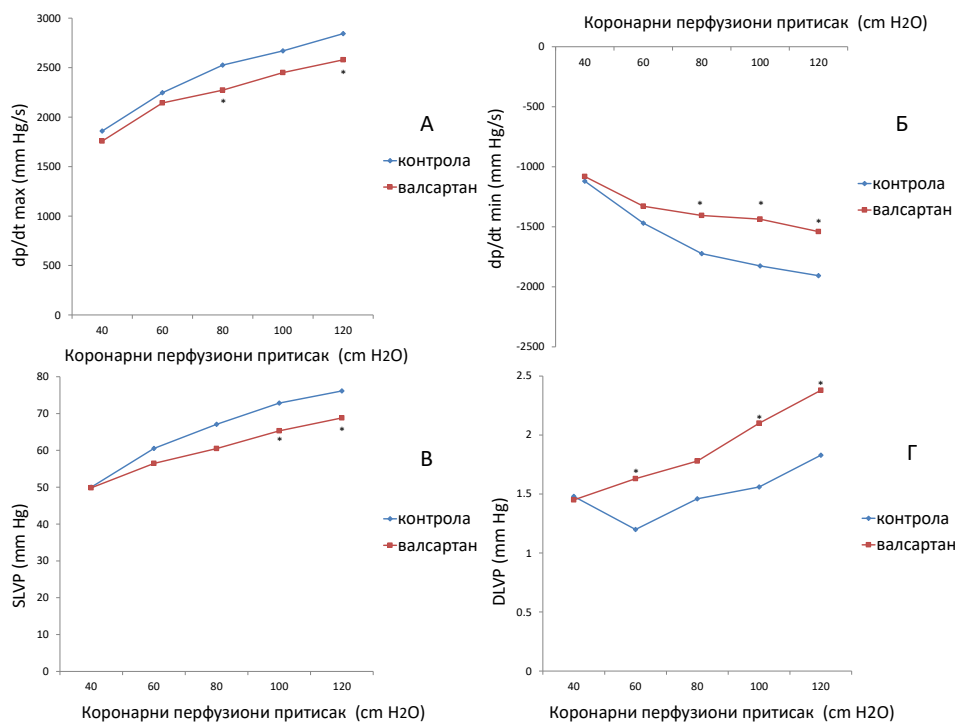
#### 4.3. ЕФЕКТИ ВАЛСАРТАНА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ИЗОЛОВАНОМ СРЦУ ПАЦОВА СА СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ ИНДУКОВАНИМ ДИЈАБЕТЕСОМ

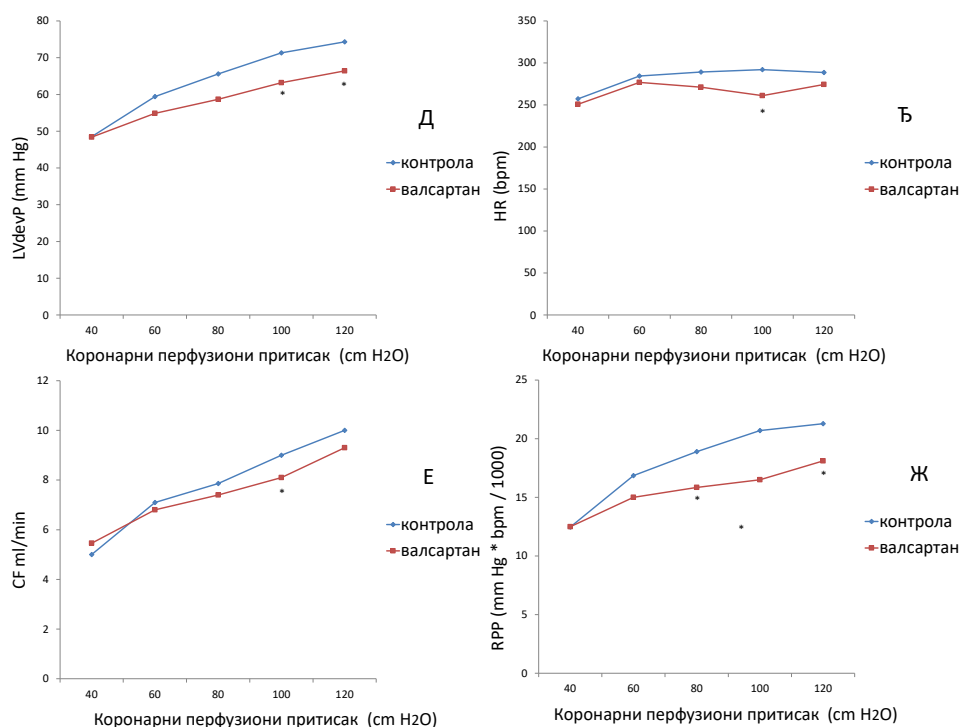
Перфузија валсартаном у контролној групи довела је до снижавања  $dp/dt\ max$  уз статистичку значајност разлике при  $CPP\ 80$  и  $120\ cm\ H_2O$ . Резултати се на исти начин мењају при порасту  $CPP$ . Табела број 29 и графикон број 7 А.

**Табела број 29:** Ефекти валсартана на  $dp/dt\ max$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 μM	
$dp/dt\ max$ $\bar{X} \pm SD$	40	1859.11±223.85	1758.55±251.44	н.с.
	60	2246.66±222.05	2143.63±207.58	н.с.
	80	2526.81±231.26	2272.66±248.99*	p<0.05
	100	2669.40±268.89	2450.01±327.28	н.с.
	120	2844.20±314.91	2579.96±220.77*	p<0.05

Код дијабетичних животиња промена  $dp/dt\ max$  изостаје код већине CPP, пораст параметра при вишим CPP је не измењен. Ипак учава се статистички значајно мања вредност при CPP 100 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 30 и графикон број 8 А.





Графикон број 7: Ефекти валсартана на кардиодинамске параметре у изолованом срцу пацова.

Табела број 30: Ефекти валсартана на  $dp/dt\ max$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

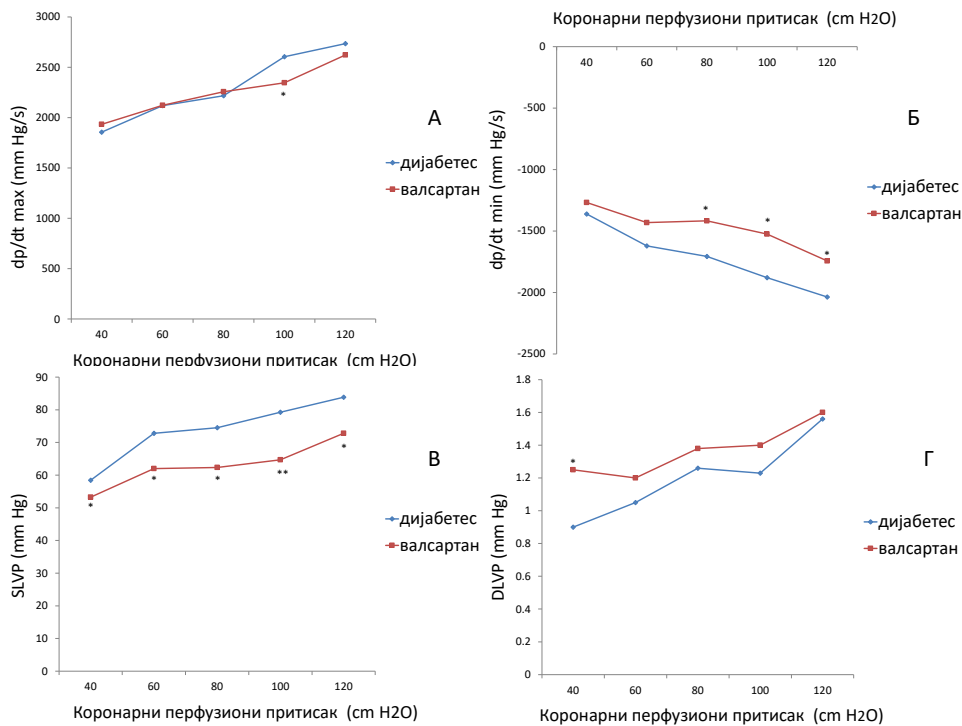
Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 μM	
$dp/dt\ max$ $\bar{x} \pm SD$	40	1856.20±406.73	1932.70±299.42	н.с.
	60	2118.71±479.21	2123.05±326.37	н.с.
	80	2216.98±438.23	2256.63±338.62	н.с.
	100	2604.70±425.93	2345.71±392.40*	p<0.05
	120	2734.41±384.53	2623.03±460.02	н.с.

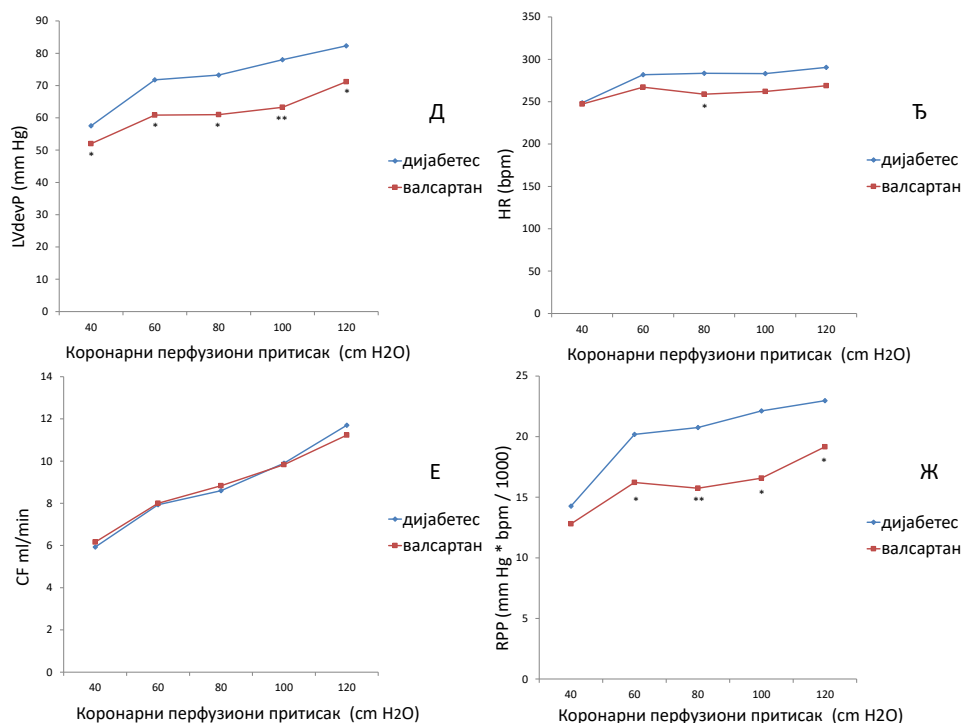
Перфузија Валсартаном редукује  $dp/dt\ min$  у контролној групи уз статистичку значајност при CPP 80-120 cm H<sub>2</sub>O. Након перфузије Валсартаном изостаје пораст параметра претходно забележен при порасту CPP. Табела 31 и графикон број 7 Б.

**Табела број 31:** Ефекти валсартана на  $dp/dt \min$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 μM	
$dp/dt \min$ $\bar{x} \pm SD$	40	-1119.91±142.99	-1081.68±223.79	н.с.
	60	-1469.16±236.09	-1328.93±121.73	н.с.
	80	-1723.61±274.74	-1406.18±357.56*	p<0.05
	100	-1825.21±305.89	-1436.13±382.79*	p<0.05
	120	-1907.53±302.26	-1540.45±303.77*	p<0.05

На исти начин, као и у контролној групи, код дијабетичних животиња перфузија Валсартаном снижава вредности  $dp/dt \min$ , а статистички значајно на CPP 80-120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 32 и графикон број 8 Б.





Графикон број 8: Ефекти валсартана на кардиодинамске параметре у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

Табела број 32: Ефекти валсартана на  $dp/dt \text{ min}$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 μM	
$dp/dt \text{ min}$ X±SD	40	-1361.85±250.95	-1267.93±124.60	н.с.
	60	-1621.20±318.91	-1431.75±117.75	н.с.
	80	-1707.33±229.33	-1417.22±133.66*	p<0.05
	100	-1880.05±258.23	-1524.93±183.39*	p<0.05
	120	-2036±239.91	-1743.36±75.76*	p<0.05

SLVP је снижен након перфузије са Валсартаном на свим CPP а статистичка значајност је уочена при CPP 100 и 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 33 и графикон број 7 В.

Табела број 33: Ефекти валсартана на SLVP (mmHg) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 μM	
<i>SLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	50.00±6.72	49.85±6.85	н.с.
	60	60.58±7.77	56.48±7.42	н.с.
	80	67.11±8.69	60.53±12.08	н.с.
	100	72.86±9.42	65.30±11.91*	p<0.05
	120	76.15±11.55	68.81±13.87*	p<0.05

Код дијабетичних животиња ефекат валсартана на редукцију *SLVP* је још израженији. Све вредности након перфузије су статистички значајно ниже а при *CPP* 100 cm H<sub>2</sub>O разлика је високо значајна p< 0.01. Табела број 34 и графикон број 8 В.

**Табела број 34:** Ефекти валсартана на *SLVP* (mm Hg) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 μM	
<i>SLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	58.45±6.33	53.25±3.19*	p<0.05
	60	72.80±6.82	62.06±6.27*	p<0.05
	80	74.51±5.51	62.36±5.91*	p<0.05
	100	79.25±7.15	64.68±6.90**	p<0.01
	120	83.86±6.30	72.80±3.00*	p<0.05

У контролној групи *DLVP* је виши након примене валсартана сем при *CPP* 40 cm H<sub>2</sub>O. Статистичка значајност разлике уочена је при *CPP* 60, 100 и 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 35 и графикон број 7 Г.

У групи дијабетичних животиња такође се уочава пораст *DLVP* након перфузије валсартаном. Ова разлика је мање изражена него код контролне групе, статистичка значајност се постиже једино при *CPP* 40 cm H<sub>2</sub>O насупрот виђеном у контролној групи. Табела број 36 и графикон број 8 Г.

**Табела број 35:** Ефекти валсартана на *DLVP* (mmHg) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 μM	
<i>DLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	1.48±0.35	1.45±0.58	н.с.
	60	1.20±0.68	1.63±0.51*	p<0.05
	80	1.46±0.61	1.78±0.54	н.с.
	100	1.56±0.46	2.10±0.45*	p<0.05
	120	1.83±0.56	2.38±0.66*	p<0.05

**Табела број 36:** Ефекти валсартана на *DLVP* (mm Hg) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 μM	
<i>DLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	0.90±0.40	1.25±0.52*	p<0.05
	60	1.05±0.60	1.20±0.58	н.с.
	80	1.26±0.52	1.38±0.47	н.с.
	100	1.23±0.45	1.40±0.59	н.с.
	120	1.56±0.54	1.60±0.55	н.с.

*LVdevP* је снижен након примене валсартана у контролној групи и ово је најизраженије на вишим CPP 100 и 120 cm H<sub>2</sub>O где се остварује статистички значајна разлика. Табела број 37 и графикон број 7 Д.

**Табела број 37:** Ефекти валсартана на *LVdevP* (mm Hg) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 μM	
<i>LVdevP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	48.51±6.49	48.40±6.67	н.с.
	60	59.38±7.94	54.85±7.53	н.с.
	80	65.65±8.56	58.75±12.04	н.с.
	100	71.30±10.11	63.20±13.64*	p<0.05
	120	74.31±11.57	66.43±13.35*	p<0.05

У групи дијабетичних животиња смањење вредности  $LVdevP$  је израженије а статистичка значајност је присутна при свим притисцима уз високо значајну разлику  $p < 0.001$  на  $CPP$  100  $cm H_2O$ . Табела број 38 и графикон број 8 Д.

**Табела број 38:** Ефекти валсартана на  $LVdevP$  ( $mm Hg$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. ( $p$  – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	$CPP$ ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 $\mu M$	
$LVdevP$ $\bar{x} \pm SD$	40	57.55 $\pm$ 4.16	52.00 $\pm$ 3.45*	$p < 0.05$
	60	71.75 $\pm$ 4.42	60.86 $\pm$ 6.55*	$p < 0.05$
	80	73.25 $\pm$ 5.32	60.98 $\pm$ 6.21*	$p < 0.05$
	100	78.01 $\pm$ 6.20	63.28 $\pm$ 7.42**	$p < 0.01$
	120	82.30 $\pm$ 6.33	71.20 $\pm$ 3.32*	$p < 0.05$

Утицај перфузије валсартаном на  $HR$  у контролној групи није изражен. Вредности су несигнификантно ниже на свим  $CPP$  изузев на  $CPP$  100  $cm H_2O$  где се уочава значајна разлика. Табела број 39 и графикон број 7 Ђ.

**Табела број 39:** Ефекти валсартана на  $HR$  ( $bpm$ ) у изолованом срцу пацова ( $p$  – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	$CPP$ ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 $\mu M$	
$HR$ $\bar{x} \pm SD$	40	257.33 $\pm$ 20.22	250.85 $\pm$ 31.22	н.с.
	60	284.41 $\pm$ 28.58	276.81 $\pm$ 34.38	н.с.
	80	289.35 $\pm$ 25.46	271.18 $\pm$ 26.33	н.с.
	100	292.18 $\pm$ 21.54	261.10 $\pm$ 19.63*	$p < 0.05$
	120	288.68 $\pm$ 22.95	274.38 $\pm$ 26.00	н.с.

Попут ефекта у контролној групи валсартан утиче смањујући срчану фреквенцу што је уочљиво при свим  $CPP$ , израженије од  $CPP$  80  $cm H_2O$ , није статистички значајна разлика изузев при  $CPP$  80  $cm H_2O$ . Табела број 40 и графикон број 8 Ђ.

Коронарни проток –  $CF$  у контролној групи расте са повећањем  $CPP$ . Након перфузије валсартаном на  $CPP$  40  $cm H_2O$  дискретно је повећан да би се потом овај ефекат изгубио а вредности  $CF$  након перфузије почеле да се снижавају. Статистички значајно нижи  $CF$  уочен је при  $CPP$  100  $cm H_2O$ . Табела број 41 и графикон број 7 Е.



**Табела број 40:** Ефекти валсартана на *HR* (*bpm*) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (*p* – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 $\mu$ M	
<i>HR</i> $\bar{x} \pm SD$	40	248.60 $\pm$ 10.82	247.13 $\pm$ 18.07	н.с.
	60	281.81 $\pm$ 9.98	267.10 $\pm$ 24.00	н.с.
	80	283.50 $\pm$ 10.10	258.83 $\pm$ 20.39*	<i>p</i> <0.05
	100	283.10 $\pm$ 18.69	262.01 $\pm$ 23.38	н.с.
	120	290.51 $\pm$ 18.82	268.80 $\pm$ 21.15	н.с.

**Табела број 41:** Ефекти валсартана на *CF* (*ml/min*) у изолованом срцу пацова (*p* – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 $\mu$ M	
<i>CF</i> $\bar{x} \pm SD$	40	5.00 $\pm$ 0.98	5.46 $\pm$ 1.38	н.с.
	60	7.1 $\pm$ 0.89	6.83 $\pm$ 1.06	н.с.
	80	7.86 $\pm$ 0.83	7.43 $\pm$ 1.36	н.с.
	100	9.00 $\pm$ 0.99	8.10 $\pm$ 1.43*	<i>p</i> <0.05
	120	10.00 $\pm$ 1.31	9.30 $\pm$ 1.72	н.с.

У дијабетичној групи перфузија валсартаном не доводи до промене *CF* ни на једном од *CPP*. Графикон број 8 Е.

Напрезање зида леве коморе посматрано преко параметра *RPP* значајно је смањено током перфузије валсартаном. Вредност овог параметра нижа је у контролној групи на свим *CPP* изузев 40 *cm H<sub>2</sub>O* док се статистичка значајност разлике достиже при *CPP* 80-120 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 42 и графикон број 7 Ж.

Након перфузије изолованих срца дијабетичних животиња валсартаном промене су испољене у истом правцу и још су израженије него у контролној групи. Статистичка значајност је уочена при свим *CPP* сем *CPP* 120 *cm H<sub>2</sub>O* уз високо значајну разлику на *CPP* 80 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 43 и графикон број 8 Ж.

**Табела број 42:** Ефекти валсартана на *RPP* (*mmHg\*bmp/1000*) у изолованом срцу пацова (*p* – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 μM	
$\frac{RPP}{\bar{x} \pm SD}$	40	12.47±1.83	12.50±1.74	н.с.
	60	16.85±2.54	15.06±1.79	н.с.
	80	18.91±2.27	15.85±3.16*	p<0.05
	100	20.71±2.13	16.51±3.98*	p<0.05
	120	21.28±2.29	18.11±3.76*	p<0.05

Табела број 43: Ефекти валсартана на  $RPP$  (mmHg\*bmp/1000) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

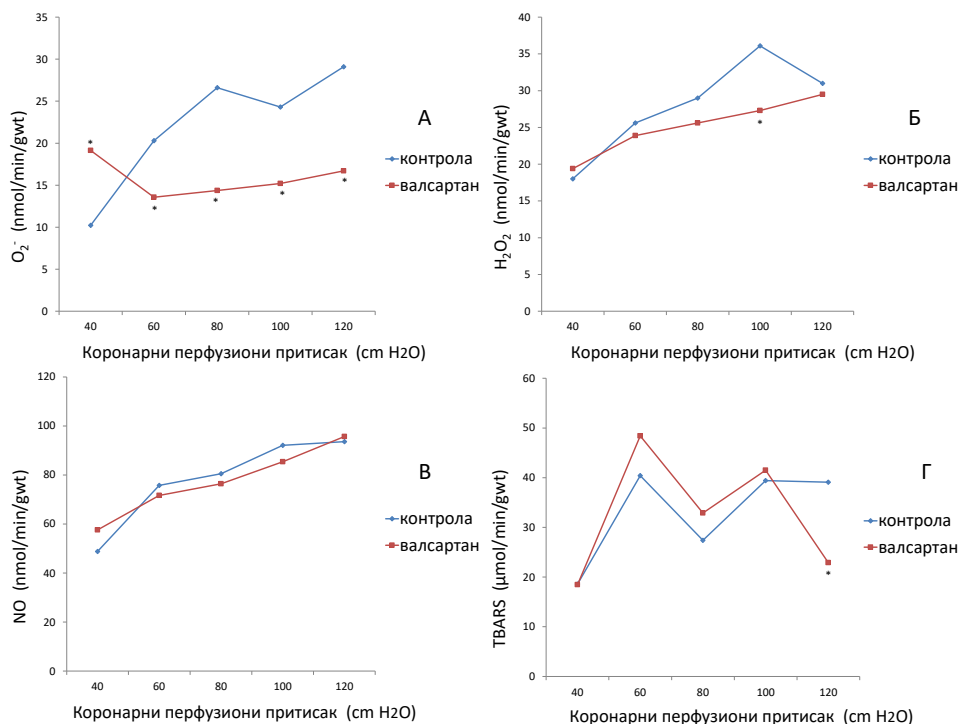
Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 μM	
$\frac{RPP}{\bar{x} \pm SD}$	40	14.27±1.32	12.81±0.80*	p<0.05
	60	20.19±1.52	16.22±2.03*	p<0.05
	80	20.75±1.40	15.74±1.64**	p<0.01
	100	22.13±3.08	16.58±2.57*	p<0.05
	120	22.97±3.92	19.16±2.08	н.с.

Супероксид анјон радикал  $O_2^-$  у контролној групи расте при повећању CPP пре додавања Валсартана. Након тога овај параметар статистички значајно расте при сниженом CPP 40 cm H<sub>2</sub>O да би већ од следеће вредности био значајно нижи, са статистичком значајношћу на CPP 60-120 cm H<sub>2</sub>O, уз изостанак пораста вредности при повећању CPP. Табела број 44 и графикон број 9 А.

Табела број 44: Ефекти валсартана на  $O_2^-$  (nmol/min/gwt) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 μM	
$\frac{O_2^-}{\bar{x} \pm SD}$	40	10.23±3.53	19.14±3.18*	p<0.05
	60	20.30±5.75	13.57±4.10*	p<0.05
	80	26.62±12.60	14.37±3.73*	p<0.05
	100	24.30±9.82	15.19±3.45*	p<0.05
	120	29.10±5.16	16.69±2.92*	p<0.05

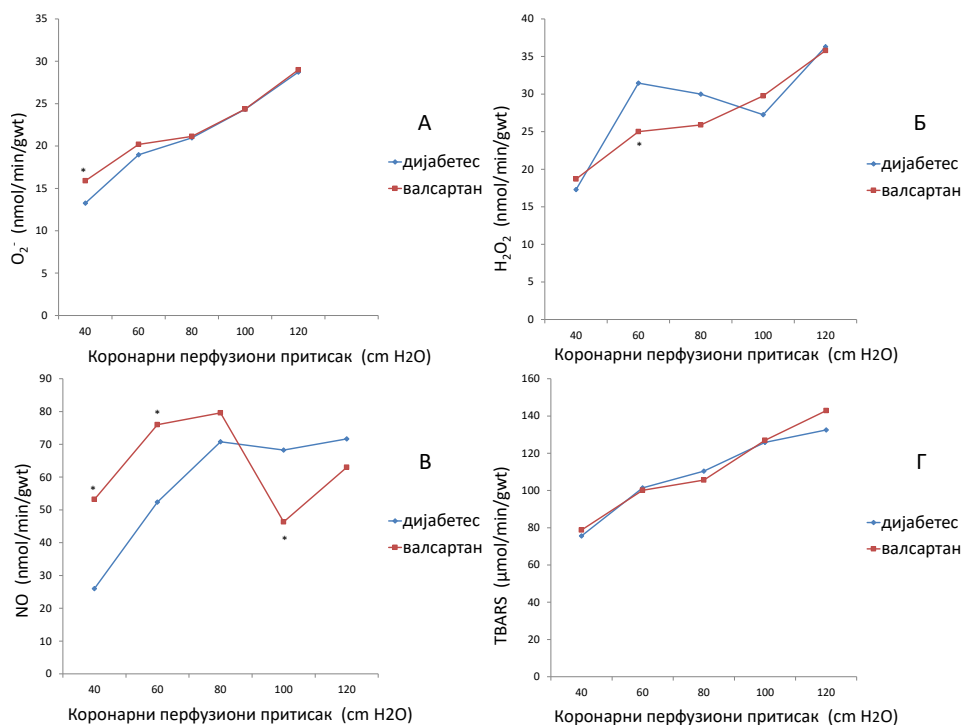
За разлику од контролне групе код дијабетичних животиња перфузија валсартаном није довела до значајне измене вредности  $O_2^-$  изузев при  $CPP$  40  $cm H_2O$  где је забележен статистички значајан пораст. Табела број 45 и графикон број 10 А.



Графикон број 9: ефекти валсартана на параметре оксидационог стреса у изолованом срцу пацова.

Табела број 45: Ефекти валсартана на  $O_2^-$  ( $nmol/min/gwt$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 $\mu$ M	
$O_2^-$ $\bar{x} \pm SD$	40	13.26 $\pm$ 2.91	15.90 $\pm$ 3.85*	p<0.05
	60	18.97 $\pm$ 2.69	20.19 $\pm$ 3.99	н.с.
	80	20.96 $\pm$ 6.42	21.14 $\pm$ 4.77	н.с.
	100	24.33 $\pm$ 4.87	24.36 $\pm$ 5.24	н.с.
	120	28.72 $\pm$ 7.65	29.03 $\pm$ 6.10	н.с.



Графикон број 10: ефекти валсартана на параметре оксидационог стреса у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

Параметар оксидационог стреса  $H_2O_2$  након перфузије са валсартаном незначајно је повишен при  $CPP$  40  $cm H_2O$  да би при даљем порасту  $CPP$  бивао нижи. Статистички значајна разлика уочена је при  $CPP$  100  $cm H_2O$ . Табела број 46 и графикон број 9 Б.

Табела број 46: Ефекти валсартана на  $H_2O_2$  ( $nmol/min/gwt$ ) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан 1 $\mu M$	
$H_2O_2$ $\bar{x} \pm SD$	40	18.03±5.39	19.43±8.57	н.с.
	60	25.60±8.05	23.94±6.25	н.с.
	80	29.01±10.69	25.66±7.61	н.с.
	100	36.14±13.39	27.35±7.22*	p<0.05
	120	31.01±6.29	29.52±10.03	н.с.

У групи дијабетичних животиња перфузија валсартаном није довела до конзистентне промене вредности водоник пероксида, али је уочена статистички значајно нижа вредност при  $CPP$  60  $cm H_2O$ . До разлике је довела нешто виша вредност овог

параметра при мерењима на *CPP* 60 *cm H<sub>2</sub>O* без додатог лека. Табела број 47 и графикон број 10 Б.

**Табела број 47:** Ефекти валсартана на *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* (*nmol/min/gwt*) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (р – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 $\mu$ M	
$\frac{H_2O_2}{\bar{x} \pm SD}$	40	17.31±5.45	18.71±4.39	н.с.
	60	31.47±10.10	24.99±4.23*	p<0.05
	80	29.97±6.00	25.90±5.51	н.с.
	100	27.25±5.69	29.77±4.56	н.с.
	120	36.31±11.62	35.83±9.17	н.с.

*NO* се није значајно мењао након перфузије валсартаном у контролној групи. Вредности на исти начин расту пружају порасту *CPP*. Графикон број 9 В.

У групи дијабетичних животиња додавање валсартана довело је иницијално до пораста *NO* уз статистичку значајност на *CPP* 40 и 60 *cm H<sub>2</sub>O*. На притисцима 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* *NO* је снижен уз статистичку значајност разлике на *CPP* 100 *cm H<sub>2</sub>O* *H<sub>2</sub>O*. Табела број 48 и графикон број 10 В.

**Табела број 48:** Ефекти валсартана на *NO* (*nmol/min/gwt*) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (р – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Дијабетес	Валсартан 1 $\mu$ M	
$\frac{NO}{\bar{x} \pm SD}$	40	26.06±18.49	53.22±28.90*	p<0.05
	60	52.39±30.09	76.04±26.12*	p<0.05
	80	70.78±37.99	79.57±32.71	н.с.
	100	68.24±25.32	46.36±24.38*	p<0.05
	120	71.66±33.02	63.02±34.58	н.с.

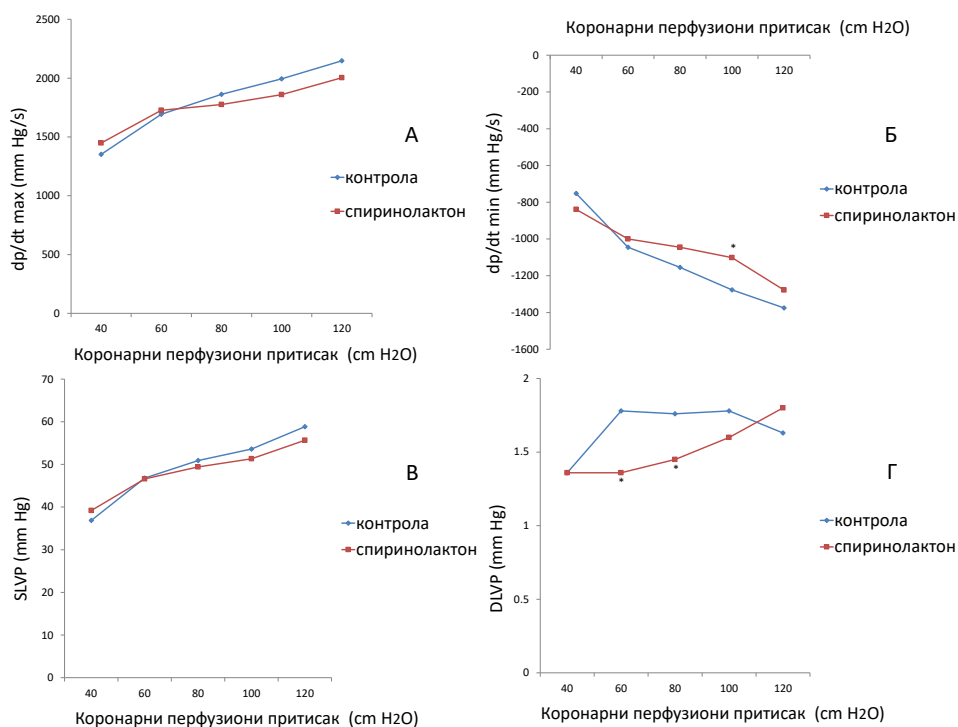
*TBARS* се није значајно мењао након примене валсартана ни у контролној ни у дијабетичној групи. Статистички значајна разлика виђена је у контролној групи при *CPP* 120 *cm H<sub>2</sub>O*. У овој групи вредности су се неконзистентно мењале са порастом *CPP* али у остале приближне и након перфузије валсартаном изузев на највишем *CPP* где су значајно ниже. Табела број 49 и графикони број 9 Г и 10 Г.

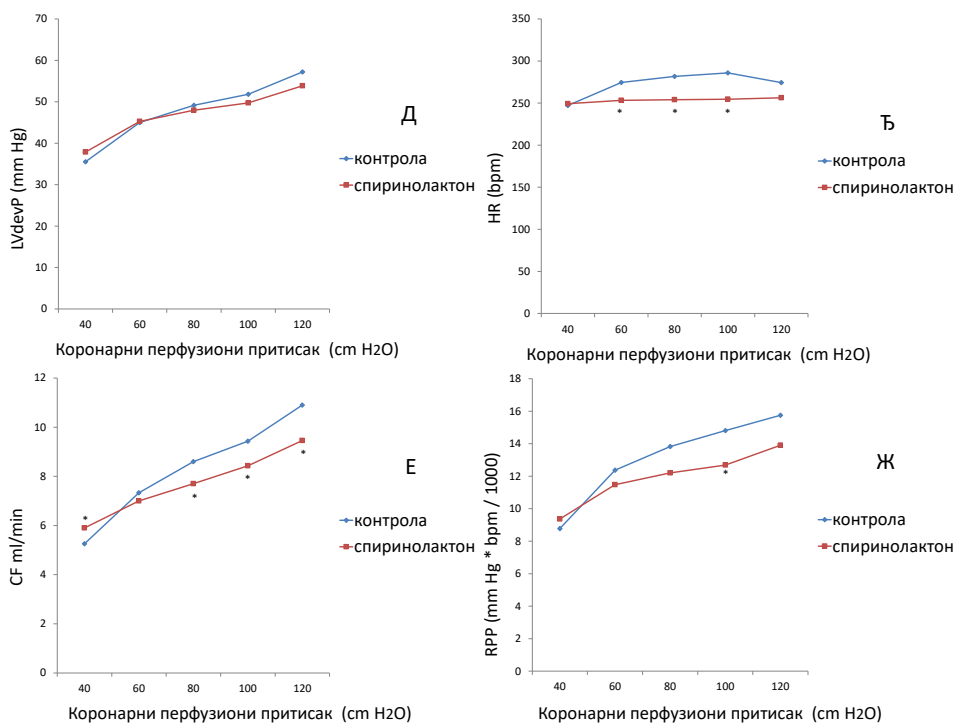
**Табела број 49:** Ефекти валсартана на *TBARS* ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gwt}$ ) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $\text{cm H}_2\text{O}$ )	Група		Значајност
		Контрола	Валсартан $1 \mu\text{M}$	
<i>TBARS</i> $\bar{x} \pm SD$	40	18.61 $\pm$ 10.82	18.47 $\pm$ 9.14	н.с.
	60	40.44 $\pm$ 17.73	48.39 $\pm$ 18.44	н.с.
	80	27.45 $\pm$ 20.32	32.94 $\pm$ 17.68	н.с.
	100	39.43 $\pm$ 22.40	41.51 $\pm$ 15.11	н.с.
	120	39.10 $\pm$ 21.25	22.91 $\pm$ 16.02*	p<0.05

#### 4.4. ЕФЕКТИ СПИРИНОЛАКТОНА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ИЗОЛОВАНОМ СРЦУ ПАЦОВА СА СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ ИНДУКОВАНИМ ДИЈАБЕТЕСОМ

Након додавања спиринолактона у перфузиони раствор контролне групе  $dp/dt \text{ max}$  је благо повећан на CPP 40  $\text{cm H}_2\text{O}$ . Овај ефекат се затим губи па су вредности на CPP 80-120  $\text{cm H}_2\text{O}$  нешто ниже али без статистичке значајности. Графикон 11 А.





**Графикон број 12:** Ефекти спиринолактона на кардиодинамске параметре у изолованом срцу пацова

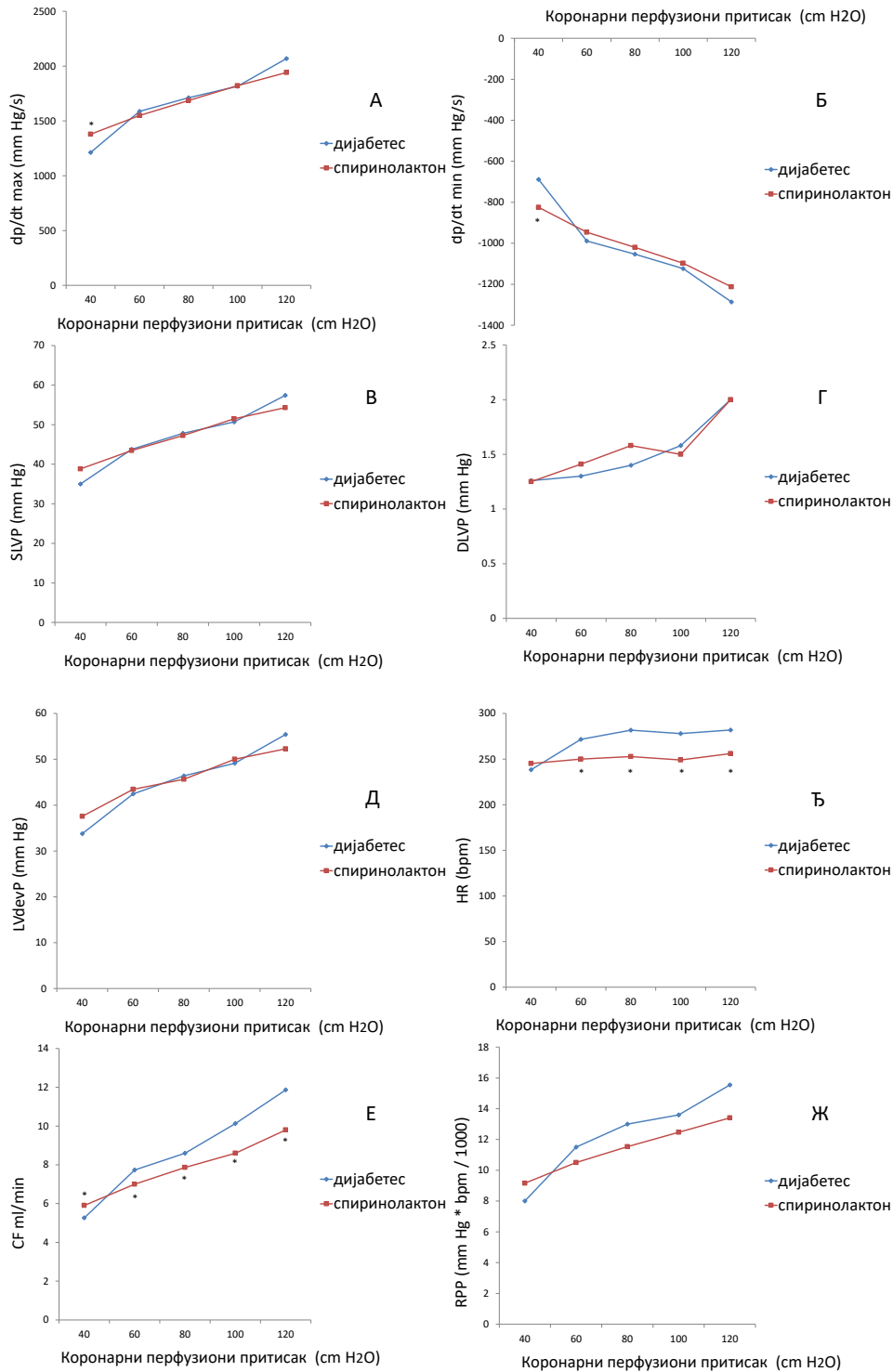
Код дијабетичних животиња перфузија спиринолактоном је довела до статистички значајног скока параметра на  $CPP$  40 cm H<sub>2</sub>O. Ефекат се затим губи а вредност постаје снижена на  $CPP$  120 cm H<sub>2</sub>O али без статистичке значајности. Табела 50 и графикон 12 А.

**Табела број 50:** Ефекти спиринолактона на  $dp/dt max$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Спиринолактон 0.1 μM	
$dp/dt max$ $\bar{x} \pm SD$	40	1212.05±175.13	1379.15±258.56	p<0.05
	60	1586.75±235.56	1549.68±234.92	н.с.
	80	1712.43±238.91	1686.31±250.98	н.с.
	100	1816.73±217.90	1820.70±377.11	н.с.
	120	2068.01±318.30	1941.86±451.15	н.с.

Налик претходном параметру и  $dp/dt min$  је у контролној групи благо убрзан перфузијом спиринолактоном на  $CPP$  40 cm H<sub>2</sub>O. Ефекат се потом губи потраст параметра

се успорава због чега су вредности на *CPP* 80-120 ниже (условно, ради се о негативном броју). Статистички значајна разлика се достиже при *CPP* 100 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 51 и графикон број 11 Б.





**Графикон број 12:** Ефекти спиринолактона на кардиодинамске параметре у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

**Табела број 51:** Ефекти спиринолактона на  $dp/dt \text{ min}$  ( $mm \text{ Hg/s}$ ) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm \text{ H}_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Спиринолактон $0.1 \mu M$	
$dp/dt \text{ min}$ $\bar{x} \pm SD$	40	-752.46±97.95	-839.46±157.37	н.с.
	60	-1044.75±245.21	-1000.15±207.49	н.с.
	80	-1154.53±241.49	-1044.81±240.06	н.с.
	100	-1276.60±235.34	-1101.31±216.87*	p<0.05
	120	-1375.20±242.58	-1277.41±332.27	н.с.

Перфузија спиринолактоном код дијабетичних животиња доводи до сличних ефеката као код контролне групе. У овом случају пораст  $dp/dt \text{ min}$  је статистички значајан при CPP 40  $cm \text{ H}_2O$ . Даље при повећању CPP нема значајне разлике након перфузије спиринолактоном а параметар је благо снижен и без статистички значајне разлике. Табела број 52 и графикон број 12 Б.

**Табела број 52:** Ефекти спиринолактона на  $dp/dt \text{ min}$  ( $mm \text{ Hg/s}$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm \text{ H}_2O$ )	Група		Значајност
		Дијабетес	Спиринолактон $0.1 \mu M$	
$dp/dt \text{ min}$ $\bar{x} \pm SD$	40	-689.01±74.87	-824.90±167.66*	p<0.05
	60	-988.83±175.87	-946.21±175.58	н.с.
	80	-1053.35±159.17	-1019.96±233.75	н.с.
	100	-1123.66±164.34	-1097.58±313.84	н.с.
	120	-1286.31±286.93	-1212.93±361.08	н.с.

SLVP у контролној групи након перфузије спиринолактоном доводи до благог пораста параметра на CPP 40  $cm \text{ H}_2O$  затим се изједначава и на даље смањује па је на CPP 80-120  $cm \text{ H}_2O$  незначајно нижи. Графикон број 11 В.

У дијабетичној групи након примене лека *SLVP* је незначајно виши да би се овај ефекат изгубио на вишим *CPP* све док не постаје незначајно нижи на *CPP 120 cm H<sub>2</sub>O*. Графикон број 12 В.

*DLVP* у контролној групи остаје исти на *CPP 40 cm H<sub>2</sub>O* да би затим био нижи од *CPP 60-100 cm H<sub>2</sub>O* од чега се статистичка значајност разлике уочава на *CPP 60* и *80 cm H<sub>2</sub>O*. На супрафизиолошком *CPP 120 cm H<sub>2</sub>O* *DLVP* је незначајно виши. Табела број 53 и графикон број 11 Г.

**Табела број 53:** Ефекти спиринолактона на *DLVP (mmHg)* у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP (cm H<sub>2</sub>O)</i>	Група		Значајност
		Контрола	Спиринолактон 0.1 $\mu$ M	
<i>DLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	1.36 $\pm$ 0.7	1.36 $\pm$ 0.88	н.с.
	60	1.78 $\pm$ 0.94	1.36 $\pm$ 0.93*	p<0.05
	80	1.76 $\pm$ 1.02	1.45 $\pm$ 1.08*	p<0.05
	100	1.78 $\pm$ 0.91	1.60 $\pm$ 1.30	н.с.
	120	1.63 $\pm$ 1.25	1.80 $\pm$ 1.22	н.с.

У дијабетичној групи вредности *DLVP* су се мењале на исти начин пре и током перфузије спиринолактоном, без значајне разлике. Уочен је благо повишен *DLVP* на *CPP 60* и *80 cm H<sub>2</sub>O* што је насупротив ефектима виђеним у контролној групи. Графикон број 12 Г.

*LVdevP* се није значајно мењао додавањем спиринолактона ни у контролној групи ни у дијабетичној групи, благо је повишен при *CPP 40 cm H<sub>2</sub>O* а снижен при *CPP 120 cm H<sub>2</sub>O*. Графикони број 11 Д и 12 Д.

Срчана фреквенца - *HR* се значајно мењала током перфузије спиринолактоном. Вредности су ниже на *CPP 60-120 cm H<sub>2</sub>O*. Статистички значајна разлика уочена је при *CPP 60-100 cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 54 и графикон број 11 Ђ.

У групи са дијабетесом ефекти виђени у контролној групи су још израженији а статистички значајна разлика је уочена од *CPP 60-120 cm H<sub>2</sub>O*. Табела 55 и графикон 12 Ђ.

**Табела број 54:** Ефекти Спиринолактона на *HR (bpm)* у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Спиринолактон 0.1 μM	
$\frac{HR}{\bar{x} \pm SD}$	40	247.30±24.52	249.26±20.83	н.с.
	60	274.60±21.88	253.26±16.22*	p<0.05
	80	281.71±24.59	254.05±10.47*	p<0.05
	100	286.00±27.75	254.58±12.74*	p<0.05
	120	274.40±11.47	256.45±16.92	н.с.

Табела број 55: Ефекти спиринолактона на HR (bpm) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Спиринолактон 0.1 μM	
$\frac{HR}{\bar{x} \pm SD}$	40	238.30±15.34	245.16±12.01	н.с.
	60	271.51±17.37	250.06±16.86*	p<0.05
	80	281.61±16.86	252.80±11.44*	p<0.05
	100	277.86±20.54	248.95±8.44*	p<0.05
	120	281.88±18.29	256.00±10.09*	p<0.05

Коронарни проток-CF у контролној групи је повишен након примене спиринолактона на CPP, 40 cm H<sub>2</sub>O затим се изједначава при CPP 60 cm H<sub>2</sub>O, након чега постаје снижен при CPP 80-120 cm H<sub>2</sub>O. Статистички значајна разлика се уочава на CPP 40, 80, 100 и 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 56 и графикон број 11 Е.

Табела број 56: Ефекти спиринолактона на CF (ml/min) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Спиринолактон 0.1 μM	
$\frac{CF}{\bar{x} \pm SD}$	40	5.26±1.26	5.90±1.32*	p<0.05
	60	7.33±1.51	7.03±1.49	н.с.
	80	8.60±1.90	7.70±2.11*	p<0.05
	100	9.43±2.19	8.43±2.43*	p<0.05
	120	10.90±2.65	9.46±3.06*	p<0.05

У групи са дијабетесом промена вредности  $CF$  одвија се на исти начин као у контролној групи с тим да је статистички значајна разлика уочена на свим вредностима  $CPP$ . Табела број 57 и графикон број 12 Е.

**Табела број 57:** Ефекти спиринолактона на  $CF$  ( $ml/min$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	$CPP$ ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Дијабетес	Спиринолактон $0.1 \mu M$	
$CF$ $\bar{x} \pm SD$	40	5.26±1.26	5.90±1.32*	p<0.05
	60	7.73±1.87	7.03±1.49*	p<0.05
	80	8.60±1.90	7.86±2.37*	p<0.05
	100	10.13±2.38	8.60±2.70*	p<0.05
	120	11.86±2.93	9.80±3.56*	p<0.05

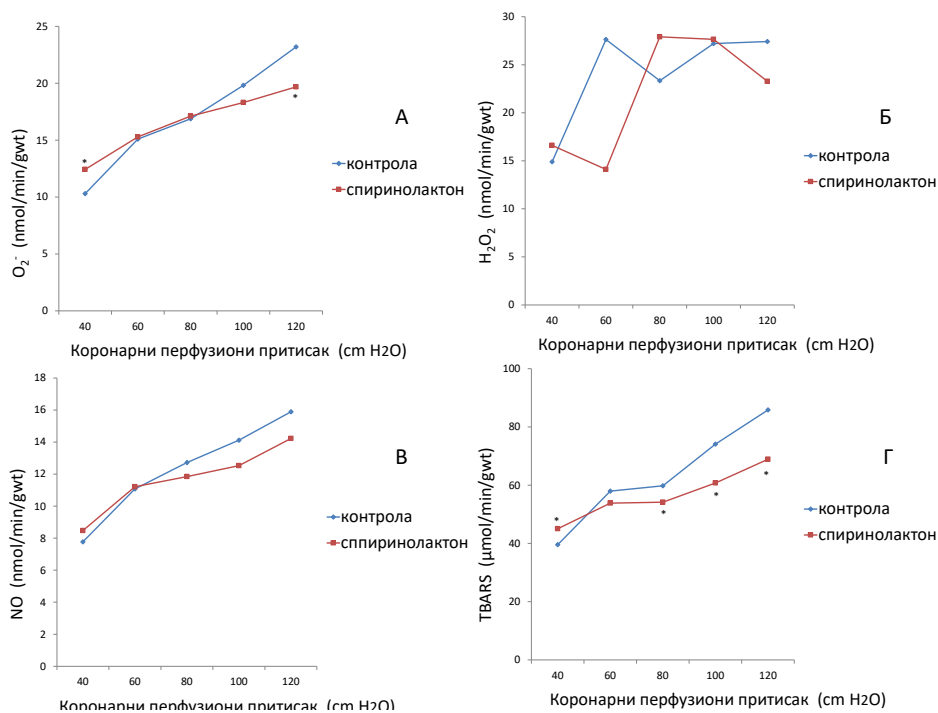
У контролној групи  $RPP$  спорије расте при порасту  $CPP$  након примене спиринолактона. Статистички значајно нижа вредност остварена је при  $CPP$  100  $cm H_2O$ . Табела број 58 и графикон број 11 Ж.

**Табела број 58:** Ефекти спиринолактона на  $RPP$  ( $mmHg \cdot bpm/1000$ ) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	$CPP$ ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Спиринолактон $0.1 \mu M$	
$RPP$ $\bar{x} \pm SD$	40	8.78±1.27	9.37±0.97	н.с.
	60	12.37±3.28	11.48±1.58	н.с.
	80	13.83±2.64	12.20±1.98	н.с.
	100	14.81±2.24	12.69±2.35*	p<0.05
	120	15.75±2.63	13.90±3.35	н.с.

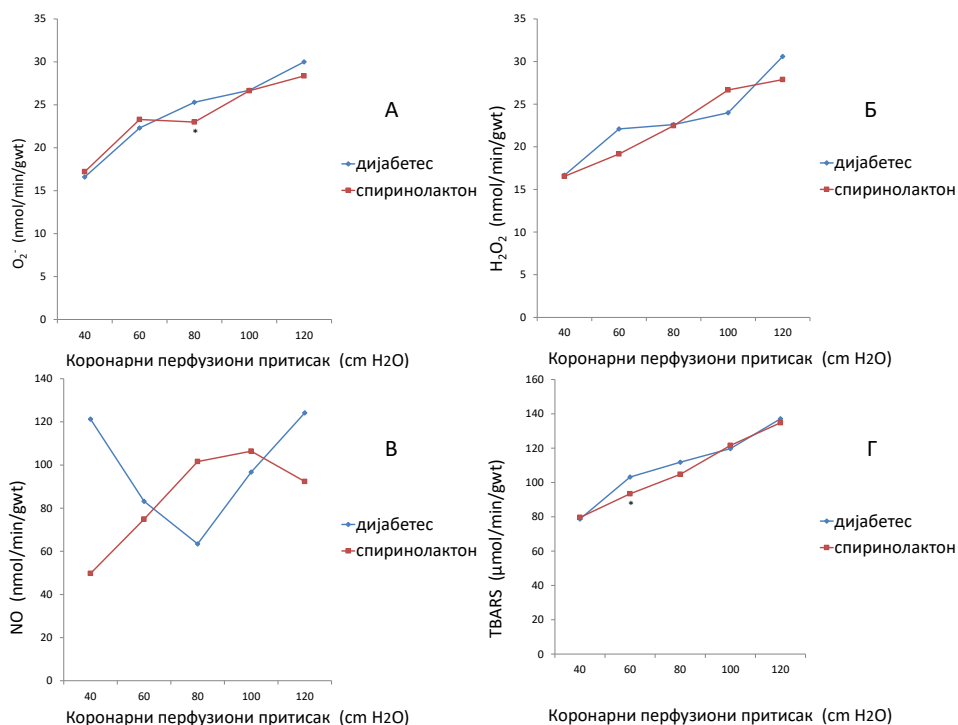
У групи са дијабетесом вредност  $RPP$  је нешто виша на  $CPP$  40  $cm H_2O$  да би затим на исти начин као у контролној групи спорије расла при порасту  $CPP$  али без достизања статистичке значајности разлике. Графикон број 12 Ж.

Супероксид анион у контролној групи је повећан након перфузије спиринолактоном на  $CPP$  40  $cm H_2O$  уз статистичку значајност. Са порастом  $CPP$  вредност се скоро изједначава на  $CPP$  60 и 80  $cm H_2O$  да би даље била нижа уз статистичку значајност при  $CPP$  120  $cm H_2O$ . Табела број 59 и графикон број 13 А.



Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Спиронолактон 0.1 $\mu M$	
$O_2^-$ $\bar{X} \pm SD$	40	10.29 $\pm$ 2.83	12.43 $\pm$ 2.93*	p<0.05
	60	15.10 $\pm$ 3.60	15.29 $\pm$ 3.59	н.с.
	80	16.88 $\pm$ 3.99	17.11 $\pm$ 4.77	н.с.
	100	19.82 $\pm$ 6.05	18.31 $\pm$ 5.19	н.с.
	120	23.20 $\pm$ 5.39	19.69 $\pm$ 7.14*	p<0.05

У групи са дијабетесом овај параметар расте на исти начин са променом CPP пре и након перфузије леком. Уочена је значајна разлика на CPP 80 cm H<sub>2</sub>O где вредност  $O_2^-$  након датог лека постаје нижа. Табела број 60 и графикон број 14 А.



**Графикон број 13:** Ефекти спиронолактона на параметре оксидационог стреса у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

**Табела број 60:** Ефекти спиронолактона на  $O_2^-$  ( $nmol/min/gwt$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Спиронолактон 0.1 μM	
$O_2^-$ $\bar{X} \pm SD$	40	16.63±4.80	17.22±4.71	н.с.
	60	22.31±5.42	23.33±5.32	н.с.
	80	25.28±6.05	23.07±5.96*	p<0.05
	100	26.72±6.68	26.64±7.25	н.с.
	120	30.02±7.52	28.36±7.83	н.с.

У контролној групи након перфузије спиронолактоном није забележена статистички значајна разлика. Вредности при CPP 60 H<sub>2</sub>O су различите али без значајности. Није уочен конзистентан ефекат на вредност H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Графикон број 13 Б.

У групи са дијабетесом водоник пероксид се није значајно мењао након примене спиринолактона а вредности су на исти начин расле при повећавању *CPP*. Графикон број 14 Б.

Перфузија спиринолактоном у групи контролних животиња не доводи до значајних разлика вредности *NO*. На *CPP 40 cm H<sub>2</sub>O* резултат је нешто виши а од *CPP 80-120* нижи него пре датог лека. У оба случаја нема статистички значајне разлике. Графикони број 13 В и 14 В.

Вредности *TBARS* расту са порастом *CPP* у контролној групи. Овај пораст је мање изражен након перфузије спиринолактоном тако да се значајно ниже вредности уочавају на *CPP 80-120 cm H<sub>2</sub>O*. Иницијално након перфузије спиринолактоном *TBARS* је значајно виши на *CPP 40 cm H<sub>2</sub>O* да би затим пораст вредности био мањи него пре датог лека. Табела број 61 и графикон број 13 Г.

**Табела број 61:** Ефекти спиринолактона на *TBARS* ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gwt}$ ) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Спиринолактон 0.1 $\mu\text{M}$	
<i>TBARS</i> $\bar{x} \pm SD$	40	39.60±7.44	45.06±7.92*	p<0.05
	60	57.95±13.01	53.86±10.56	н.с.
	80	59.77±9.24	54.14±10.92*	p<0.05
	100	74.13±17.89	60.76±20.85*	p<0.05
	120	85.87±23.10	68.93±20.63*	p<0.05

У групи са дијабетесом параметар расте на исти начин при промени *CPP* као пре додатог лека. Вредности су ниже на *CPP 60* и *80 cm H<sub>2</sub>O* од чега на *CPP 60 cm H<sub>2</sub>O* статистички значајно. Табела број 62 и графикон број 14 Г.

**Табела број 62:** Ефекти спиринолактона на *TBARS* ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gwt}$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Дијабетес	Спиринолактон 0.1 $\mu\text{M}$	
<i>TBARS</i> $\bar{x} \pm SD$	40	78.66±23.14	79.57±21.09	н.с.
	60	103.11±22.88	93.42±21.68*	p<0.05
	80	111.81±24.03	104.70±29.52	н.с.
	100	119.68±26.97	121.54±37.75	н.с.
	120	137.12±43.62	134.78±38.76	н.с.

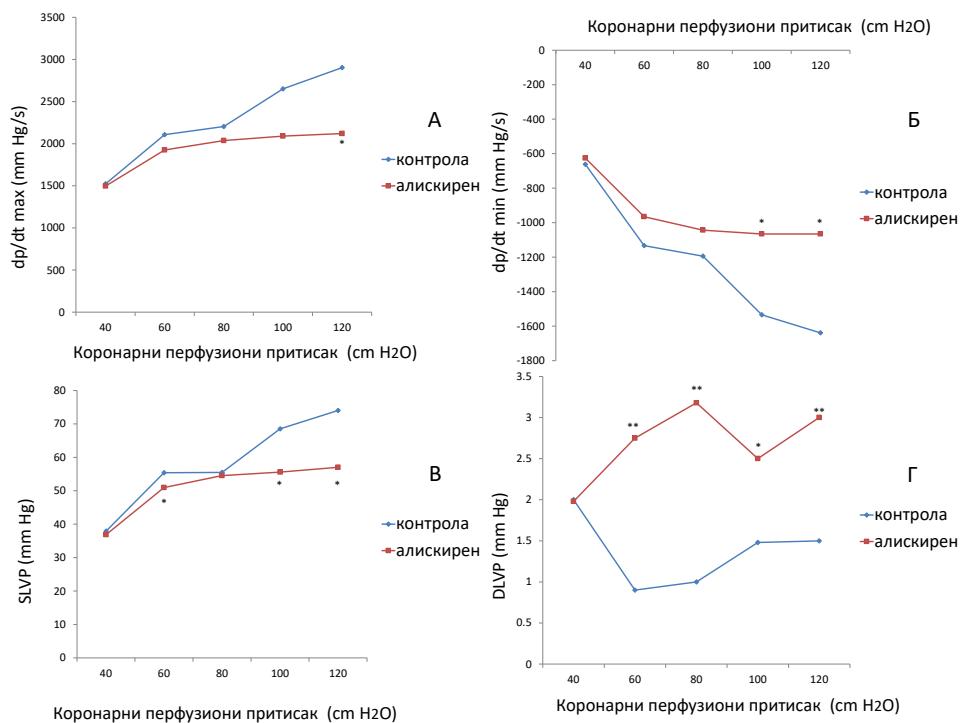
### 4.5. ЕФЕКТИ АЛИСКИРЕНА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ИЗОЛОВАНОМ СРЦУ ПАЦОВА СА СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ ИНДУКОВАНИМ ДИЈАБЕТЕСОМ

У контролној групи животиња додавање алискирена перфузионом раствору довело је до изостанка очекиваног пораста  $dp/dt\ max$  уз продубљивање разлике до сатистички значајне на  $CPP\ 120\ cm\ H_2O$ . Табела број 63 и графикон број 15 А.

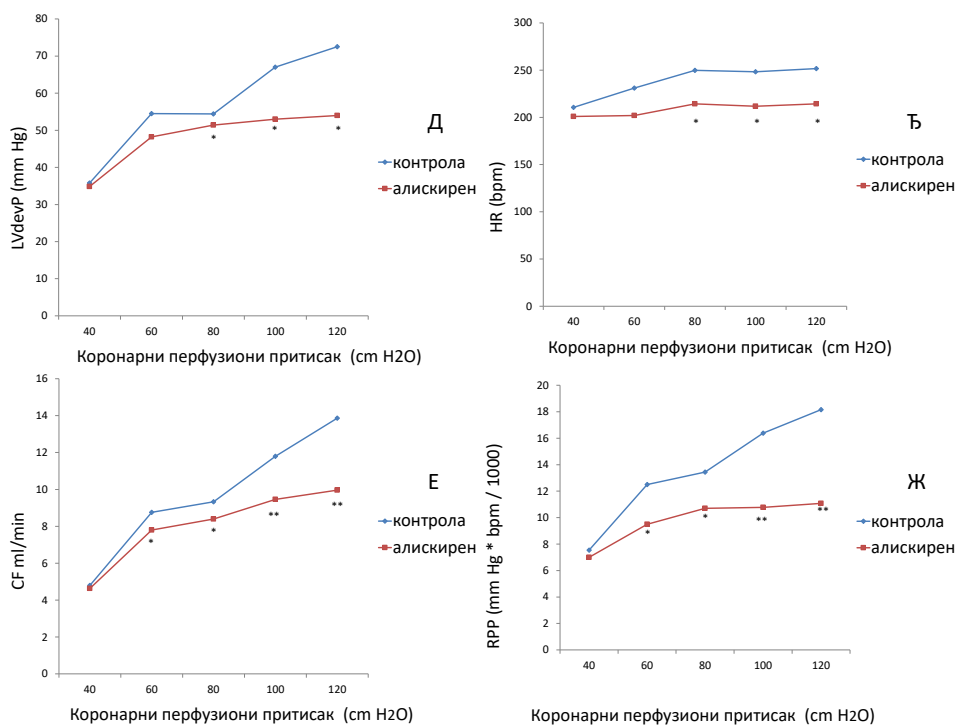
**Табела број 63:** Ефекти алискирена на  $dp/dt\ max$  (mm Hg/s) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 μM	
$dp/dt\ max$ $\bar{X} \pm SD$	40	1524.01±452.80	1497.50±449.17	н.с.
	60	2107.81±497.87	1926.33±629.50	н.с.
	80	2204.48±583.62	2037.51±704.21	н.с.
	100	2651.58±688.31	2091.73±645.86	н.с.
	120	2903.78±643.31	2121.51±637.48*	p<0.05

Са друге стране у групи са дијабетесом алискирен не само да не смањује  $dp/dt\ max$  већ доводи до пораста овог параметра уз статистичку значајност при  $CPP\ 60$  и  $80\ cm\ H_2O$ . Табела број 64 и графикон број 16 А.







**Графикон број 15:** Ефекти алискирена на кардиодинамске параметре у изолованом срцу пацова.

**Табела број 64:** Ефекти алискирена на  $dp/dt \max$  ( $mm \text{ Hg/s}$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Алискирен 1 $\mu\text{M}$	
$dp/dt \max$ $\bar{X} \pm SD$	40	1935.71 $\pm$ 342.5	1943.91 $\pm$ 359.72	н.с.
	60	2107.18 $\pm$ 434.19	2318.30 $\pm$ 452.45*	p < 0.05
	80	2279.70 $\pm$ 449.76	2531.13 $\pm$ 432.29*	p < 0.05
	100	2546.48 $\pm$ 452.75	2640.96 $\pm$ 582.85	н.с.
	120	2775.40 $\pm$ 566.71	2834.48 $\pm$ 550.90	н.с.

И  $dp/dt \min$  се у контролној групи мења попут  $dp/dt \max$ , са порастом CPP изостаје повећање брзине промене притиска и статистички значајн ниже вредности бележе се при CPP 100 и 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 65 и графикон број 15 Б.

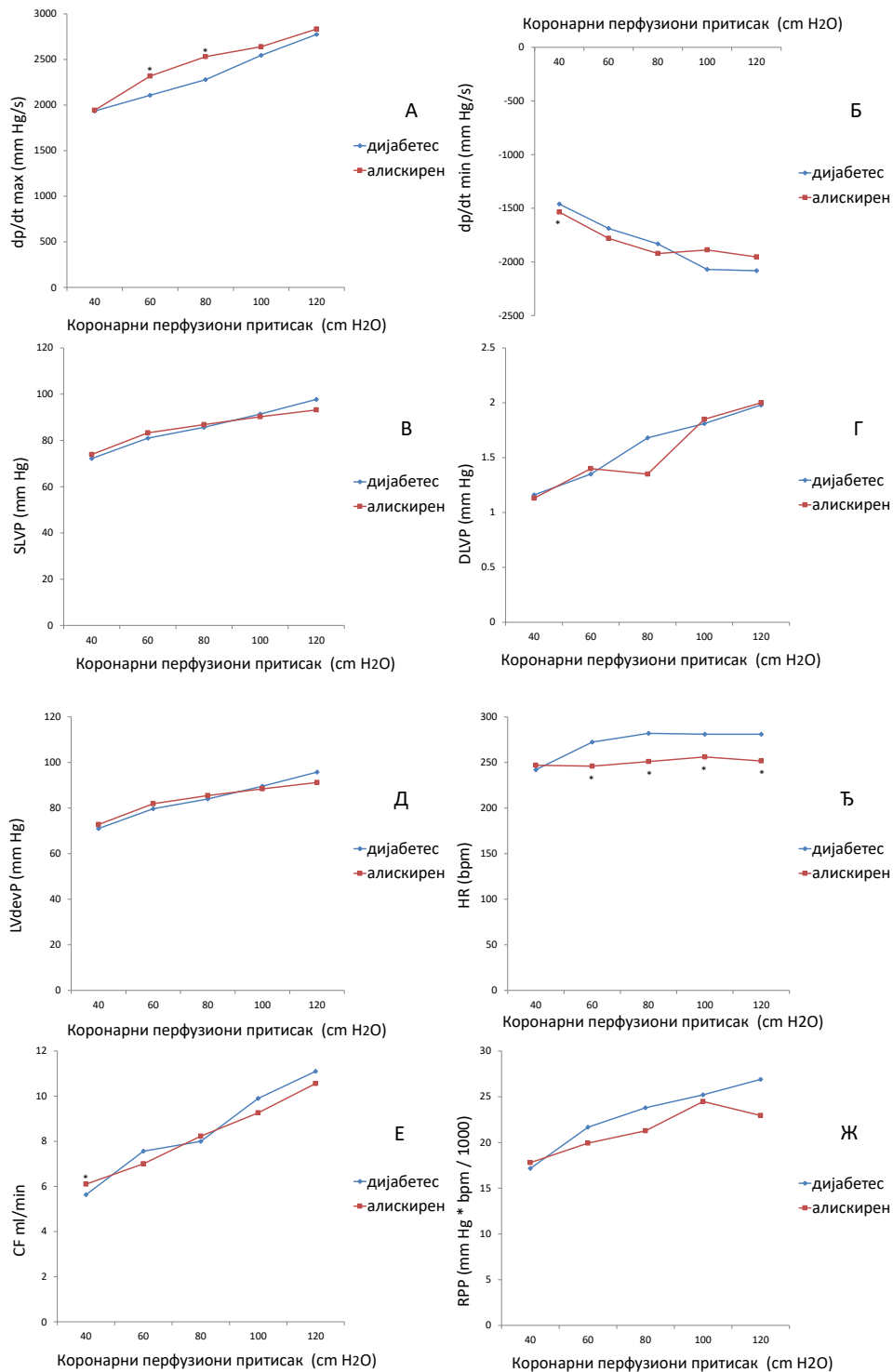
**Табела број 65:** Ефекти алискирена на  $dp/dt \min$  ( $mm \text{ Hg/s}$ ) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm \text{ H}_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен $1 \mu M$	
$dp/dt \min$ $\bar{x} \pm SD$	40	-662.26±223.87	-626.76±223.87	н.с.
	60	-1133.16±369.91	-965.80±357.08	н.с.
	80	-1194.88±361.07	-1043.93±414.18	н.с.
	100	-1534.50±365.01	-1066.21±415.41*	p<0.05
	120	-1639.60±369.73	-1066.66±391.61*	p<0.05

Сличност ефеката алискирена на  $dp/dt$  у дијабетичној групи се наставља и код овог параметра. Насупрот ефектима у контролној групи при CPP 40-80  $cm \text{ H}_2O$  вредност  $dp/dt \min$  је у порасту да би тек на CPP 100-120  $cm \text{ H}_2O$  била нижа него пре давања лека. Табела број 66 и графикон број 16 Б.

**Табела број 66:** Ефекти алискирена на  $dp/dt \min$  ( $mm \text{ Hg/s}$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm \text{ H}_2O$ )	Група		Значајност
		Дијабетес	Алискирен $1 \mu M$	
$dp/dt \min$ $\bar{x} \pm SD$	40	-1461.30±396.58	-1534.90±375.04*	p<0.05
	60	-1688.06±424.03	-1780.38±486.31	н.с.
	80	-1831.48±455.30	-1920.98±425.26	н.с.
	100	-2070.60±571.53	-1887.60±433.26	н.с.
	120	-2082.28±556.43	-1953.96±498.66	н.с.



**Графикон број 16:** Ефекти алискирена на параметре оксидационог стреса у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

*SLVP* у контролној групи није измењен перфузијом алискиреном на најнижем *CPP* да би након тога изостао порест вредности виђен без лека. Статистички значајно мање вредности су на *CPP* 60, 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 67 и графикон број 15 В.

**Табела број 67:** Ефекти алискирена на *SLVP* (*mm Hg*) у изолованом срцу пацова (р – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 $\mu$ M	
<i>SLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	37.90 $\pm$ 7.17	36.85 $\pm$ 7.25	н.с.
	60	55.40 $\pm$ 13.21	50.96 $\pm$ 11.78*	p<0.05
	80	55.48 $\pm$ 12.58	54.56 $\pm$ 14.00	н.с.
	100	68.51 $\pm$ 13.20	55.63 $\pm$ 16.85*	p<0.05
	120	74.01 $\pm$ 10.16	57.06 $\pm$ 18.34*	p<0.05

Перфузија алискиреном у групи са дијабетесом није довела до значајне промене вредности на свим *CPP*. Графикон број 16.

Алискирен значајно повећава *DLVP* у контролној групи изузев на *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O*. Статистички значајно на 100 *cm H<sub>2</sub>O* а високозначајно на 60, 80 и 120 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 68 и графикон број 15 Г.

**Табела број 68:** Ефекти алискирена на *DLVP* (*mm Hg*) у изолованом срцу пацова (р – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 $\mu$ M	
<i>DLVP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	2.08 $\pm$ 2.89	1.98 $\pm$ 2.84	н.с.
	60	0.91 $\pm$ 0.69	2.75 $\pm$ 4.53**	p<0.01
	80	1.08 $\pm$ 0.87	3.18 $\pm$ 4.82**	p<0.01
	100	1.48 $\pm$ 1.66	2.53 $\pm$ 3.20*	p<0.05
	120	1.51 $\pm$ 2.13	3.00 $\pm$ 3.63**	p<0.01

И за овај параметар није било значајне измене вредности након перфузије алискиреном у групин са хипергликемијом. Графикон број 16 Г.

*LVdevP* након перфузије леком није измењен на најнижем *CPP* да би затим био нижи уз статистичку значајност на *CPP* 60, 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 69 и графикон број 15 Д.

**Табела број 67:** Ефекти алискирена на *LVdevP* (*mm Hg*) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 $\mu$ M	
<i>LVdevP</i> $\bar{x} \pm SD$	40	35.81±9.84	34.86±9.88	н.с.
	60	54.48±13.84	48.21±15.52*	p<0.05
	80	54.40±13.22	51.38±17.74	н.с.
	100	67.03±14.30	53.10±18.89*	p<0.05
	120	72.50±11.53	54.06±19.41*	p<0.05

У групи са дијабетесом *LVdevP* се није мењао након перфузије алискиреном. Графикон број 16 Д.

У контролној групи након датог алискирена *HR* се снижава уз статистичку значајност на *CPP* 80-120 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 68 и графикон број 15 Ђ.

**Табела број 68:** Ефекти Алискирена на *HR* (bpm) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	<i>CPP</i> ( <i>cm H<sub>2</sub>O</i> )	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 $\mu$ M	
<i>HR</i> $\bar{x} \pm SD$	40	210.65±16.87	200.96 ±34.51	н.с.
	60	231.00±21.35	201.98±28.79	н.с.
	80	249.86±20.77	214.36 ±24.95*	p<0.05
	100	248.36±28.57	211.70±34.20*	p<0.05
	120	251.70±13.51	214.35±23.03*	p<0.05

Алискирен дат у перфузату у изолованим срцима групе са дијабетесом такође доводи до снижавања фреквенце уз статистичке значајност при *CPP* 60-120 *cm H<sub>2</sub>O*. Табела број 69 и графикон број 16 Ђ.

**Табела број 69:** Ефекти алискирена на  $HR$  (bpm) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Алискирен 1 μM	
$HR$ $\bar{x} \pm SD$	40	242.16±16.61	246.91±24.12	н.с.
	60	272.28±14.07	245.90±18.25*	p<0.05
	80	282.05±22.70	251.65±26.51*	p<0.05.
	100	281.10±14.95	256.10±26.99*	p<0.05.
	120	280.96±13.19	251.66±22.98*	p<0.05.

У контролној групи коронарни проток је смањен након перфузије алискиреном уз статистичку значајност при CPP 60-120 cm H<sub>2</sub>O. Високо значајне промене су на CPP 100 и 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 70 и графикон број 15 Е.

**Табела број 70:** Ефекти алискирена на  $CF$  (ml/min) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 μM	
$CF$ $\bar{x} \pm SD$	40	4.80±0.59	4.63±0.74	н.с.
	60	8.76±0.48	7.8±0.80*	p<0.05
	80	9.33±0.51	8.4±0.45*	p<0.05
	100	11.80±0.33	9.46±0.60**	p<0.01
	120	13.86±0.65	9.96±0.74**	p<0.01

Са друге стране у групи са дијабетесом алискирен доводи до значајног пораста коронарног протока на CPP 40 cm H<sub>2</sub>O, у даљем току нема значајних измена на вишим CPP. Табела број 71 и графикон број 16 Е.

RPP је нижи након перфузије алискиреном при свим CPP а статистичка значајност се уочава на 60-120 cm H<sub>2</sub>O уз високу значајност на 100 и 120 cm H<sub>2</sub>O. Табела број 72 и графикон број 15 Ж.

**Табела број 71:** Ефекти алискирена на  $CF$  (ml/min) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Алискирен 1 μM	
$\frac{CF}{\bar{x} \pm SD}$	40	5.63±0.78	6.10±1.14*	p<0.05
	60	7.56±1.38	7.03±1.48	н.с.
	80	8.06±1.45	8.23±1.87	н.с.
	100	9.90±2.15	9.26±2.39	н.с.
	120	11.10±2.56	10.56±2.82	н.с.

Табела број 72: Ефекти алискирена на RPP (mmHg\*bmp/1000) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

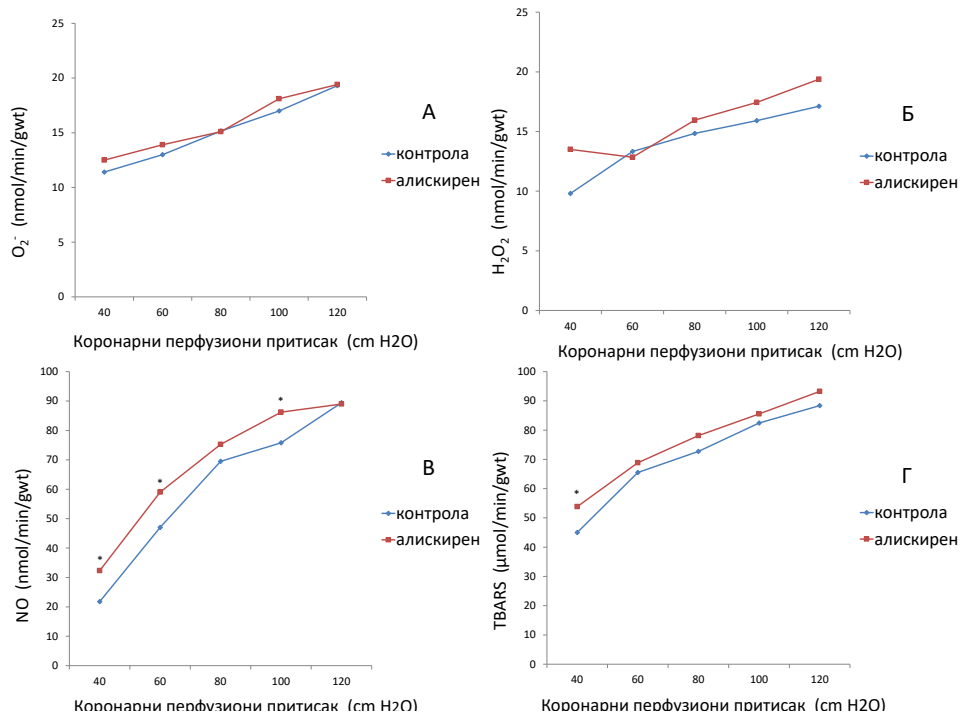
Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 μM	
$\frac{RPP}{\bar{x} \pm SD}$	40	7.54±2.1	7.06±2.33	н.с.
	60	12.50±3.03	9.49±2.53*	p<0.05
	80	13.44±2.71	10.70±3.40*	p<0.05
	100	16.38±2.50	10.77±3.74**	p<0.01
	120	18.16±2.41	11.08±4.00**	p<0.01

У групи са дијабетесом изузев на најнижем CPP алискирен је довео до смањења RPP али без статистичке значајности. Графикон број 16 Ж. У контролној групи O<sub>2</sub><sup>-</sup> је благо повишен након перфузије алискиреном али без статистичке значајности. Графикон број 17 А.

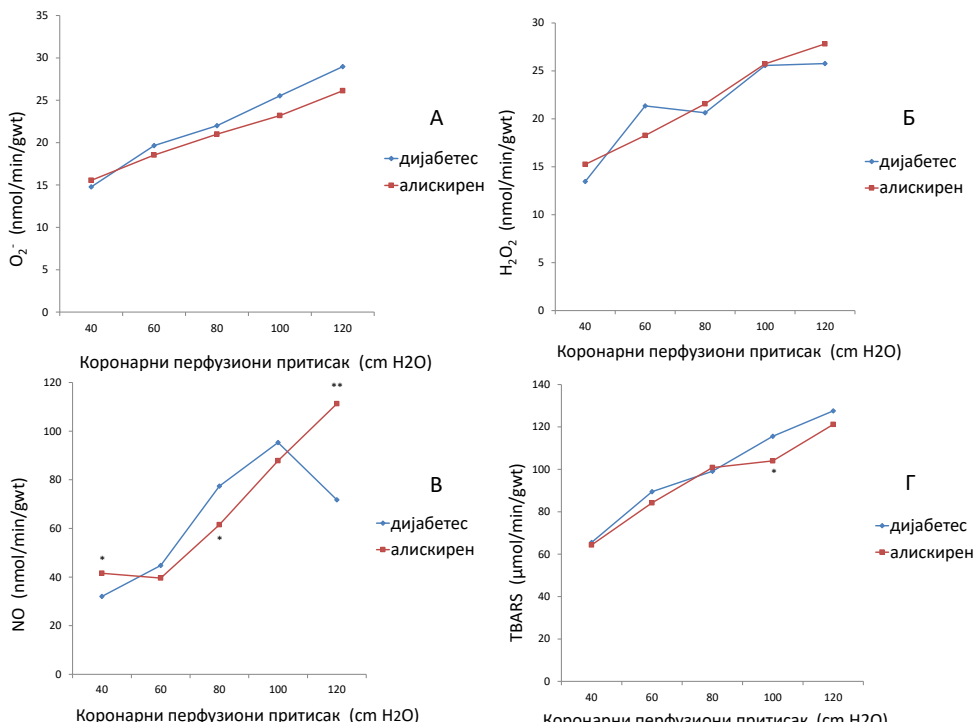
Перфузија алискиреном у групи са дијабетесом доводи до благог снижавања O<sub>2</sub><sup>-</sup> без статистичке значајности. Графикон број 17 Б.

Перфузија алискиреном доводи до пораста H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при свим CPP (сем на 60 cm H<sub>2</sub>O) у контролној групи без статистичке значајности. Графикон број 17 Б. У групи са дијабетесом H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> осцилира али није значајно измењен перфузијом алискиреном. Графикон број 18 Б.

Азот оксид је повишен у контролној групи након давања алискирена кроз перфузат уз статистичку значајност при CPP 40, 60 и 100 cm H<sub>2</sub>O. Табела број и графикон број 17 В. Вредности NO након перфузије алискиреном у групи са дијабетесом су неконзистентне, повишене су на CPP 40 и 120 cm H<sub>2</sub>O а снижена на осталим притисцима. Графикон број 18 Г.



**Графикон број 17:** Ефекти алискирена на параметре оксидационог стреса у изолованом срцу пацова.





**Графикон број 18:** Ефекти алискирена на параметре оксидационог стреса у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

**Табела број 73:** Ефекти алискирена на  $NO$  ( $nmol/min/gwt$ ) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 $\mu M$	
$NO$ $\bar{x} \pm SD$	40	21.83 $\pm$ 5.76	32.31 $\pm$ 7.58*	p<0.05
	60	47.00 $\pm$ 9.21	59.06 $\pm$ 7.83*	p<0.05
	80	69.52 $\pm$ 8.44	75.27 $\pm$ 10.30	н.с
	100	75.81 $\pm$ 10.18	86.22 $\pm$ 8.82*	p<0.05
	120	89.38 $\pm$ 15.21	89.06 $\pm$ 16.46	н.с

**Табела број 111:** Ефекти алискирена на  $NO$  ( $nmol/min/gwt$ ) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP ( $cm H_2O$ )	Група		Значајност
		Дијабетес	Алискирен 1 $\mu M$	
$NO$ $\bar{x} \pm SD$	40	32.02 $\pm$ 12.05	41.56 $\pm$ 10.01*	p<0.05
	60	44.74 $\pm$ 14.67	39.56 $\pm$ 15.58	н.с.
	80	77.40 $\pm$ 16.90	61.54 $\pm$ 16.58*	p<0.05
	100	95.31 $\pm$ 19.25	87.83 $\pm$ 22.54	н.с.
	120	71.72 $\pm$ 26.45	111.29 $\pm$ 27.09**	p<0.01

$TBARS$  након перфузије изолованих срца алискиреном у здравој групи је повишен уз статистичку значајност при CPP 40  $cm H_2O$ . Табела број 112 и графикон број 107.

Са друге стране  $TBARS$  је снижен у групи са дијабетесом а статистичка значајност је уочена при CPP 100  $cm H_2O$ . Табела број 75 и графикон број 18 Г.

**Табела број 74:** Ефекти алискирена на  $TBARS$  ( $\mu mol/min/gwt$ ) у изолованом срцу пацова (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Контрола	Алискирен 1 μM	
<i>TBARS</i> $\bar{x} \pm SD$	40	44.97±7.10	53.85±7.00*	p<0.05
	60	65.53±8.12	68.87±7.94	н.с.
	80	72.70±11.08	78.13±10.01	н.с.
	100	82.42±11.30	85.52±12.22	н.с.
	120	88.40±13.75	93.24±13.05	н.с.

**Табела број 75:** Ефекти алискирена на *TBARS* (μmol/min/gwt) у изолованом срцу пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом. (p – значајност, н.с. – несигнификантно).

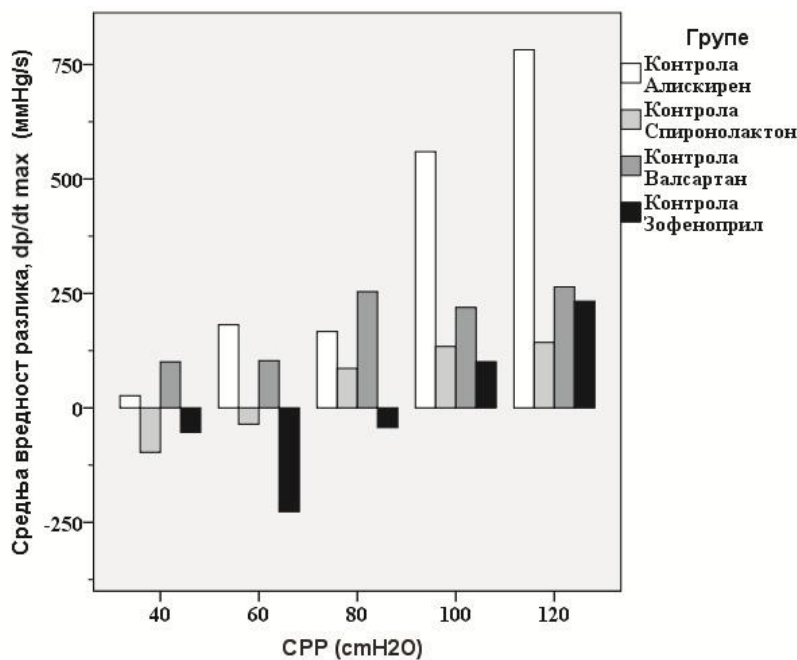
Посматрани параметар	CPP (cm H <sub>2</sub> O)	Група		Значајност
		Дијабетес	Алискирен 1 μM	
<i>TBARS</i> $\bar{x} \pm SD$	40	65.50±8.5	64.29±16.04	н.с.
	60	89.46±17.8	84.18±8.26	н.с.
	80	99.11±21.76	100.82±12.33	н.с.
	100	115.59±17.61	104.07±16.81*	p<0.05
	120	127.56±19.81	121.14±17.90	н.с.

#### 4.6. УПОРЕДНА АНАЛИЗА ЕФЕКТА ПРЕФУЗИЈЕ СА ИСПИТИВАНИМ ЛЕКОВИМА У ИЗОЛОВАНОМ СРЦУ ПАЦОВА СА СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ ИЗАЗВАНИМ ДИЈАБЕТЕСОМ

Вредности разлика параметара пре и током перфузије лековима су престављене на графикону ради лакшег сагледавања и одвојене према групама животиња, здраве и са дијабетесом.

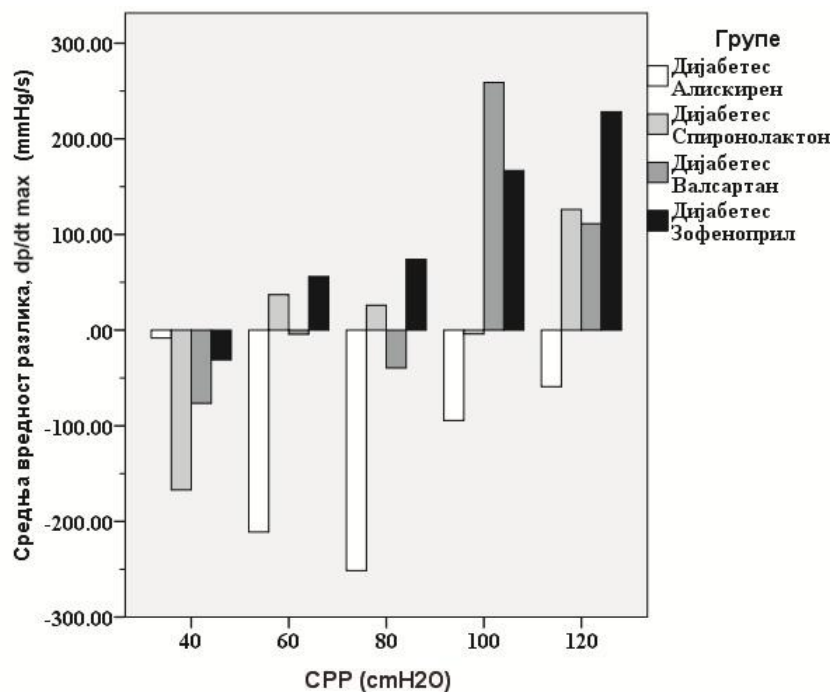
##### 4.6.1. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА *DP/DT MAX*

Код контролне групе уочавамо да алискирен и валсартан доводе до пораста разлике са повећањем *CPP* и при свим *CPP*. Овај пад *dp/dt max* на примену лека је израженији код алискирена. Спиринолактон за *CPP* 40 и 60 cm H<sub>2</sub>O и зофрноприл за *CPP* cm H<sub>2</sub>O за 40-80 доводе до негативне разлике односно до пораста *dp/dt max* након перфузије леком. Графикон број 19.



**Графикон број 19:** Упоредне вредности разлика  $dp/dt_{max}$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

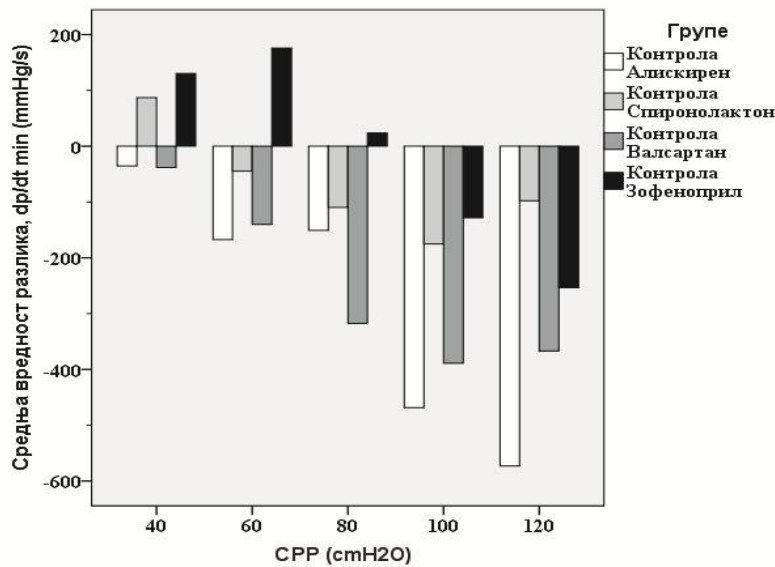
Насупрот резултатима код здравих пацова, у групи са дијабетесом алискирен доводи до негативне разлике при свим притисцима а код примене зофеноприла сем на  $CPP$  40  $cm H_2O$  разлика постаје позитивна односно перфузија леком умањује  $dp/dt_{max}$ , највише при највећим  $CPP$ . Исти образац се понавља и за валсартан, али је овде разлика негативна од  $CPP$  40-80  $cm H_2O$ , а позитивна  $CPP$  100 и 120  $cm H_2O$ . Графикон број 20.



**Графикон број 20:** Упоредне вредности разлика  $dp/dt_{max}$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

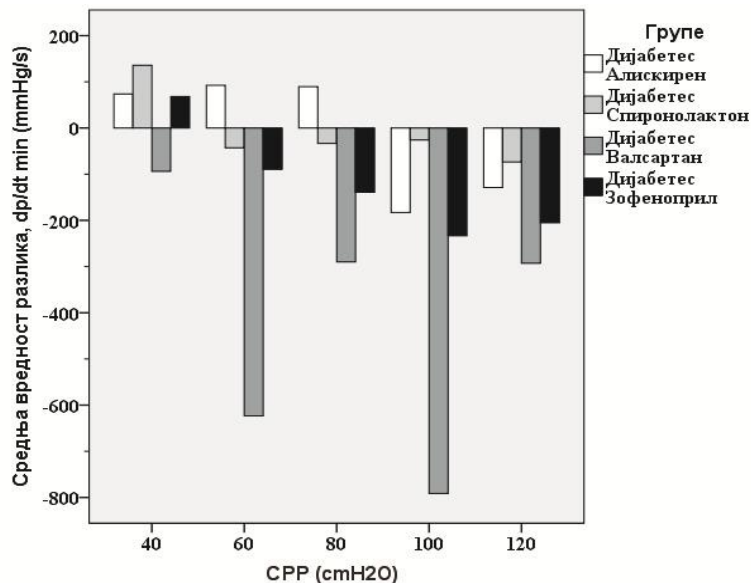
#### 4.6.2. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА $DP/DT_{MIN}$

Када се посматра  $dp/dt_{min}$  у контролној групи повећање брзине промене притиска се уочава код зофеноприла на  $CPP$  40-80  $cm H_2O$  и спиринолактона 40  $cm H_2O$ , након овога за оба лека долази до негативизације разлике, односно смањења брзине промене притиска. Ефекат је израженији за зофеноприл, алискирен и валсартан доводе до успоравања  $dp/dt_{min}$  при свим  $CPP$  а нешто израженији је ефекат алискирена. Графикон број 21.



**Графикон број 21:** Упоредне вредности разлика  $dp/dt \min$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

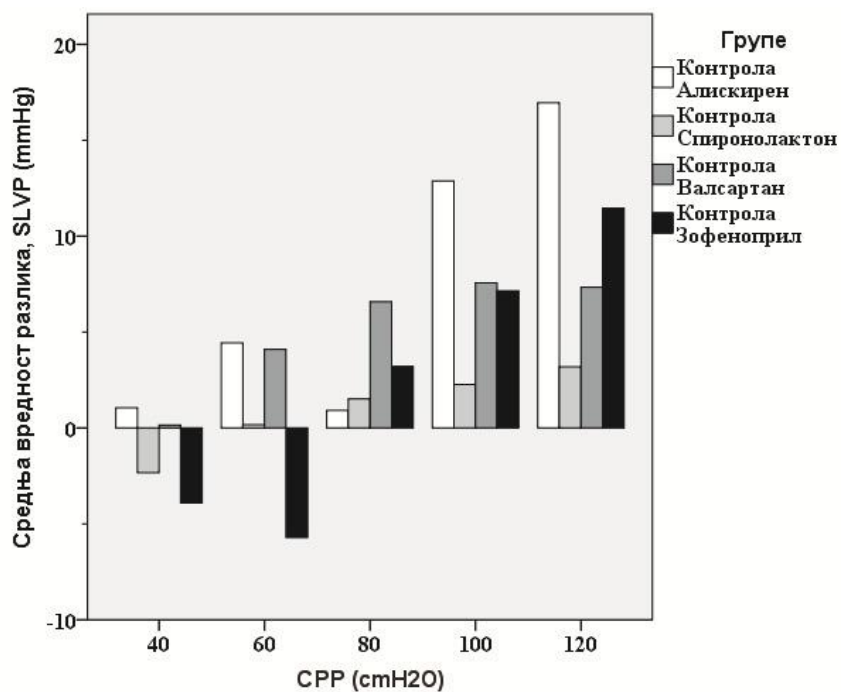
У групама са дијабетесом валсартан има најснажнији ефекат успоравања брзине промене притиска. спинолактон и зофеноприл на  $CPP$  40  $cm H_2O$  доводе до привременог убрзања  $dp/dt \min$  да би при осталим притисцима и ови лекови водили стањивању  $dp/dt \min$ . Алискирен при  $CPP$  40-80  $cmH_2O$  убрзава  $dp/dt \min$  да би на  $CPP$  100 и 120  $cm H_2O$  доводио до смањења ове брзине. Графикон број 22.



**Графикон број 22:** Упоредне вредности разлика  $dp/dt \min$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

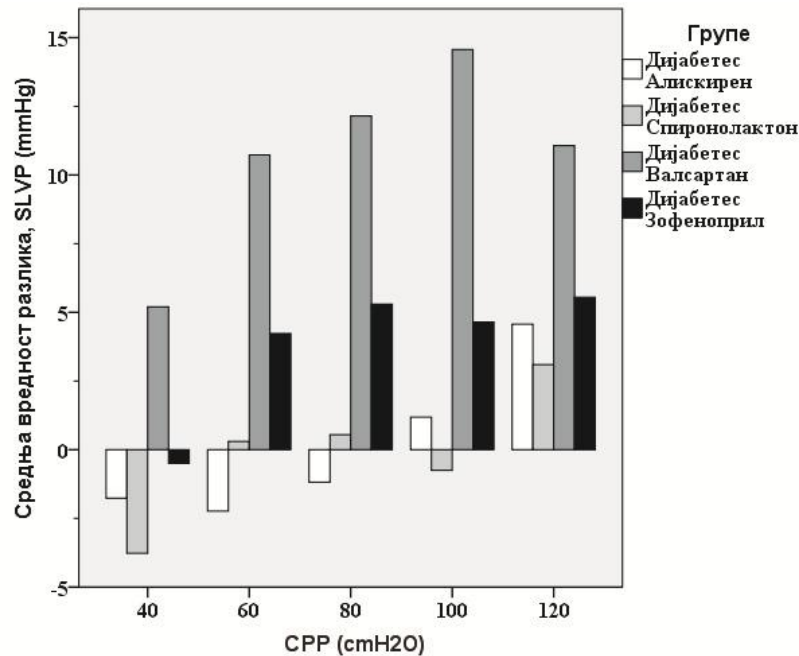
### 4.6.3. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА *SLVP*

Најизраженији ефекат на смањење *SLVP* код здравих пацова има алискирен и овај ефекат расте са порастом *CPP*. На исти начин делује валсартан уз нешто ниже разлике у односу на алискирен. Зофеноприл на *CPP* 40-60 *cm H<sub>2</sub>O* и спиронолактон на 40 *cmH<sub>2</sub>O* повећавају *SLVP* да би потом и они водили смањењу *SLVP* на вишим *CPP*. Ефекат зофеноприла је израженији у односу на спиронолактон. Графикон број 23.



**Графикон број 23:** Упоредне вредности разлика *SLVP* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

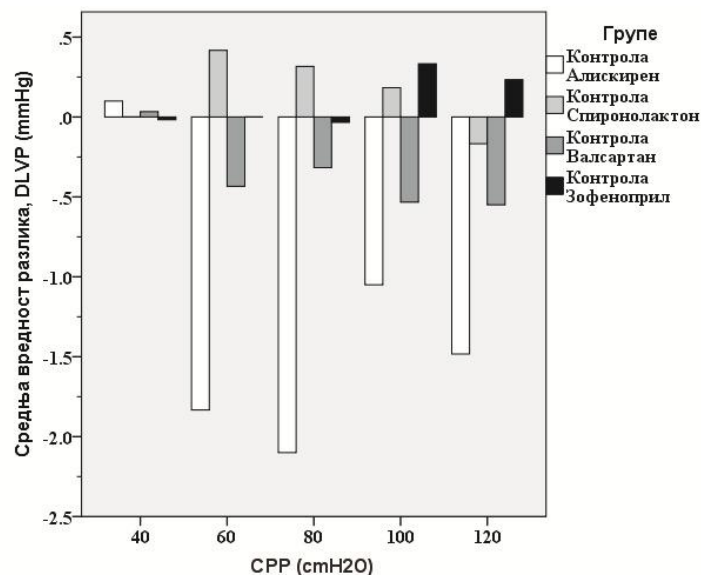
Код пацова за дијабетесом најизраженији ефекат на смањење *SLVP* има валсартан док се ефекат алискирена знатно ублажава и мења при *CPP* 40-80 *cm H<sub>2</sub>O* где у овој групи доводи до повећања *SLVP*. Паралелизам ефеката спиронолактона и зофеноприла се наставља и код овог параметра па су вредности *SLVP* повећане при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* да би затим доводиле до смањења *SLVP* на вишим *CPP*. Израженије је дејство зофеноприла. Графикон број 24.



**Графикон број 24:** Упоредне вредности разлика *SLVP* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

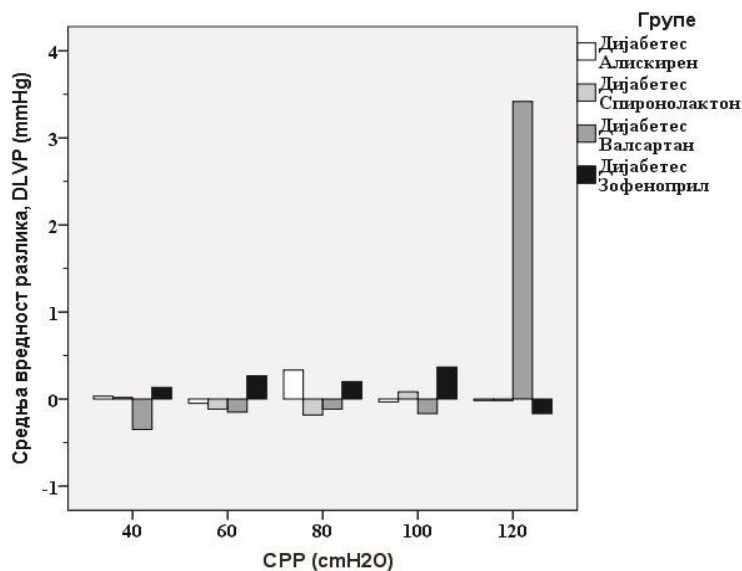
#### 4.6.4. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА *DLVP*

Када је у питању *DLVP* у контролној групи разлике су незнатне на *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* да би затим на *CPP* 60-120 *cm H<sub>2</sub>O* алискирен и валсартан довели до пораста *DLVP* при чему је ефекат алискирена израженији. зофеноприл *стањује DLVP* на *CPP* 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* а спиринолактон при *CPP* 60-100 *cm H<sub>2</sub>O*. Графикон број 25.



**Графикон број 25:** Упоредне вредности разлика *DLVP* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

У групи са дијабетесом ефекти на *DLVP* нису изражени сем изоловане вредности на 120 *cm H<sub>2</sub>O* за валсартан када је забележен нагли пад *DLVP*. При *CPP* 40-100 *cm H<sub>2</sub>O* Зофеноприл доводи до благог смањења *DLVP* а валсартан до пораста вредности *DLVP*. Зофеноприл при овом притиску доводи до благог пораста *DLVP*. Графикон број 26.

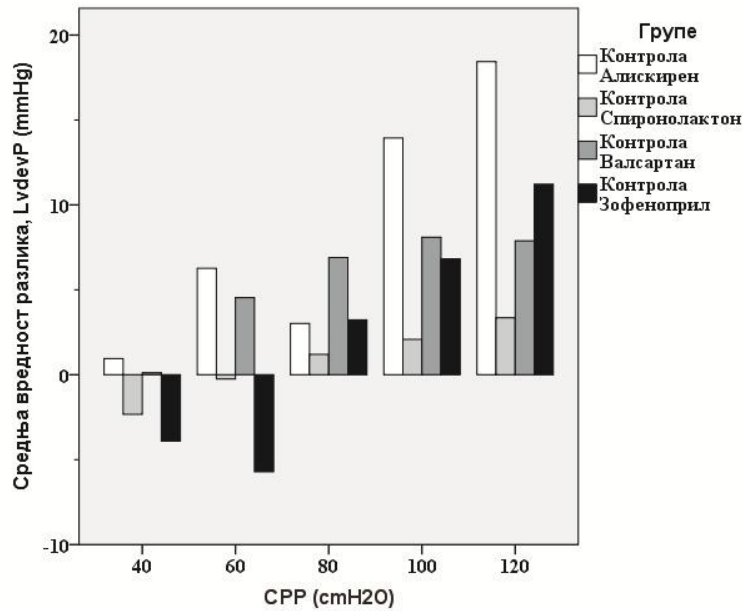


**Графикон број 26:** Упоредне вредности разлика *DLVP* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

#### 4.6.5. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА *LVdevP*

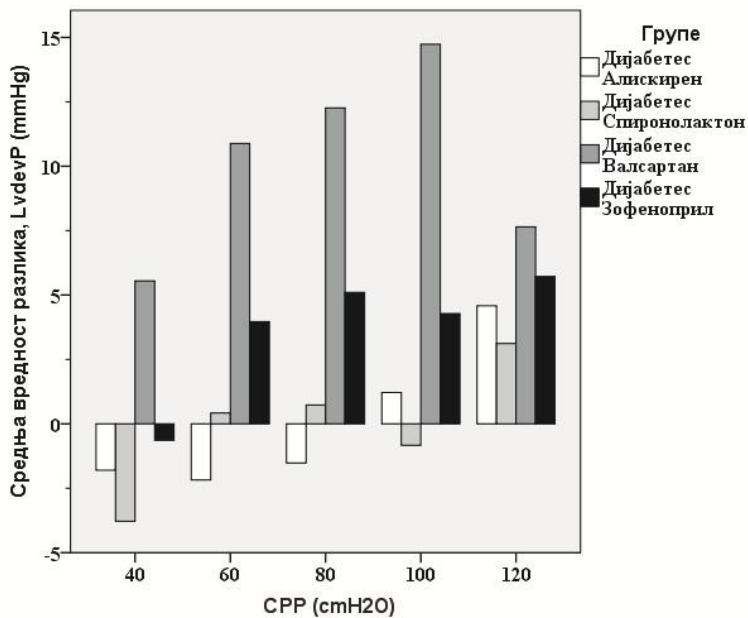
Највећи ефекат на смањење *LVdevP* код здравих пацова има алискирен и овај ефекат расте са порастом *CPP*. На исти начин делује валсартан уз нешто ниже разлике у односу на алискирен. Зофеноприл на *CPP* 40-60 *cm H<sub>2</sub>O* и спиринолактон на 40 *cm H<sub>2</sub>O* повећавају *LVdevP* да би потом и они водили смањењу *LVdevP* на вишим *CPP*. Ефекат зофеноприла је израженији у односу на спиринолактон. Графикон број 27.





**Графикон број 27:** Упоредне вредности разлика *LVdevP* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

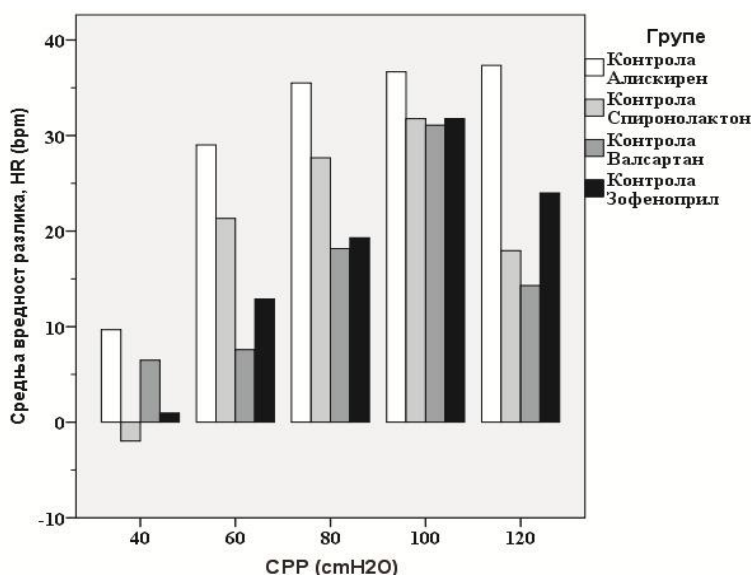
Код пацова за дијабетесом најизраженији ефекат на смањење *LVdevP* има валсартан док се ефекат алискирена знатно ублажава и мења при *CPP* 40-80 *cm H<sub>2</sub>O* где у овој групи доводи до повећања *LVdevP*. Вредности *LVdevP* код спиронолактона и зофеноприла су повећане при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* да би затим доводиле до смањења *LVdevP* на вишим *CPP*. Израженије је дејство Зофеноприла. Графикон број 28.



**Графикон број 28:** Упоредне вредности разлика  $LVdevP$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

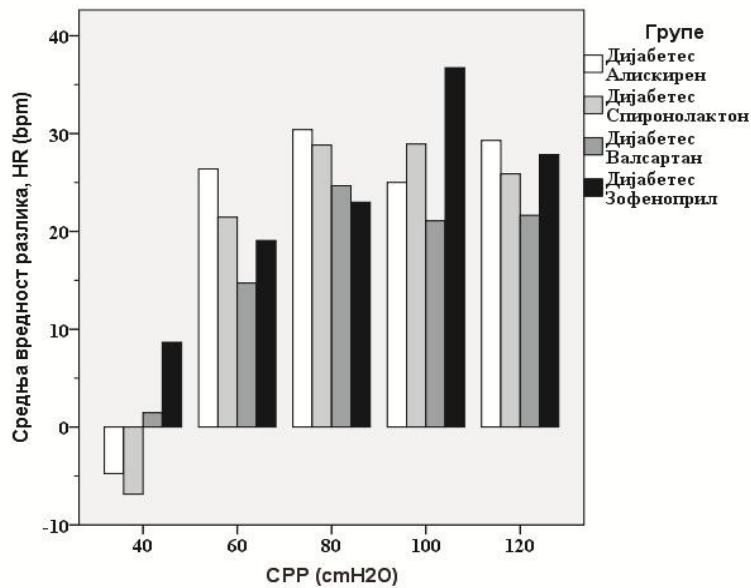
#### 4.6.6. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА $HR$

Практично сви лекови након перфузије утичу на пад  $HR$  код контролних животиња изузев спиронолактона на најнижем  $CPP$ . Најизраженији ефекат има алискирен. Графикон број 29.



**Графикон број 29:** Упоредне вредности разлика  $HR$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

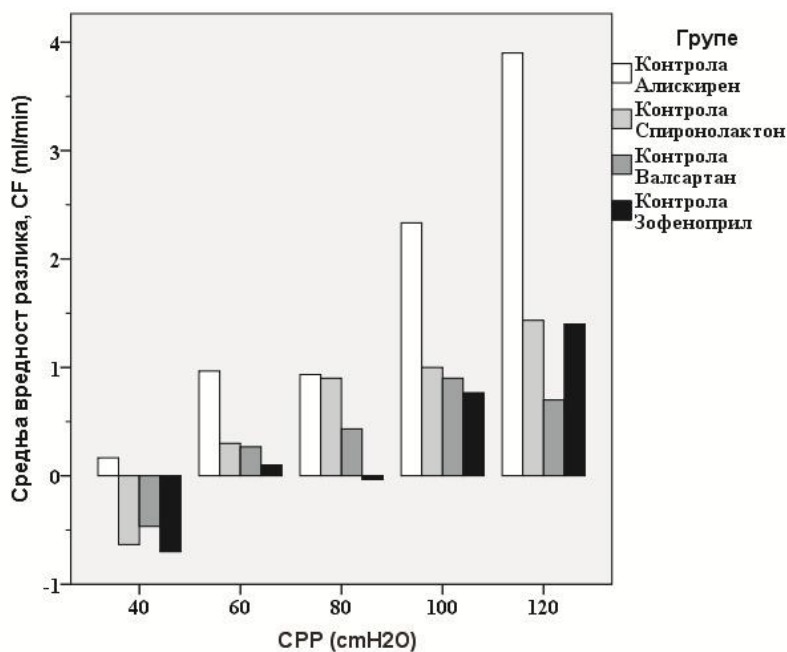
У групи са дијабетесом на  $CPP$  40  $cm H_2O$  поред спиронолактона и алискирен доводи до благог пораста фреквенце. При вишим  $CPP$  перфузија свим испитиваним лековима доводи до смањења фреквенце у овој групи без израженијих разлика међу лековима. Графикон број 30.



**Графикон број 30:** Упоредне вредности разлика *HR* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

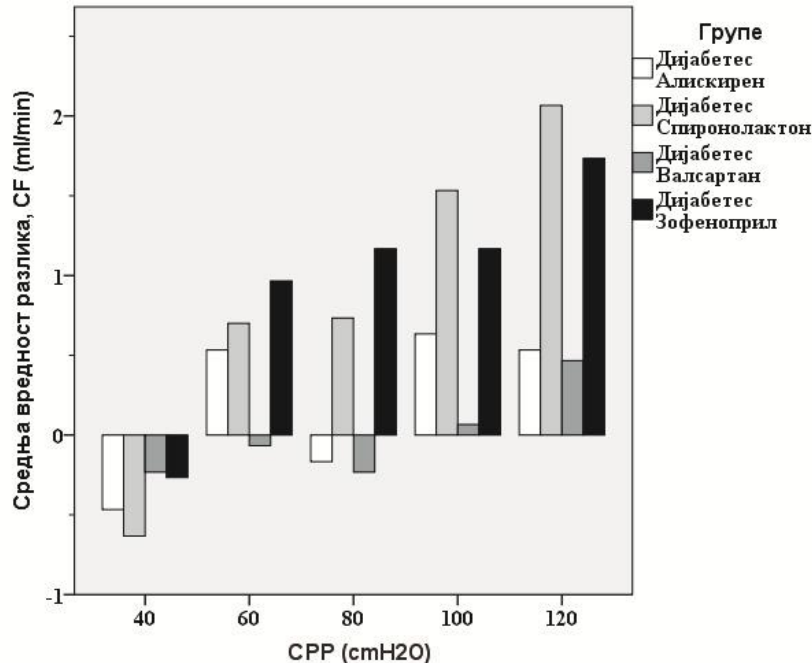
#### 4.6.7. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА *CF*

Коронарни проток код здравих пацова је најизраженије смањен дејством алискирена и овај ефекат расте са порастом *CPP*. На најнижем *CPP* спиринолактон, валсартан и зофеноприл доводе до пораста *CF* да би при вишим *CPP* сви лекови доводили до мањег *CF*. Графикон број 31.



**Графикон број 31:** Упоредне вредности разлика  $CF$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

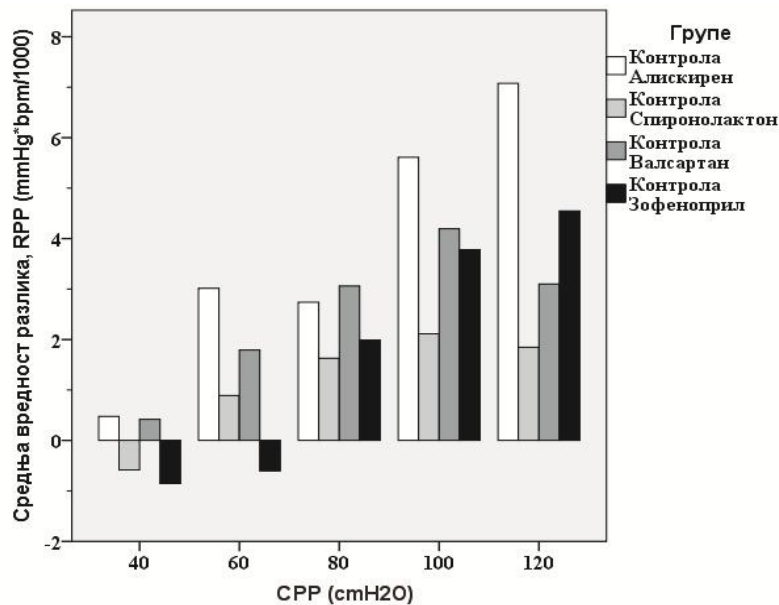
Код пацова са дијабетесом валсартан повећава  $CF$  на  $CPP$  40-80  $cm H_2O$  а остали лекови само при  $CPP$  40  $cm H_2O$ . Алискирен, спиронолактон и зофеноприл смањују  $CF$  на  $CPP$  60-120  $cm H_2O$ . валсартан доводи до смањења  $CF$  при  $CPP$  100 и 120  $cm H_2O$ . Израженији ефекат на смањење  $CF$  од осталих имају зофеноприл и спиронолактон. Графикон број 32.



**Графикон број 32:** Упоредне вредности разлика  $CF$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

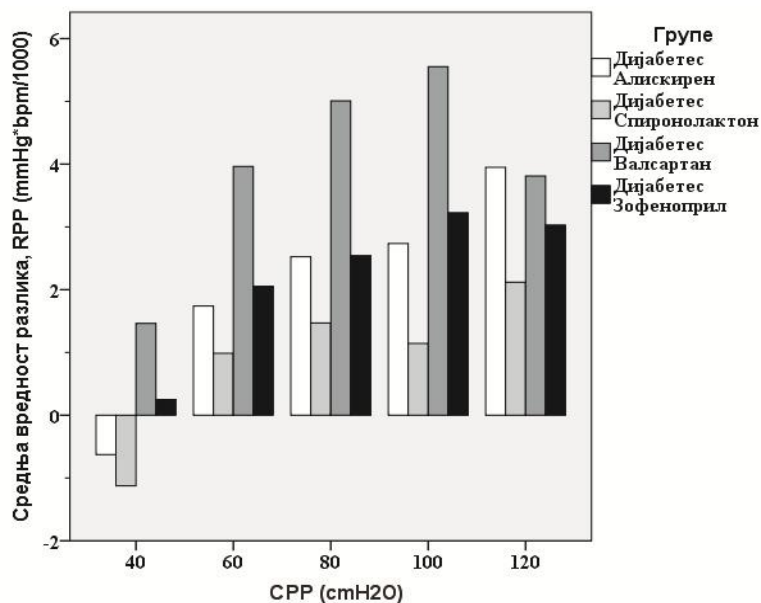
#### 4.6.8. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА $RPP$

$RPP$  је параметар напрезања зида леве коморе. Код здравих пацова перфузија спиронолактона на 40  $cm H_2O$  и зофеноприла на  $CPP$  40 и 60  $cm H_2O$  доводи до благог пораста параметра да би остали лекови при свим а зофеноприл и спиронолактон при  $CPP$  80-120  $cm H_2O$  доводили до смањења  $RPP$ . Ефекат је најизраженији за алискирен. Графикон број 33.



**Графикон број 123:** Упоредне вредности разлика  $RPP$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

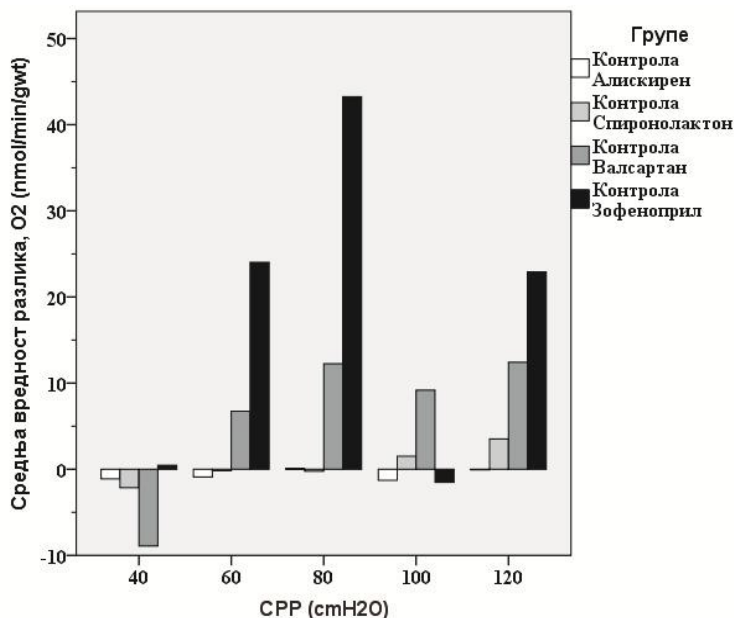
Са друге стране у групи са дијабетесом пораст  $RPP$  се бележи при најнижем  $CPP$  код алискирена и спиринолактона а при вишим  $CPP$  сви лекови доводе до пада  $RPP$  а највише валсартан. Графикон број 34.



**Графикон број 34:** Упоредне вредности разлика  $RPP$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

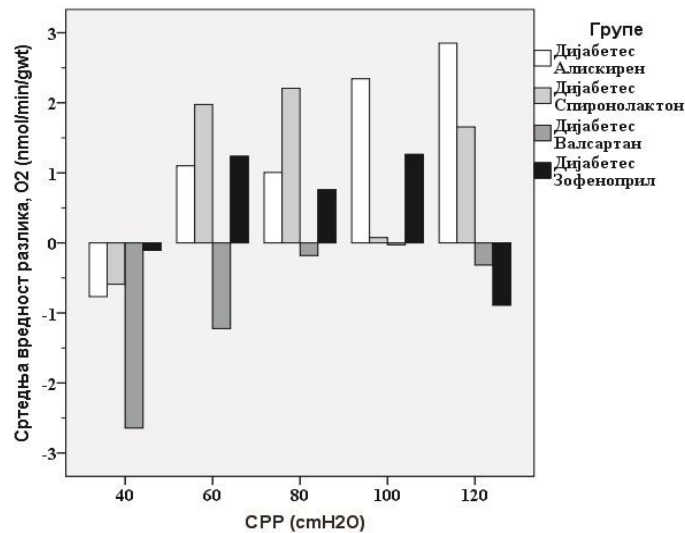
#### 4.6.9. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА $O_2^-$

У контролној групи уочава се ефекат зофеноприла и валсартана на смањење концентрације  $O_2^-$ . Ефекат зофеноприла је израженији. Остали лекови имају незнатан ефекат. Примећујемо пораст параметра након дејства валсартана при  $CPP$  40  $cm H_2O$ . Графикон број 35.



**Графикон број 35:** Упоредне вредности разлика  $O_2^-$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

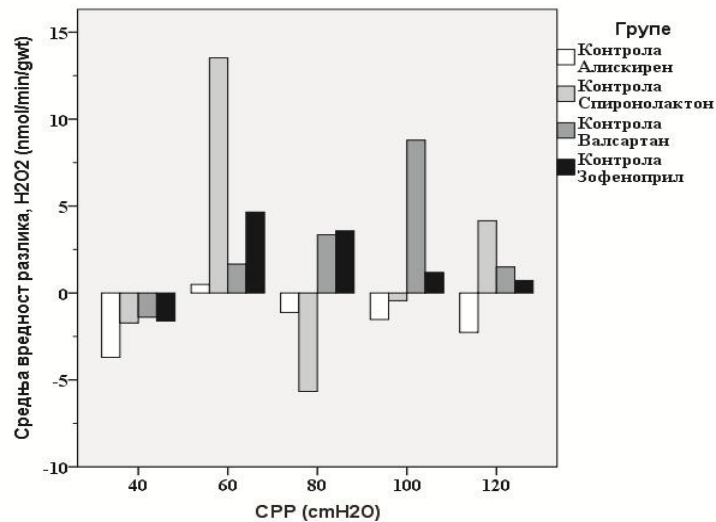
За разлику од контролне групе у дијабетесу валсартан доводи до пораста концентрације  $O_2^-$  у коронарном ефлуенту. Код свих лекова на најнижем  $CPP$  се уочава пораст параметра а при средњим и вишим вредностима  $CPP$  алискирен и спинолактон доводе до пада  $O_2^-$ . зофеноприл у групи дијабетичних животиња смањује  $O_2^-$  на  $CPP$  60-100  $cm H_2O$  уз поновно повећање вредности параметра на највишем  $CPP$ . Графикон број 36.



**Графикон број 36:** Упоредне вредности разлика  $O_2^-$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

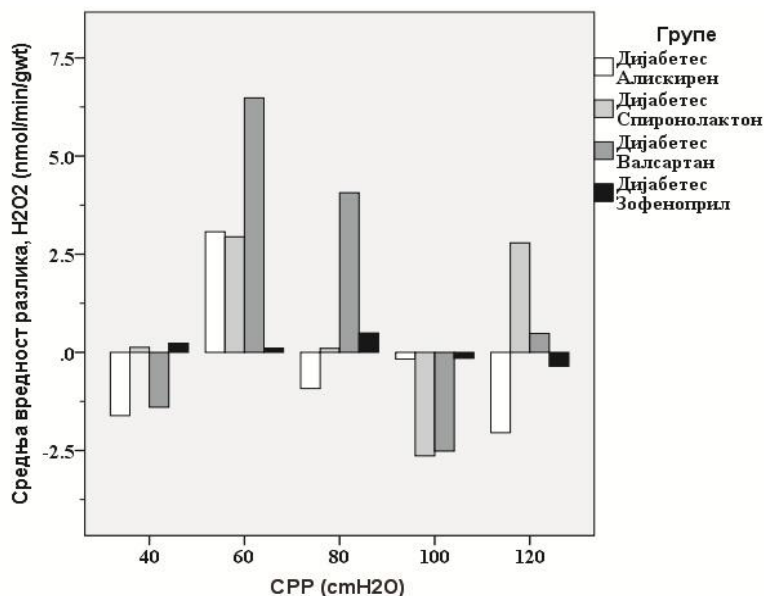
#### 4.6.10. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА $H_2O_2$

У групи здравих животиња  $H_2O_2$  благо расте под дејством алискирена. Вредности  $H_2O_2$  за спиринолактон су неконзистентне а код зофеноприла и валсартана се уочава стањење  $H_2O_2$  на CPP 60-120 cm H<sub>2</sub>O. Графикон број 37.



**Графикон број 37:** Упоредне вредности разлика  $H_2O_2$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

У групи којој је индукован дијабетес промене вредности  $H_2O_2$  нису контзистентне и не прате препознатљив образац. Графикон број 38.

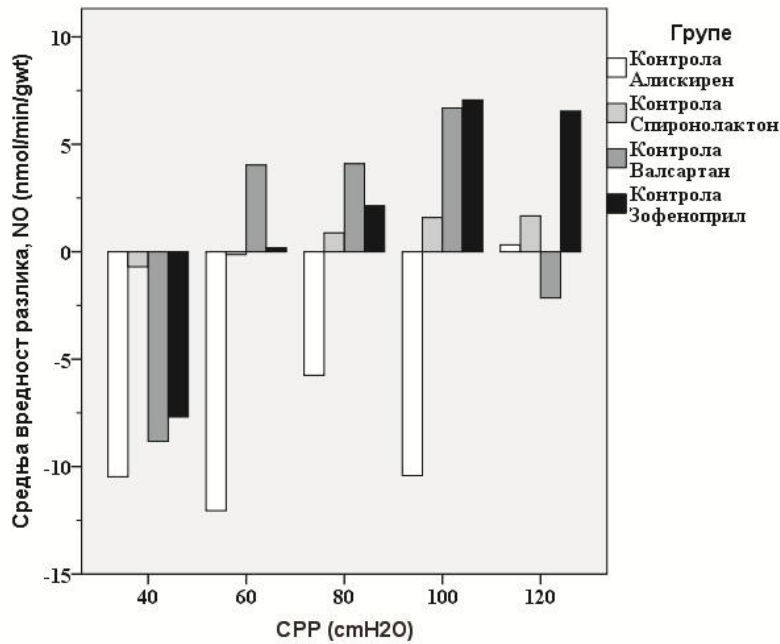


**Графикон број 38:** Упоредне вредности разлика  $H_2O_2$  након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

#### 4.6.11. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА $NO$

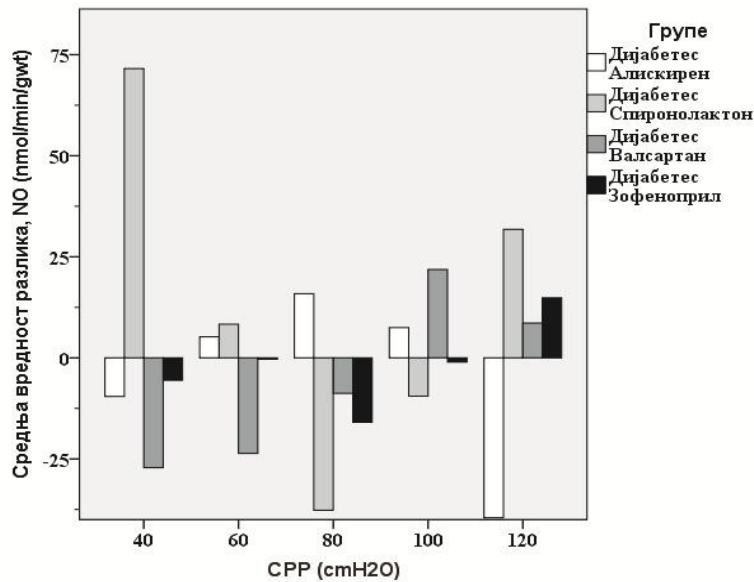
Код здравих животиња перфузија алискиреном доводи до пораста концентрације  $NO$  у коронарном ефлуенту. Остали лекови са мањим учинком прате алискирен само при  $CPP$  40  $cm H_2O$  да би при вишим  $CPP$  доводили до смањења концентрације  $NO$ .





**Графикон број 39:** Упоредне вредности разлика *NO* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

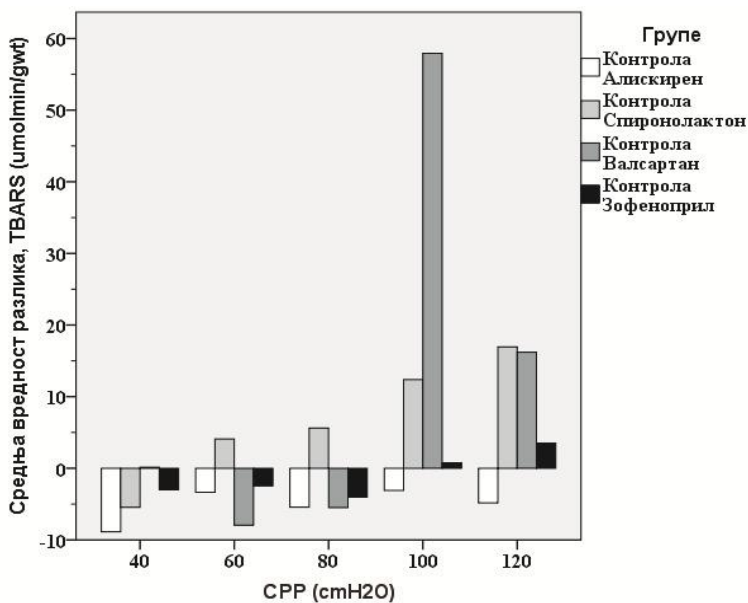
Код дијабетичних животиња ове разлике нису конзистентне и не прате препознатљив образац. Графикон број 40.



**Графикон број 40:** Упоредне вредности разлика *NO* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

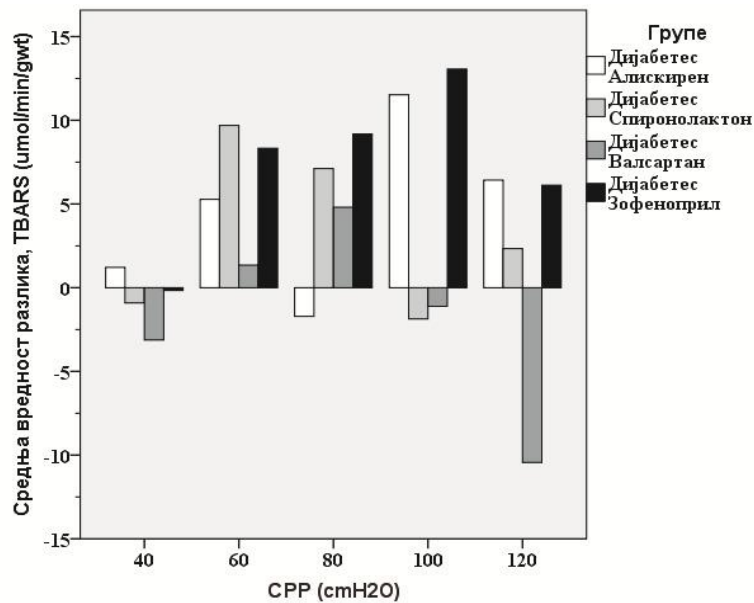
#### 4.6.12. РАЗЛИКЕ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРФУЗИЈЕ ЛЕКОВИМА ЗА *TBARS*

Перфузија Спиринолактоном изолованих срца из групе здравих пацова доводи до повећања *TBARS* на *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* а затим до смањења на вишим *CPP*. алискирен доводи до благог повећања концентрације *TBARS* при свим *CPP*. Вредности при перфузији валсартаном и зофеноприлом се нису мењале на конзистентан начин. Графикон број 41.



**Графикон број 41:** Упоредне вредности разлика *TBARS* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова.

Са друге стране у групи са дијабетесом алискирен и зофеноприл доводе до смањења концентрације *TBARS*. Вредности за спиринолактон и валсартан нису конзистентне. Графикон број 42.



**Графикон број 42:** Упоредне вредности разлика *TBARS* након перфузије испитиваним лековима изолованог срца пацова са стрептозотоцином индукованим дијабетесом.

**V**  
**ДИСКУСИЈА**

## 5.1. РАЗЛИКЕ У КАРДИДИНАМСКИМ ПАРАМЕТРИМА И ПАРАМЕТРИМА ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗМЕЂУ КОНТРОЛНЕ ГРУПЕ И ГРУПЕ СА ДИЈАБЕТЕСОМ

Дијабетична кардиомиопатија је најзначајнија последица хипергликемије када је у питању морталитет пацијената са дијабетесом [11, 12]. Познато је да хипергликемија активацијом више сигналних путева подстиче инфламацију, оксидациони стрес и ремоделовање екстрацелуларног матрикса срчаног мишића. Долази до фиброзе миокарда и следствених последица које пре свега доводе до појачане ригидности односно смањене способности релаксације миокарда затим пораста крутости ендокарда и коронарних крвних судова. Фиброза је превасходно интерстицијална и периваскуларна. Дијастолна дисфункција дакле претходи каснијој систолној дисфункцији а развија се у функционалном смислу и пре евидентног повећања фиброзних наслага колагена у ткивима [6]. Најзначајнији патофизиолошки механизам је поремећај кружења калцијума између цитосола и органела. Калцијум се отпушта из саркоплазматског ретикулума након активације  $L$  типа  $Ca^{2+}$  канала путем рианодинских рецептора. Поремећена је синхронизација отпуштања калцијума и успорено преузимање калцијума преко  $SERCA2a$  и  $Na^{+} Ca^{2+}$  измењивача. Описује се и изомиозински *shift* од  $\alpha$  до  $\beta$  изоформи са негативним ефектом на контрактилност [235, 14].

РААС је појачано активан у дијабетесу. Уочена је повећана експресија информационе рибонуклеинске киселине (енг. *messenger ribonucleotide acid; mRNA*) за АТ II. Ефекти активације РААС су појачан оксидациони стрес у ткивима што даље води ткивном ремоделовању и губитку функције [14]. Основни и најзначајнији стимуланс за пораст ткивног РААС је хипергликемија а додатно се повећава активност у присуству хипертензије [40, 41]. Хронична блокада елемената РААС поправља преузимање  $Ca^{2+}$  у саркоплазматски ретикулум и смањује продукцију *ROS* [46, 47 и 48]. У радовима су кориштени АТ1 рецепторски блокатор (лосартан) и АСЕИ (еналаприл) [46], АТ1 рецепторски блокатор (кандесартан), [47] или АСЕИ (лизиноприл) [48]. Ови лекови нису утицали на ниво хипергликемија али су хроничном применом штитили ткиво од последица [46, 47 и 48].

Стрептозотоцином индуковани дијабетес се карактерише стањем хипоинсулинемије које, након низа метаболичких поремећаја доводи до смањивања срчане масе. Овако индуковане моделе дијабетичне кардиомиопатије прати и успоравање брзина промене притиска у зиду леве коморе:  $dp/dt$  [191]. Иако је индукција дијабетеса са 60  $mg/kg$  стрептозотоцина предвиђена да изазива умерени дијабетес, стање хипоинсулинемије уз нелечену хипергликемију доводи до смањења масе срца и масе тела пацова. Маса тела животиња, маса срца животиња и однос масе тела према маси срца су били мањи у групи са дијабетесом (маса срца:  $1.22 \pm 0.24$  g /  $0.95 \pm 0.14$ ;  $p < 0.05$ ), (маса тела:

219.00±17.09 / 191.51±25.17,  $p<0.05$ ) (табела број 5). Овакве промене описују и други аутори [52].

У разматрању патофизиолошких и патоанатомских карактеристика дијабетичне кардиомиопатије постављано је питање потребне дужине трајања хипергликемије како би промене на миокарду биле манифестне. Увидом у литературу уочавамо да се први знаци дијастолне дисфункције очекују за 7 дана да би након 28 дана у мањој мери била очекивана и појава систолне дисфункције [6]. Експерименталне животиње су биле изложене хипергликемији 28 дана. Хипергликемија је била константна, умерена до изражена, уз клиничку слику хипергликемијског синдрома пре свега у виду полидипсије и полиурије.

Очекивано смањење  $dp/dt$  како је у литератури предвиђено није уочено. За  $dp/dt_{max}$  иако постоји такав тренд, нема статистичке значајности. За  $dp/dt_{min}$  налазимо статистички незначајно повећање ових брзина у групи са стрептозотоцином индукованим дијабетесом, осим на  $CPP 40 \text{ cm H}_2O$  где је уочена статистичка значајност (графикон број 1 Б). У литератури се описују различити резултати. Начешће су *in vitro* добијене смањене вредности кардиодинамских параметара [198], има описа неутралног ефекта, али се описује и иницијални пораст  $dp/dt$  [199]. *Van den Berg* и сар. су 2007. године сугерисали да при оваквим мерењима на резултате утиче повећано претходно оптерећење- *preload* и смањено накнадно опрећење- *afterload* [264]. Значајно за тумачење резултата је разматрање поставке експеримента где се миокард излаже различитим вредностима  $CPP$ . Коронарни перфузиони притисак од  $40 \text{ cm H}_2O$  представља услове хипотензије, хипосатурације кисеоником и хранљивим материјама. На другој страни скале је високи  $CPP 120 \text{ cmH}_2O$  који симулира услове хипертензије и појачаног напрезања срчаног мишића.

Сходно  $dp/dt$ , и притисак у левој комори током систоле  $SLVP$  је био незнатно виши у групи са стрептозотоцином изазваним дијабетесом (графикон број 3). Поново у условима хипоксемије и хипосатурације при  $CPP 40 \text{ cmH}_2O$  остварује се једина статистичка значајност разлике (графикон број 1 В).

Вредност  $LVdevP$  се добија као разлика између  $DLVP$  и  $SLVP$ . Указује на то колико је лева комора способна да подигне притисак током систоле. Ово је параметар систолне функције. У експерименту није уочено присуство систолне дисфункције миокарда у дијабетесу (графикон број 1 В). Попут вредности  $SLVP$  и  $LVdevP$  показује исти образац промене при порасту  $CPP$  (графикон број 1 Д). Резултат овог изведеног параметра је доминантно под утицајем оствареног притиска током систоле у левој комори.

У литератури се наводи да систолном дисфункцијом у стрептозотоцином индукованом дијабетесу доминира успорена релаксација леве коморе док се у моделима

типа 2 дијабетеса пре свега уочава повећана крутост леве коморе [236]. У експерименталном моделу, успорена релаксација би била виђена као смањење  $dp/dt \min$ , а повећана крутост коморе кроз пораст  $SLVP$  и  $DLVP$  са повећањем  $CPP$ .

Сагледавајући резултате свих параметра систолне функције: брзине промене притиска у зиду леве коморе и притисак унутар леве коморе, и поред мањих разлика, може се рећи да су у спроведеном моделу ДКМП ове вредности минимално измењене, односно неутралне у односу на контролну групу (графикони број 1 А, В, Д). Промена резултата гледано кроз пораст  $CPP$  није се разликовала у групи са дијабетесом (графикони број 1 А, В и Д).

Дијастолни притисак у левој комори је на почетку експеримента предвиђен као један од најзначајнијих параметара јер се управо ту очекивала прва дијабетесом узрокована промена налаза. Дијастолна дисфункција у раном дијабетесу, а спроведени модел одражава такве услове, је према литератури пре свега функционална и не подразумева значајну фиброзу ткива [22]. Дијастолни притисак у левој комори у групи здравих животиња се није битно мењао при промени  $CPP$  (графикон број 1 Г). Са друге стране, у групи дијабетичних животиња при  $CPP 40 \text{ cm H}_2\text{O}$   $DLVP$  је значајно нижи, а при  $CPP 120 \text{ cm H}_2\text{O}$  вредност  $DLVP$  статистички значајно расте (графикон број 1 Г). При средњим вредностима  $CPP 60-100 \text{ cm H}_2\text{O}$  које су приближне нормалним вредностима  $CPP$  нема значајности разлике  $DLVP$  између здравих и пацова са дијабетесом (графикон број 1 Г). Значај уочених разлика је у следећем: При  $CPP 40 \text{ cm H}_2\text{O}$  срчани мишић је изложен условима хипоперфузије, хипоксемије и смањеног дотока хранљивих материја. У дијабетичној групи почетно измењен миокард пацова не успева у оваквим условима да одржи једнак тонус током дијастоле у односу на миокард здравих животиња. У захтевним условима адаптивни механизми су умањени. Са порастом  $CPP$  вредност  $DLVP$  у групи са дијабетесом расте, али не показује разлику у односу на здраве животиње при средњим  $CPP$  (графикон број 1 Г). За разлику од вредности добијених у контролној групи где се  $DLVP$  одржава на једном нивоу у групи са дијабетесом  $DLVP$  линеарно расте при порасту  $CPP$ . Ово указује на појаву функционалне ригидности ендокарда и миокарда а статистички значајан пораст  $DLVP$  при супрафизиолошком  $CPP (120 \text{ cm H}_2\text{O})$  (графикон број 1 Г) указује на умањену способност релаксације, што је карактеристика дијастолне срчане слабости.

Срчана фреквенца није била измењена четворонедељним утицајем хипергликемије, односно није уочена разлика међу групама за овај параметар (графикон број 1 Ђ). У литератури се описује продужено трајање акционог потенцијала у експерименталним моделима дијабетеса [237], уз објашњење да се ради о компензаторном механизму који омогућава улазак  $\text{Ca}^{2+}$  у кардиомиоците када је смањен број L-типа  $\text{Ca}^{2+}$  канала, што се описује у дијабетесу [237]. У неким моделима који одговарају типу 1 дијабетеса описује се

смањење HR [14]. Смањење HR у анималном моделу дијабетеса индукованом стрептозотоцином описали су Zhong и сар.2001. године [242]. Аутори су навели да је HR смањена након 4 недеље и да се овакав резултат одржава и након 6 недеља [242]. Спроведени оглед није указао на промену HR након 4 недеље хипергликемије (графикон број 1 Ђ).

Коронарни проток у дијабетичној групи се није разликовао у поређењу са контролном групом (графикон број 1 Е). При анализи ових резултата потребно је имати у виду да се анимални модели дијабетеса на пацовима карактеришу мањим развојем промена на крвним судовима у односу на хуману популацију. Описује се већа отпорност пацова на атеросклеротске промене у односу на хуману популацију [192].

Степен изложености зида леве коморе напрезању изражен кроз параметар  $RPP$  је производ срчане фреквенце и притиска који се развија у левој комори. Очекивано, у групи са индукованим дијабетесом напрезање је веће уз остваривање статистичке значајности једино при  $CPP$  40  $cm H_2O$  (графикон број 1 Ж).

Параметар оксидационог стреса  $O_2^{\cdot -}$  је мерен из коронарног ефлуента и изражен по граму срчаног ткива. Ово је рађено да би вредности резултата параметара оксидационог стреса биле валидне, обзиром на разлике у величини срца пацова (табела број 5). Супероксид анјон је био нижи при средњим вредностима  $CPP$  уз јасан тренд статистички незначајно нижих вредности при осталим  $CPP$  (графикон број 2 А). Овај резултат није иницијално очекиван поготово имајући у виду да су параметри систолне функције и напрезања ткива виши у групи са дијабетесом (графикони 1 А, В и Д). Једно од могућих објашњења је да су молекули  $O_2^{\cdot -}$  потрошени у реакцији са  $NO$  ( $O_2^{\cdot -} + NO = ONOO^{\cdot -}$ ). Азот оксид се у стању продужене хипергликемије појачано и непрекидно ствара активацијом  $iNOS$ . Ова патолошка активација  $iNOS$  проистиче из сигналног пута преко  $PKC\beta 2$ , који је активиран хипергликемијом. Како је полуживот  $O_2^{\cdot -}$   $10^{-6}$  секунде, а створени  $NO$  је доступан неколико секунди, могуће је да се у њиховој реакцији којом се добија веома активна  $ROS$   $ONOO^{\cdot -}$  уједно и смањује концентрација  $O_2^{\cdot -}$ . У прилог ове теорије иде и хомеостатска особина  $O_2^{\cdot -}$  да има вишеструко већи потенцијал за ступање у реакцију са  $NO$  него у дисмутацију путем  $SOD$  [82].

Један од начина настанка  $H_2O_2$  је активношћу  $NADPH$  оксидазе [77]. Овај параметар је снижен у групи са дијабетесом при свим  $CPP$  уз статистичку значајност при  $CPP$  100  $cm H_2O$  (графикон број 2 Б). За разлику од  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$  не улази у интеракцију са  $NO$ . Напротив,  $H_2O_2$  потенцира активност  $NOS$  [238]. Ниже вредности  $H_2O_2$  у групи са дијабетесом могуће настају као последица смањене концентрације  $O_2^{\cdot -}$ . Након реакције са  $SOD$   $O_2^{\cdot -}$  постаје извор  $H_2O_2$  па његова мања концентрација може бити узрок мање продукције  $H_2O_2$ . Ово би био разлог и за нижу концентрацију  $OH^{\cdot -}$ , али овај параметар нисмо одређивали у спроведеном експерименту.



Концентрација *NO* се мењала паралелно у обе групе са порастом *CPP* (графикон број 2 В). У дијабетесу очекивано постоји смањена доступност *L*-аргинина прекурсора *NO*. Са друге стране, хипергликемијом узрокована активација *iNOS* може довести до неконтролисаног и појачаног стварања *NO* [82]. Овај молекул је биолошки мање доступан због реакција са другим *ROS* посебно реакцијом са  $O_2^{\cdot -}$ . И у литератури се наводи да је у стрептозотоцином индукованом дијабетесу повећана активност *iNOS*, а смањена *eNOS* [239, 240]. У спроведеном експерименту концентрација *NO* је била виша једино при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* (графикон број 2 В).

Параметар за процену степена липидне пероксидације је *TBARS* [60]. Ћелијска мембрана, мембране митохондрија и других органела, посебно су подложне оксидативном оштећењу због повећаног садржаја полинезасићених масних киселина. У реакцији масних киселина са оксидансом настаје липидна пероксидација биомембрана. Ствара се липидни радикал који након одузимања водоника прелази у стабилни диен. Коњуговани диен брзо реагује са кисеоником стварајући перокси радикал (*ROO*<sup>•</sup>), који затим са водоником алил групе другог молекула незасићене масне киселине даје нови молекул *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* и алкил радикал (*R*<sup>•</sup>). У току липидне пероксидације, нарочито полинезасићених масних киселина, настаје малон(ди)алдехид (енг. *malon di aldehyde; MDA*), који може да оштети и удаљене ћелије. У спроведеном експерименту присуство липидне пероксидације смо процењивали на основу реакције *MDA* са *TBA* којом приликом се стварају *TBARS*. У дијабетесу, поготову хипоинсулинемијском, доминира употреба слободних масних киселина за добијање енергије [217]. Збирно, повећање *TBARS* у свим групама са дијабетесом је очекивано (графикон број 2 Г). Интересантно је међутим да овакав резултат није добијен у свим групама. Резултати *TBARS* у групи са дијабетесом пред давање зофеноприла су били нижи од контролне групе (податак није приказан издвојено од осталих при поређењу свих контролних и свих група са дијабетесом). Оваква разноликост указује на комплексност разматрања оксидационог стреса и утицај важних фактора у детерминисању реакције организма који могу усмерити метаболизам у неком правцу. Претпоставка је била да липидна пероксидација у дијабетесу води већој концентрацији *TBARS* и овај је параметар растао са порастом *CPP* (графикон број 2 Г). Да ли, и у којој мери постављање изолованог срца на *Legendorff*-ов апарат и перфузија раствором који за енергетске потребе користи глукозу ремети физиолошки очекивану реакцију ткива остаје питање на које би се посебним дизајном експеримента могао потражити одговор.

У спроведеном експерименту, четири недеље хипергликемије није довело до систолне дисфункције изолованих срца пацова (графикони број 1 А, В и Д). Препознати су знаци дијастолне дисфункције (графикон број 1 Г) и установљено је да није било утицаја на срчани ритам и коронарни проток (графикони број 1 Ђ и Е). Супероксид анјон радикал је био нешто нижи у дијабетичној групи, водоник пероксид такође (графикони број 2 А и Б). Вредности *NO* су биле веће само на најнижем *CPP*, притиску који симулира услове

хипотензије и хипоксемије (графикон број 2 В). *TBARS* је био виши при свим вредностима *СРР* (графикон број 2 Г).

## 5.2. УТИЦАЈ ПЕРФУЗИЈЕ ЗОФЕНОПРИЛОМ НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У КОНТРОЛНОЈ ГРУПИ И ГРУПИ СА ДИЈАБЕТЕСОМ

Кардиодинамске и метаболичке реакције изолованих срца пацова на акутну перфузију модулаторима РААС при различитим коронарним перфузионим притисцима нису публиковане, а доступни подаци се углавном односе на ефекте након хроничне примене лекова (геномски ефекти) или акутну перфузију леком при сталном *СРР* [243, 244, 248, 250, 254].

Зофеноприл је липофилни *АСЕ* инхибитор са израженом способношћу за дејство на ткивни *АСЕ*. Овај лек се карактерише продуженим деловањем односно дуготрајном инхибицијом *АСЕ*. Иако је у организму активан пре свега у естерификованом облику-зофеноприлат и сам зофеноприл има способност деловања на ткивни *АСЕ* али нешто слабији од зофеноприлата [185].

Бројни аутори су препознали поремећај промета калцијума у кардиомиоцитима као кључни догађај у развоју ДКМП [14, 241]. Прекомерна експресија гена за *SERCA2a* у специфичним анималним моделима штити срце од развоја ДКМП [242]. Ово је кључ за тумачење догађаја у развоју ДКМП и смерница за могућа трерапијска решења.

*Carnicelli* и сар. су 2011. године испитивали ефекте перфузије са  $10\mu\text{M}$  зофеноприлата на здравим пацовима. Нису нађене хемодинамске последице ове перфузије, али је уочена промена експресије гена, између осталих и за фосфоламбан, протеин који инхибира *SERCA2a* [243]. Са друге стране, *Zhong* и сар. 2001. године објављују да је фосфоламбан повишен а да је фосфорилација фосфоламбана смањена у стрептозотоцином индукованом дијабетесу [244].

Перфузија зофеноприлом у спроведеном експерименту испољила је један неочекиван, али препознатљив тренд. Наиме, на нижим *СРР* код изолованих срца здравих пацова уочено је убрзавање  $dp/dt\ max$  и  $dp/dt\ min$ , а на сличан начин и повећање *SLVP* као и израчунатог *LVdevP* и *RPP* (графикони број 3 А, Б, В, Д, Ж). Ово указује на пролазно позитивно инотропно, али и луситропно (ефекат на  $dp/dt\ min$ ) дејство зофеноприла. Од *СРР* 80 *cm H<sub>2</sub>O* овај се ефекат губи и прераста у негативно инотропно и луситропно дејство. Статистичка значајност је постигнута при највећем *СРР* изузев  $dp/dt\ min$  када су и стимулативни ефекти зофеноприла на *СРР* 40 *cm H<sub>2</sub>O* статистички значајни (графикони број 3 А, Б, В, Д, Ж). У групи са дијабетесом ово није виђено. Код срца измењених

четворнедељном хипергликемијом већ од  $CPP$  60  $cm H_2O$  почиње снижавање параметара систолне функције у односу на мерење пре перфузије зофеноприлом (графикони број 4 А, В, Д и Ж). Има ли раније описан ефекат на гене за фосфоламбан утицај и у нашем експерименту не можемо утврдити без додатних испитивања. Пролазност ефекта, односно појачана контрактилност због инхибиције фосфоламбана коју описују *Frascarelli* и сар. 2009. године [245] је могуће препозната и у спроведеном експерименту, обзиром да су уочени на прва два мерења ( $CPP$  40 и 60  $cm H_2O$ ) (графикони број 3 А, Б, В, Д, Ж). Ефекат је изгубљен у групи са дијабетесом, што може указивати на улогу присутног смањења калцијумског градијента и оптерећења ћелије калцијумом (графикони број 4 А, Б, В, Д, Ж). На највишим  $CPP$  зофеноприл је и код здравих пацова имао кардиодепресорна својства (графикони број 3 А, Б, В, Д, Ж). Све описане промене, након перфузије зофеноприлом, и када не достижу праг статистичке значајности задржавају карактеристичан тренд што и поред описане статистичке оградe има значај за разумевање ефеката зофеноприла на срце пацова.

Дијастолни притисак у левој комори није био измењен до нивоа статистичке значајности, али се могао уочити тренд смањења параметра у контролној групи при највишим  $CPP$  током перфузије зофеноприлом (графикон број 3 Г). Уочен је и не значајно нижи  $DLVP$  када је зофеноприл дат у експерименту са групом којој је индукован дијабетес на  $CPP$  40-100  $cm H_2O$  уз пораст при супранормалном  $CPP$  120  $cm H_2O$  (графикон број 4 Г). И овде се јавља препознатљива реакција при високим  $CPP$  у групи са дијабетесом а реакција на зофеноприл поново указује на губитак способности адаптације на ноксу при високим  $CPP$  (графикон број 4 Г).

Зофеноприл је имао негативан утицај на  $HR$  у обе групе (графикони број 3 Ђ и 4 Ђ). *Zhang* и сар.су 2001. године објавили податак о значајном смањењу  $HR$  након 4 недеље хипергликемије уз одржавање оваквог резултата и током 6 недеља праћења [244]. *Carnicelli* и сар. су уочили да перфузија са 10  $\mu M$  зофеноприлата није утицала на  $HR$  код изолованих срца здравих пацова, с тим да је експеримент спроведен на стабилном и нормалном  $CPP$  [243]. Није познато да је неко испитивао акутне ефекте Зофеноприла у ДКМП. У спроведеном експерименту и  $HR$  је показала тренд снижења без достизања нивоа статистичке значајности почев од  $CPP$  60  $cm H_2O$  у обе групе (графикони број 3 Ђ и 4 Ђ). Може се поставити питање, а имајући у виду наводе *Carnicelli* и сар., да ли сам зофеноприл као про лек (супстанца која, иако и сама остварује ефекте, након естерификације прелази у значајно активнији облик зофеноприлат) има ове негативне ефекте будући да их ауторка употребом зофеноприлата у далеко већој ефективној концентрацији не уочава. Дијабетес није значајно утицао на промену криве резултата односно реакцију на лек (графикон број 4 Ђ).

Коронарни проток је у контролној групи био значајно повишен након перфузије зофеноприлом при  $CPP$  40  $cm H_2O$  да би на највишим  $CPP$  100 и 120  $cm H_2O$  дошло до инверзије па је на  $CPP$  120  $cm H_2O$   $CF$  статистички значајно нижи (графикон број 3 Е). Дијабетес је имао значајну улогу на резултате  $CF$ . У овој групи на  $CPP$  40  $cm H_2O$  резултат је незначајно повишен након перфузије зофеноприлом да би затим пад коронарног протока био много израженији од  $CPP$  60-120  $cm H_2O$  (графикон број 4 Е). Највероватнији разлог за овакав резултат је комбиновани ефекат смањења контрактилне способности и срчане фреквенце на вишим  $CPP$  уз присутну смањену адаптабилност ткива у дијабетесу. У поређењу испитиваних лекова зофеноприл је уз спиронолактон изазвао највећу разлику односно смањење  $CF$  у групи са дијабетесом (графикон број 32).

Оксидациони стрес је у блиској вези са патогенезом дијабетеса а настаје комбинованим ефектима појачане продукције  $ROS$  и смањене активности и ефикасности антиоксидационе заштите [205]. Појачана експресија гена за  $Mn SOD$  и каталазу у експерименталном моделу има заштитне ефекте од последица оксидационог стреса [50, 55, 75]. Како је већ у уводу назначено РААС остварује своје ефекте у ДКМП преко АТ1 рецептора за АТ II и то модулацијом ефеката оксидационог стреса [179]. Лекови са утицајем на РААС могу своје ефекте остваривати и преко модулације оксидационог стреса. У дијабетесу присутно преоптерећење кардиомиоцита калцијумом напреже функцију митохондија у секвестрацији  $Ca^{2+}$  и испољава негативне ефекте на процес оксидативне фосфорилације и стварања енергије[246].

Сам зофеноприл као инхибитор  $ACE$  са сулфхидрилном групом показује и извесне антиоксидационе карактеристике [185]. У експерименту  $O_2^-$  је снижен након перфузије са зофеноприлом у контролној групи при  $CPP$  40, 60, 80 и 120  $cmH_2O$  (графикон број 5 А). На  $CPP$  100  $cm H_2O$  је нижи али без значајности. Зофеноприл је међу испитиваним лековима довео до највећег смањења  $O_2^-$  у контролној групи (графикон број 35). Примена зофеноприла довела је до пораста  $O_2^-$  у групи животиња са дијабетесом уз статистичку значајност на 40 и 80  $cm H_2O$  ( $p < 0.05$ ) (графикон број 6 А). Са друге стране при  $CPP$  120  $cm H_2O$   $O_2^-$  је значајно нижи након перфузије зофеноприлом ( $p < 0.05$ ) (графикон број 6 А). У литератури није описан пораст  $O_2^-$  након примене зофеноприла. Кретање резултата за  $O_2^-$  у групи са дијабетесом са порастом при нижим и средњим  $CPP$  и падом при вишим притисцима указује на могућ негативан акутни метаболички ефекат зофеноприла у дијабетесу који претходи каснијем смањивању параметара систолне функције и коронарног протока, уоченим при вишим  $CPP$  (графикони број 4 А, Б, В, Д, Ж).

Параметар оксидационог стреса  $H_2O_2$  се није статистички значајно мењао након перфузије зофеноприлом (графикони број 5 Б и 6 Б). У обе групе вредности су незначајно ниже након перфузије зофеноприлом при  $CPP$  60-100  $cm H_2O$  (графикони број 5 Б и 6 Б). Код контролних животиња параметар је незначајно виши након примене зофеноприла при

*CPP* 40 *cmH<sub>2</sub>O* а код дијабетичних на *CPP* 120 *cmH<sub>2</sub>O* (графикони број 5 Б и 6 Б). Може се рећи да перфузија зофеноприлом нема значајан утицај на метаболизам  $H_2O_2$ .

У дијабетесу срчани мишић показује склоност ка већој употреби слободних масних киселина у односу на глукозу [217]. Из овог разлога не чуди да је пре администрације лекова збирно у групама уочен значајан пораст параметра липидне пероксидације *TBARS* у односу на здрава срца (графикон број 5 В). Овај параметар расте након примене зофеноприла у контролној групи уз статистичку значајност на *CPP* 60-100 *cmH<sub>2</sub>O* ( $p < 0.05$ ) (графикон број 5 В). Имајући у виду да је *MDA* која се анализом *TBARS* индиректно процењује пореклом од липидне пероксидације полинезасићених масних киселина, којих између осталог има у биомембранама, [255]. може се претпоставити да зофеноприл има негативан ефекат на биомембране. Резултати *TBARS* у огледу указују на функционалну различитост миокарда у дијабетесу (графикони број 5 В и 6 В). У групи са дијабетесом *TBARS* је након перфузије зофеноприлом нижи од *CPP* 60-100 *cm H<sub>2</sub>O* иако без статистичке значајности (графикон број 6 В). Овај ефекат је супротан виђеном у контролној групи. (графикон број 5 В) што указује на функционалну разлику. На *CPP* 40 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* *TBARS* је неизмењен (графикон број 5 Г и 6 Г). За тумачење резултата треба узети у обзир и снижену систолну функцију миокарда на највишим *CPP* при примени зофеноприла (графикони број 4 А, В, Д и Ж). Чињеница је и да се у спроведеном експерименту у перфузату користи глукоза као извор енергије а не слободне масне киселине што у каснијим фазама експеримента може имати значај. Није до сада публикован рад у коме би се процењивао значај промене редоследа различитих коронарних перфузионих притисака у експериментима на изолованом срцу пацова на *TBARS*. Супротстављени су и резултати који указују на присуство оксидационог стреса. Параметар оксидационог стреса који се пре може везати за динамику продукције енергије и митохондријалну хомеостазу  $O_2^-$  снижен је након примене зофеноприла у контролној групи а расте у дијабетесу. Насупрот овоме параметар који се везује за метаболизам полинезасићених масних киселина и везано са тим ћелијских биомембрана *TBARS*, је након примене зофеноприла повишен у контролној групи а неутралан односно незначајно снижен при средњим притисцима у групи са дијабетесом (графикони број 5 А, 5 Г, 6 А и 6 Г). Имајући у виду наведене ефекте на  $O_2^-$  и *TBARS*, а у светлу липофилности зофеноприла може се извући претпоставка да је у контролној групи ефекат зофеноприла усмерен на биомембране, да због тога расте *TBARS* а де су резултати  $O_2^-$  последица утицаја на оксидазе која се у мембранама налазе. За наведено нема потврде у литератури.

Метаболичке интеракције  $O_2^-$  и *NO* су веома значајне о чему је већ било речи [230]. У литератури *West* и сарадници 2008 објављују да је расположивост *NO* у дијабетесу смањена и да је то последица интеракције са другим *ROS* [230]. Хипергликемија активира *PKC $\beta$ -iNOS* сигнални пут уз ослабљену активност *eNOS* [240]. Може се закључити да настаје функционални поремећај који карактерише неадекватна био-расположивост *NO*.

У спроведеном огледу  $NO$  је био готово неизмењен након перфузије зофеноприлом у контролној групи (графикон број 5 В). У групи са дијабетесом уочено је смањење  $NO$  на  $CPP$  већим од  $40 \text{ cmH}_2O$  са статистичком значајношћу на  $CPP$   $60\text{-}100 \text{ cm H}_2O$  (графикон број 6 В). Да ли су пораст  $O_2^-$  и пад  $NO$  у групи са дијабетесом у вези и може ли се неочекивана реакција  $NO$  у овој групи тумачити реакцијом у којој  $O_2^-$  и  $NO$  стварају  $ONOO^-$  остаје отворено питање.

Зофеноприл је показао пролазан позитиван инотропни и луситропни ефекат у контролној групи на нижим перфузионим притисцима и негативан инотропни и луситропни ефекат на високом  $CPP$ . У истој групи је уочен смањење  $O_2^-$  и пораст  $TBARS$  уз неутрални ефекат на  $H_2O_2$  и  $NO$ . Смањење  $O_2^-$  у контролној групи можемо схватити и као последицу антиоксидационих особина самог зофеноприла, који спада у групу  $ACEI$  са сулфхидрилном групом (енг. *sulfhydryl* – $SH$ ), за коју се зна да ступа у реакцију са  $O_2^-$  [207, 208, 256], или евентуалног претпостављеног ефекта на оксидазе у липофилним биомембранама. Изражена липофилност зофеноприла, већа од већине других  $ACEI$  [185] доприноси транспорту супстанце у ткива али и ефектима на биомембране. Параметар липидне пероксидације  $TBARS$  је могуће растао због пролазно појачане систолне активности и негативног утицаја зофеноприла на биомембране У групи са дијабетесом се мења слика и приказано може поткрепити хипотезу да је миокард у дијабетесу функционално различит. Могуће је да уочени изостанак пораста  $TBARS$  након перфузије зофеноприлом у групи са дијабетесом настаје због измењеног циљног супстрата насталог претходним оштећењем хипергликемијом и хипоинсулинемијом па се негативни ефекат зофеноприла не испољава. Уочен пораст  $O_2^-$  након примене зофеноприла у дијабетичној групи претходи кардиодепресорним ефектима на вишим  $CPP$ .

### **5.3 УТИЦАЈ ПЕРФУЗИЈЕ ВАЛСАРТАНОМ НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У КОНТРОЛНОЈ ГРУПИ И ГРУПИ СА ДИЈАБЕТЕСОМ**

Ефекти  $AT II$  у ткивима се остварују преко  $AT1$  рецептора. Ови рецептори су у срчаном ткиву испољени на кардиомиоцитима, кардиофибробластима и симпатичким нервним завршецима. Преко њих се остварује позитивно инотропно дејство  $AT II$  те утицај на хомеостазу и кретање калцијума у кардиомиоцитима.  $AT II$  има ефекат на ћелијске сигналне путеве и доводи до хипертрофије кардиомиоцита и пролиферације срчаних фибробласта [6, 8]. Валсартан је молекул који има ефекте и на ткивне  $AT1$  рецепторе за  $AT II$  што је разлог за избор овог лека у спроведеном експерименту.

У ткивима животиња са дијабетесом  $AT II$  је повишен. Појачана активност  $AT1$  рецептора доводи до повећане концентрације  $ROS$  што је праћено даљом активацијом

сигналних путева и директним оштећењем ткива [10]. У литератури, валсартан се означава као сартан са најизраженијим хипотензивним ефектом уједно и најбезбеднији за употребу [267]. Хипертензија је важан коморбидитет у дијабетесу али поред хипотензивног за примену валсартана од значаја су и други независни ефекти [267].

За разлику од зофеноприла код кога је при нижим *CPP* у контролној групи уочено убрзање  $dp/dt$ , након перфузије валсартаном ово се не дешава (графикони број 7 А и 7 Б). И у контролној и у групи са дијабетесом валсартан доводи до снижавања  $dp/dt$  *max* и *min* (графикони број 7 А, 7 Б, 8 А и 8 Б). Сигнификантна разлика се остварује за *CPP* 80 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* у контролној групи (графикон број 7 А) и за *CPP* 100 *cm H<sub>2</sub>O* у групи са дијабетесом (графикон број 8 А). При томе је на *CPP* 40-80 *cm H<sub>2</sub>O*  $dp/dt$  *max* готово исти пре и након перфузије леком. (графикони број 7 А и 8 А). Разлике су статистички значајне за  $dp/dt$  *min* од *CPP* 80-120 *cm H<sub>2</sub>O*. (графикони број 7 Б и 8 Б) Стиче се утисак да је начин на који валсартан делује на  $dp/dt$  *min* исти и код контролних и код животиња са дијабетесом. Ово указује на механизам који није везан за последице хипергликемије. Пролазна стимулација  $dp/dt$  која је уочена код примене зофеноприла у контролној групи код валсартана изостаје. Касније успоравање  $dp/dt$  које се одвија веома слично код оба лека може имати исти или повезан узрок али је то потребно додатно расветлити истраживањем који би пратили активацију или супресију сигналних путева укључених у активност ових лекова.

Када је *SLVP* у питању разлике између контролне и групе са дијабетесом су значајно веће. Валсартан доводи до постепеног снижавања *SLVP* у контролној групи од *CPP* 60-120 *cm H<sub>2</sub>O* с тим да је значајност разлике уочена при вишим *CPP* 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* ( $p < 0.05$ ) (графикон број 7 В) указујући на мању толеранцију на пораст тензије у систему. Хронична хипергликемија је са своје стране додатно утицала на реакцију ткива на перфузију валсартаном, па је у групи са дијабетесом статистички значајно нижи *SLVP* при свим *CPP* а веома значајан ( $p < 0.01$ ) при *CPP* 100 *cm H<sub>2</sub>O* (графикон број 8 В). Ово појачање негативног ефекта перфузије валсартаном на *SLVP* указује на измењеност срчаног ткива у дијабетесу и поред наизглед приближних вредности кардиодинамских параметара у претходним поређењима срца здравих пацова и оних са дијабетесом. На исти начин као код *SLVP* мењају се и резултати за *LVdevP* што је очекивано имајући у виду доминантну улогу *SLVP* у тој формули. Значајности по вредностима *CPP* су симетричне (графикони број 7 В, 7 Д, 8 В и 8 Д). Како су ефекти израженији на  $dp/dt$  *min* него на  $dp/dt$  *max* (графикони број 7 А, 7 Б, 8 А и 8 Б) можемо претпоставити да је код Валсартана ефекат израженији на способност релаксације. На то указују промене у дијастоли (графикон број 7 Г и 8 Г).

Перфузија Валсартаном доводи до пораста *DLVP*, изузев при најнижем *CPP*, са статистичком значајношћу при *CPP* 60,100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* ( $p < 0.05$ ) у контролној групи и

при  $CPP$  40  $cm H_2O$  у групи са дијабетесом (графикон број 7 Г и 8 Г). У обе групе расте дијастолни притисак након перфузије валсартаном што поново указује на механизам који утиче на ригидност комора. Способност да се повећа дијастолни притисак је била нешто мање изражена у групи са дијабетесом. Вредности  $DLVP$  се нису мењале након перфузије валсартаном у контролној групи за најнижи  $CPP$  40  $cm H_2O$  а у групи са дијабетесом за највиши  $CPP$  120  $cm H_2O$  (графикон број 7 Г и 8 Г). Утицај четворонедељне хипергликемије у смислу пораста  $DLVP$  при  $CPP$  120  $cm H_2O$  је раније описан (графикон број 1 Г). Да ли се на тај начин у условима хипертензије достиже максимум пораста  $DLVP$  који ефекат валсартана не може превазићи остаје отворено питање. Исто тако треба имати у виду да је у дијабетичној групи значајна разлика уочена на најнижем  $CPP$  где је и пре перфузије лека  $DLVP$  био нижи те је могуће да постоји физиолошки простор за пораст  $DLVP$  под дејством валсартана. Пораст  $DLVP$  у контролној групи је био већи само након примене алискирена (графикон број 25).

У дијабетесу је продужено трајање акционог потенцијала док амплитуде акционог потенцијала нису измењене дијабетесом ни применом лосартана [247]. Реполаризациона калијумска струја смањена у стрептозотоцином индукованом дијабетесу. *Riamondi* и сарадници су 2004 објавили да је овакав процес превениран хроничном оралном применом лосартана -блокатора АТ1 рецептора за АТ II [247]. У доступној литератури нема података о акутним ефектима перфузије валсартаном. Вредности  $HR$  су снижене након перфузије валсартаном у обе групе (графикони број 7 Ђ и 8 Ђ). Нешто израженије су промене у групи са дијабетесом стим да су значајне разлике уочене у контролној групи на  $CPP$  80  $cm H_2O$  а у групи са дијабетесом при  $CPP$  100  $cm H_2O$  (графикони број 7 Ђ и 8 Ђ 8). Познати су позитивни ефекти хроничне примене сартана у превенцији последица хроничне хипергликемије на ткива [115]. Ови механизми су у главном проистекли из модулације ефеката оксидационог стреса [118]. Прецизан механизам којим акутна примена валсартана утиче на  $HR$  остаје нерасветљен.

Коронарни проток у контролној групи је нешто нижи при вишим  $CPP$  уз статистичку значајност при  $CPP$  100  $cm H_2O$  ( $p < 0.05$ ). (графикон број 49). У групи са дијабетесом нема разлике у вредностима  $CF$  након перфузије валсартаном (графикон број 7 Е). Ранијом анализом разлика између контролне и групе са дијабетесом уочили смо да је у другој групи коронарни проток несигнификантно нижи (графикон број 1 Е). Могуће је да ово смањење узроковано сличним механизмом којим делује и перфузија Валсартаном па перфузија леком у групи са дијабетесом не достиже ефекат виђен у контролној групи.

Параметар унутрашњег притиска на зид леве коморе  $RPP$  узима у обзир фреквенцу и развојни притисак у левој комори. Обзиром да се фреквенца веома мало мењала промена вредности  $RPP$  је веома слична  $SLVP$  и  $LVdevP$ , стим да је код овог параметра уочена статистичка значајност и при  $CPP$  80  $cm H_2O$  у контролној групи (графикони број 7 Ж и 8



Ж). Уочљиво је да је најмања разлика у параметрима систолне функције при најнижем  $CPP$  40  $cm H_2O$  који одражава услове хипоксије и хипотензије (графикони број 7 А, 7 В, 7 Д, 7 Ж, 8 А, 8 В, 8 Д, 8 Ж). На који начин је ово у вези са кардиодепресорним ефектима акутне перфузије валсартаном нам за сада није познато.

Пре почетка експеримента било је очекивано да ће лек са најиспољенијим утицајем на параметре оксидационог стреса бити управо валсартан. Претпостављено је и да ће оксидациони стрес бити израженији у групи са дијабетесом. Неочекивана је била разлика у реакцији здравих и срца пацова са дијабетесом након перфузије валсартаном. У контролној групи на најнижем, хипоксичном  $CPP$  након перфузије валсартаном  $O_2^-$  статистички значајно расте да би затим при осталим  $CPP$  био значајно нижи (графикон број 9 А). Ефекат смањења оксидационог стреса применом блокатора ефеката АТ II преко АТ<sub>1</sub> рецептора је очекиван у патолошким условима дијабетеса [118]. Веома различито  $O_2^-$  у групи са дијабетесом поред одржавања статистички значајнио вишег резултата при  $CPP$  40  $cm H_2O$  на свим осталим  $CPP$  нема разлике вредности пре и након перфузије валсартаном (графикон број 10 А). И при поређењу вредности  $O_2^-$  здравих и дијабетичних пацова вредности  $O_2^-$  су биле ниже (графикон број 2 А) што је тумачено реакцијом са  $NO$  створеним патолошком активацијом  $iNOS$ . Резултати  $O_2^-$  указују да валсартан има мањи утицај на смањење  $O_2^-$  у дијабетесу него у контролној групи. Треба имати у виду да након експлантације срца постоје услови за развој оксидационог стреса и у контролној групи, па су ефекти валсартана на оксидациони стрес преко АТ<sub>1</sub> рецептора за АТ II очекивани (графикон број 9 А). Остаје непознаница зашто изостаје ефекат у дијабетесу односно зашто валсартан повећава  $O_2^-$  у хипоксичним условима  $CPP$  40  $cm H_2O$  (графикон број 10 А). При овом притиску су најмање изражени негативни инотропни и луситропни ефекти валсартана (графикони број 7 А, 7 Б, 7 В, 7 Д, 7 Ж, 8 А, 8 Б, 8 В, 8 Д, 8 Ж)

У поређењу са овим резултатом  $H_2O_2$  је у контролној групи незначајно виши при  $CPP$  40  $cm H_2O$  да би затим био нижи при вишим притисцима уз статистички значајну разлику на  $CPP$  100  $cm H_2O$  Уочавамо велику сличност у ефектима акутне перфузије валсартаном на ова два параметра оксидационог стреса у контролној групи. И у групи са дијабетесом можемо закључити да је промена  $H_2O_2$  веома слична изменама виђеним код  $O_2^-$  без обзира што се због веће и неконзистентне осцилације  $H_2O_2$  у контролној групи појављује статистичка значајност на  $CPP$  60  $cm H_2O$  Ова сличност указује да су механизми којима валсартан утиче на вредности  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  повезани а без обзира на уочљиве паралелне разлике између здравих и животиња са дијабетесом.

У литератури се описује да хронична примена валсартана доводи до повећане активности и генске експресије за GPx. Овај антиоксидациони молекул неутралише  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  који се појачано стварају у дијабетесу [268]. Ово није једини механизам којим примена валсартана утиче на оксидациони стрес. Ефектима преко АТ<sub>1</sub> рецептора

валсартан спречава ефекте појачане активације *PKC* карактеристичног за стања хипергликемије и праћеног повећањем оксидационог стреса активације *TNF-β* и моноцитног хемоатрактантског протеина 1 (енг. monocyte chemoattractant protein 1: *MCP-1*), што све води убрзаној интерстицијалној фибрози и погоршава кардиомиопатију [269] [269]. Повећани оксидациони стрес активира процес апоптозе [270]. Валсартан смањујући оксидациони стрес утиче на мању активацију *NFκB* и *TNFα* чиме се утицај хипергликемије на апоптозу умањује [270]. *Dandona* и сарадници 2004 указују да хронична примена валсартана доводи до смањивања концентрације  $O_2^{\cdot-}$  деловањем на *NADPH* оксидазу [271]. Ефикасност у кардиоваскуларној патологији потврђена је протективним ефектом који хронична примена валсартана има након инфаркта миокарда где је утврђено да валсартан смањује оксидациони стрес и активност *TNF-α* [272, 273]. Дејство на антиоксидациону заштиту се поред повећане експресије гена за *GPx* [268] огледа у спречавању инхибиције *SOD*, *CAT* и редукованог глутатиона [271, 275].

Метаболизам *L*-аргинин *NO* система је измењен у дијабетесу [230]. Постоји смањена биорасположивост аргинина а измењена је и активност *NOS*. Уочено је смањење активности ендотелне *eNOS* и појачање активности индуцибилне *iNOS*. Овакви догађаји воде изменама васкуларног тонуса и повећавају оксидациони стрес [40]. Перфузија Валсартаном у контролној групи није довела до измене вредности *NO* (графикон број 9 В). У групи са дијабетесом уочене разлике нису конзистентне али су осцилације изражене па је *NO* након перфузије Валсартаном виши при *CPP* 40-80 *cm H<sub>2</sub>O* а нижи на 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O*. У свему овоме статистичка значајност је забележена на *CPP* 40, 60 и 100 *cm H<sub>2</sub>O* (графикон број 10 В). Могуће је да је неконтролисана активност *iNOS* у дијабетесу узрок оваквих осцилација *NO*.

Параметар липидне оксидације *TBARS* је снижен при хроничној примени валсартана [275]. У спроведеном експерименту није уочена значајна разлика након перфузије валсартаном изузев у контролној групи на највишем *CPP* када је нижи. Вредности *TBARS* у контролној групи су веома осцилирале при средњим *CPP* и пре и након примене лека (графикон број 9 Г). Са друге стране *TBARS* је линеарно растао при порасту *CPP* у групи са дијабетесом без значајне измене вредности након перфузије валсартаном (графикон број 10 Г). Кретање вредности у контролној групи је паралелно све до највишег *CPP* односно услова хипертензије и пренапрегнутости ткива. У овим условима валсартан смањује вредност *TBARS* (графикон број 9 Г). У артеријској хипертензији без дијабетеса као коморбидитета ово може имати значај јер представља додатни антиоксидативни потенцијал валсартана.

Акутни ефекти валсартана на параметре оксидационог стреса нису у потпуности поновили раније описано при хроничној примени лека. Долази до смањења  $O_2^{\cdot-}$  и *TBARS* у контролној групи и овај ефекат је појачан при вишим притисцима. У ДКМП овај ефекат

није испољен. Метаболизам  $H_2O_2$  и  $NO$  није значајно измењен иако су уочене осцилације вредности.

#### 5.4 УТИЦАЈ ПЕРФУЗИЈЕ СПИРИНОЛАКТОНОМ НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У КОНТРОЛНОЈ ГРУПИ И ГРУПИ СА ДИЈАБЕТЕСОМ

Алдостерон се синтетише у миокарду као и сви други елементи ткивног РААС. Своје ефекте остварује преко минералокортикостероидног рецептора-МР а постављена је сумња на постојање непознатог мембранског рецептора [186]. На овај закључак је навело испитивање које су спровели *Barbato* и сарадници 2002 када су утврдили да су позитивни инотропни ефекти алдостерона појачани блокадом МР Спиринолактоном [186]. Ефекте остварене преко МР називамо геномским јер се по везивању за МР алдостерон преноси до једра где се оставрује ефекатна активацију гена. Негеномски ефекти наступају брже *Barbato* и сарадници су објавили 2004 да алдостерон и спиринолактон иако и један и други показују позитивно инотропно дејство, то чине на различите начине.[264]. Према налазима ових аутора алдостерон пролазни позитивни инотропни ефекат постиже пре свега променом интрацелуларног ацидо-базног статуса ка алкалози што повећава активност калцијумом активираних миозин АТФ-азе а спиринолактон повећава концентрацију  $Ca^{2+}$  у дијастоли. [264].

Алдостерон подстиче развој миокардне фиброзе и то делујући модулацијом ефеката АТ II на његове АТ<sub>1</sub> рецепторе, рецепторе преко којих појачана активност РААС води до повећаног оксидационог стреса, активације инфламаторне каскаде, ткивног ремоделовања и фиброзе [248].

Спиринолактон је неселективни блокатор МР [247]. Структурално је сличан прогестерону што је основ за неке нузефекте које код хроничне примене производи [247]. Добре ефекте је показао након додавања пацијентима са хроничном срчаном слабости трећег и четвртог степена према класификацији Њујоркшке здравствене асоцијације (енг. *New York health association III-IV; NYHA III-IV*) како је уочено у рандомизованој студији за евалуацију спиринолактона (*randomized aldactone evaluation study: RALES*) са смањењем mortalитета за 30% [248].

Експериментална студија из 2003 године је указала да хронична администрација Спиринолактона код пацова са хемијски индукованим дијабетесом не доводи до побољшања налаза  $dp/dt$  и  $LVdevP$ . У истој судији описује се да су ови параметри измењени са осам недеља хроничне хипергликемије [249]. Раније студије су указивале да хронична примена спиринолактона смањује фиброзу миокарда у стрептозотоцином

индукованом дијабетесу али и даље без побољшања кардиодинамских параметара [250]. Овакви резултати могу указивати да су кардиодинамски параметри под већим утицајем поремећаја кретања  $\text{Ca}^{2+}$  у кардиомиоцитима: ослобађања  $\text{Ca}^{2+}$  пред контракцију, ћелијског опетерђења калцијумом и успорене активности *SERCA2a* [241].

У спроведеном експерименту спиронолактон је у обе групе довео до пораста  $dp/dt$  *max* на *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* уз статистичку значајност у групи с дијабетесом (графикони број 11 А и 12 А). На вишим *CPP*  $dp/dt$  *max* је благо снижен након перфузије Спиринолактоном нешто израженије али не и статистички значајно на *CPP* 120 *cm H<sub>2</sub>O* (графикони број 11 А и 12 А). Безмало пресликан одговор на перфузију спиронолактоном уочавамо и за остале параметре у вези са систолном функцијом *SLVP*, *LVdevP*, *RPP* а виђен је и код  $dp/dt$  *min*. (графикони број 11 А, 11 Б, 11 В, 11 Д, 11 Ж, 12 А, 12 Б, 12 В, 12 Д, 12 Ж) Разлог ових промена је описани, пролазни позитивни инотропни ефекат спиронолактона [264]. Луситропни ефекат уочавамо у групи са дијабетесом на најнижем *CPP* ( $p < 0.05$ ) (графикон број 12 Б). За разлику од овог резултата у контролној групи луситропни ефекат је смањен при *CPP* 100 *cm H<sub>2</sub>O* ( $p < 0.05$ ) (графикон број 11 Б). Сам облик криве на графикону је подударан уз неподударност у значајности разлике. У литератури нема јасне одреднице која би објаснила уочене ефекте и њихове последице али се износи мишљење да спиронолактон мења и концентрацију  $\text{Ca}^{2+}$  и молекуларни одговор на промену концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  [264].

Када је у питању *DLVP* у контролној групи је уочен неутралан ефекат на најнижем *CPP* да би затим *DLVP* био снижен уз статистичку значајност на *CPP* 60 и 80 *cm H<sub>2</sub>O* ( $p < 0.05$ ) и благи пораст на највишем *CPP* 120 *cm H<sub>2</sub>O* (графикон број 11 Г). У групи са дијабетесом када је урађено поређење са контролним животињама при овим притисцима није било уочљиве разлике (графикон број 12 Г). Овако различит одговор поново потенцира закључак да је миокард у дијабетесу функционално различит. Смањење тонуса леве коморе у дијастоли у каскади промене притиска претходи описном смањењу параметара систолне функције и може бити узроковано описаним ефектом на пораст  $\text{Ca}^{2+}$  у дијастоли [264]. Исти аутори су сугерисали измењен одговор ткива на помену концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  при примени спиронолактона [264], Различит одговор ткива на спиронолактон у контролној групи и дијабетесу би у светлу претходног навода био у сагласију са опсервациом да дијабетес у функционалном смислу мења одговор ткива на ноксу.

Како је облик криве промене кардиодинамских параметара пре свега  $dp/dt$  веома сличан виђеном код експеримента са зофеноприлом могуће је да је и у овом случају у питању ефекат узрокован утицајем метаболизам и активност фосфоламбана [243]. За ово нема потврде у литератури. *Dhalla* и сарадници указују да је хомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  у

кардиомиоцитима регулисана са више протеина, поменути фосфоламбан је један од њих, и да промене њихове концентрације и активности може реметити хомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  [265].

Са друге стране блокада минералокортикостероидног рецептора према ранијим теоријама потенцира ефекте ткивног алдостерона преко мембранског рецептора и тај позитивни инотропни ефекат може бити пролазан [186]. Новија истраживања упућују на измену концентрације и реаговања на измену концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  [264]. У спроведеном експерименту пролазни позитивни инотропни ефекат је израженији у групи са дијабетесом (графикон број 12 А) што је у супротности са виђеним у групи са зофеноприлом (графикони број 3 А и 4 А).

Срчана фреквенца је снижена током перфузије спиринолактоном. Вредности су ниже на  $CPP$  60-120  $\text{cm H}_2\text{O}$  (графикони број 11 Ђ и 12 Ђ). Статистички значајна разлика уочена је при  $CPP$  60-100  $\text{cm H}_2\text{O}$  ( $p < 0.05$ ) (графикони број 11 Ђ и 12 Ђ). Дијабетес индукован стрептозотоцином према наводима *Boudina-e* и сарадника не доводи до измен срчане фреквенце [14] што је виђено и у спроведеном експерименту (графикон број 6). У обе групе виђено је статистички значајано смањење фреквенце након перфузије спиринолактоном (графикони број 11 Ђ и 12 Ђ). Модулатори РААС у спроведеном експерименту имају негативан утицај на срчану фреквенцу, дискретно након примене зофеноприла и валсартана, (графикони број 3 Ђ и 4 Ђ), али значајније испољено за спиринолактон и алискирен (графикони број 11 Ђ, 12 Ђ, 15 Ђ и 16 Ђ). Нема радова који би објаснили узрок овакве појаве. Лекови који су испољили ефекат на  $HR$  чинили су то на исти начин у обе групе, што потврђује раније наводе да стрептозотоцином индуковани дијабетес не утиче на  $HR$  [14].

Промене коронарног протока прате раније уочене промене за параметре систолне функције (графикони број 11 А, 11 Б, 11 В, 11 Д, 11 Ж, 12 А, 12 Б, 12 В, 12 Д, 12 Ж). Коронарни проток расте на  $CPP$  40  $\text{cm H}_2\text{O}$  у обе групе да би затим до краја био снижен и то уз статистичку значајност ( $p < 0.05$ ) (графикон број 11 Е и 12 Е). Ефекти на коронарни проток су у последица комбинације ефеката на контрактилност и срчану фреквенцу. У литератури се описује да спиринолактон спречава негативне ефекте алдостерона на коронарни проток [276]. У спроведеном огледу спиринолактон сем на  $CPP$  40  $\text{cm H}_2\text{O}$  није повећавао  $CF$ , напротив проток је нижи на вишим  $CPP$ . Разлике у експерименталном моделу могу бити узрок ове појаве али и негативни ефекти спиринолактона на срчану фреквенцу и релаксацију миокарда (графикони број: 11 Г, 12 Г, 11 Ђ, 12 Ђ). За тумачење коронарног протока од значаја су подаци из литературе према којима спиринолактон побољшава функцију  $eNOS$  [279]. Резултати  $NO$  се нису значајно мењали при акутној примени спиринолактона (графикони број 13 В и 14 В) али је уочена велика осцилација налаза у дијабетичној групи. Овакав резултат се још препознаје при примени валсартана

или алискирена у групи са дијабетесом. Претпостављени узрок је патолошка активација iNOS, при чему су регулаторни механизми измењени.

Супероксид анјон радикал је након перфузије спиринолактоном снижен при највишем притиску у контролној групи и при средњем притиску у групи са дијабетесом. Ово указује да спиринолактон може позитивно утицати на оксидациони стрес у хипертензији и дијабетесу, стањима са повишеним оксидационим стресом.

Са друге стране, вредности  $H_2O_2$  су непромењене након администрације спиринолактона у контролној и експерименталној групи животиња. *Ojeda-Cervantes* и сарадници су у свом истраживању показали да хронична примена спиринолактона снижава нивое  $H_2O_2$  [278]. *Maууас* и сарадници су испитивали ефекте четворонедељне администрације спиринолактона на здравим и дијабетичним пацовима, и закључили су да хронична примена спиринолактона повећава нивое укупних нитрита у плазми и активност глутатион редуктазе и пероксидазе. [279]. У литератури је наведено да хронична примена спиринолактона побољшава активност каталазе, још једног ензима антиоксидационе заштите са ефектима на  $H_2O_2$  [280, 281]. Резултати спроведеног огледа указују да се ефекти спиринолактона на  $H_2O_2$  не остварују након акутне администрације што указује на геномски ефекат (графикони број 13 Б и 14 Б).

Интересантно, индекс липидне пероксидације је значајно промењен након примене спиринолактона. У групи здравих животиња акутно примењен спиринолактон статистички значајно скоро на свим перфузионим притисцима делује смањењем *TBARS* у односу на контролне услове, док у групи дијабетичних смањење примећујемо на 60 cm  $H_2O$  (графикони број 13 Г и 14 Г). У претходно наведеним студијама, вредности *TBARS* нису биле промењене под утицајем спиринолактона, што опет није у сагласности са нашим резултатима а што објашњава разлика експерименталних модела. Уз валсартан спиринолактон доводи до највећег смањења *TBARS* и ово је најизраженије на највишем *СРР* (графикон број 41). Акутни ефекти спиринолактона са доминантним утицајем на *TBARS* може укључивати на протективна својства лека према биомембранама, које садрже бројне полинезасићене слободне масне киселине. Присуство хипертензије би очекивано могло да потенцира ефекте спиринолактона на оксидациони стрес имајући у виду да су кардиодепресорни ефекти спиринолактона израженији при супранормалним вредностима *СРР*.

## 5.5 УТИЦАЈ ПЕРФУЗИЈЕ АЛИСКИРЕНОМ НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У КОНТРОЛНОЈ ГРУПИ И ГРУПИ СА ДИЈАБЕТЕСОМ

Алискирен је директан блокатор ренина са ефектима који се остварују у циркулацији, ткивима али за разлику од већине других модулатора РААС и интрацелуларно. [6]. Управо способност достизања свих подручија где је ренин присутан била је схваћена као могућност свеобухватне инхибиције појачаног дејства РААС [251-254].

На основу доступних података дијабетес је карактерисан појачаном активношћу ткивног РААС у анималним моделима и то 3.4 пута у односу на контролне животиње а додатно још двоструко више када постоји придружена хипертензије [9].

Ренин се као и сви остали елементи РААС синтетише у ткивима и његова појачана активност подстиче нисходну активност елемената РААС са ефектом на пораст оксидационог стреса, инфламаторне каскаде, појачаног стварања екстрацелуларног матрикса и фиброзу ткива. Све ово је у експерименталним моделима и студијама на хуманој популацији успешно превенирано хроничном применом алискирена [251].

Различити модели модулације елемената РААС делују различитим механизмима. Претпостављено је да би комбинована терапија могла поправити крајње ефекте. Идеје директне инхибиције ренина уз вазодилаторне ефекте *ACEI* или комбинација ефеката *ACEI* са директном блокадом АТ1 рецептора што је ефекат сартана су определили клиничаре да примене овакве терапијске моделе. Како је већ изнето ово се није донело жељени резултат, управо супротно дошло је до повећања кардиоваскуларног морталитета [174-177]. Овим експериментом пружа се допринос сазнању које би помогло да се расветле ефекти акутне перфузије модулатора РААС на изоловано срца пацова са или без стимулације ткивног РААС хипергликемијом. Алискирен као свеобухватни блокатор ткивног ренина уједно је замишљен и као лек који би појачаним ефектима у групи са дијабетесом доказао веће присуство ткивног РААС у дијабетесу [152, 251].

*Westermann* и сарадници 2008 као и *Yang* и сарадници 2013. публикују радове у којима је Алискирен означен као лек који након хроничне пероралне примене унапређује систолну и дијастолну функцију, смањује апоптозу, ткивно ремоделовање и хипертрофију миокарда [251, 252]. *Parodi-Rullan* са сарадницима 2013. указује да је боља митохондријална функција након хроничне примене алискирена узрок смањеног постинфарктног ремоделовања миокарда у анималном моделу дијабетеса [253]. Са муриним моделом дијабетеса искуства објављује *Thomas* са сарадницима 2013 и указује да је хронична примена алискирена смањила дијастолну дисфункцију успешније од *ACEI* или сартана [254]. У светлу ових позитивних ефеката и раније изнесених негативних ефеката

комбинације алискирена са другим модулаторима РААС, спроведеним експериментом се пружа увид у разумевање природе акутних нежељених ефеката алискирена током перфузије изолованог срца здравих и пацова са дијабетесом.

У резултатима истраживања уочено је следеће: Прво алискирен је лек који је показао највећу разлику у ефектима на здраво и дијабетесом измењено ткиво (графикони број 15 и 16). Ова разлика је и квантитативна и по некад квалитативна. Квантитативна када је истосмерна и код контролне и групе са дијабетичним животињама а разликује се у квантитативном отклону у односу на стање пре перфузије лека. Квантитативну разлику уочава се код HR (графикони број 15 Ђ и 16 Ђ). Квалитативна разлика се уочава код параметара где је ефекат супротног смера, као што је виђено код  $dp/dt \max$  (графикони број 15 А и 16 А). Друго уочавају се изражени кардиодепресорни ефекти перфузије алискиреном уз веома значајну констатацију да су кардиодинамски ефекти у дијабетесу мањи (графикони број 15 и 16). Управо последњи навод потврђује повећано присуство ренина у ткиву изолованог срца пацова са индукованим дијабетесом. Везивањем за ренин алискирен очигледно у мањој ефективној концентрацији изазива ове нежељене ефекте па можемо закључити да блокада ренина није у последичној вези са уоченим кардиодепресорним ефектима. Ови ефекти су потенцирани порастом притиска па се може очекивати да би негативни ефекти алискирена били израженији у условима хипертензије.

Параметар који указује на брзину промене притиска у левој комори  $dp/dt \max$  је био неизмењен након перфузије алискиреном у контролној групи на мањим  $CPP$  али се уочава изостанак даљег раста вредности од  $CPP 80 \text{ cm H}_2\text{O}$  како је виђено пре перфузије леком (графикон број 15 А). Значајна разлика уочена је на  $CPP 120 \text{ cm H}_2\text{O}$  (графикон број 15 А). Кардиодепресорни ефекат је израженији како расте  $CPP$  и највећи је при супрафизиолошким вредностима  $CPP$  од  $120 \text{ cm H}_2\text{O}$  (графикон број 15 А). У групи са дијабетесом на супрот контролној групи  $dp/dt \max$  је растао са порастом  $CPP$  уз значајну разлику при  $CPP 60$  и  $80 \text{ cm H}_2\text{O}$  (графикон број 16 А). Аналогијом са догађајима у контролној групи током перфузије зофеноприлом можемо узети у обзир утицај на промет  $\text{Ca}^{2+}$  између сракоплазматског ретикулума и цитоплазме или метаболизам фосфоламбана [243]. Свакако је активна концентрација алискирена након интеракције са ткивним ренином мања и ако пођемо од ове претпоставке могуће да мања ефективна концентрација алискирена у групи са дијабетесом стимулише  $dp/dt \max$  на начин који се губи при већим концентрацијама лека. Ово додатно усмерава пажњу на интрацелуларно кретање  $\text{Ca}^{2+}$  али да је то свакако потребно осветлити даљим истраживачким радом.

Слично се мањају вредности и за  $dp/dt \min$  с тим да стимулативни ефекат у дијабетичној групи овде престаје на  $CPP 80 \text{ cm H}_2\text{O}$ , а затим се уочава блага супресија вредности без значајне разлике (графикон број 16 Б). Брзина релаксације прати али не у



потпуности брзину постизања тензије. Евидентно да су механизми који до ефекта доводе повезани.

Вредности *SLVP* у контролној групи пре и након перфузије алискиреном при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* нису измењене (графикон број 15 В). Порастом *CPP* овај *SLVP* значајно мање расте након перфузије алискиреном него што је био случај пре перфузије леком (графикон број 15 В). Највећа разлика је управо при највишем *CPP*, што указује на значај пораста притиска на зид миокарда за испољавање овог ефекта (графикон број 15 В). У групи са дијабетесом *SLVP* се мења на исти начин као за *dp/dt min* (графикони број 16 Б и 16 В) што додатно указује на заједнички механизам који је под утицајем перфузије алискиреном и завистан од притиска. На исти начин као *SLVP* мења се крива развојног притиска у левој комори - *LVdevP* (графикони број 15 Д и 16 Д).

И када је *DLVP* у питању резултати у контролној и групи са дијабетесом се веома разликују. У контролној групи осим на *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* перфузија алискиреном доводи до израженог пораста *DLVP* ( $p < 0.05$ ) а достизање прага високе статистичке значајности уочава се при *CPP* 60, 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* ( $p < 0.01$ ) (графикон број 15 Г). У групи са дијабетесом перфузија алискиреном не доводи до значајних промена *DLVP* и на исти начин прати пораст *CPP* пре и после примене лека (графикон број 16 Г). Сагледавајући претходне резултате уочава се да перфузија алискиреном код изолованих срца здравих пацова доводи до негативног инотропног и луситропног ефекта.

Када је у питању *HR*, перфузија алискиреном је довела до мање фреквенце при свим *CPP* вишим од 40 *cm H<sub>2</sub>O* у обе групе (графикони број 15 Ђ и 16 Ђ). Овде дакле није било умањења кардиодепресорног ефекта алискирена у групи са дијабетесом (графикон број 96). У литератури нема података о ефектима акутне или хроничне примене алискирена на *HR*.

Коронарни проток је у контролној групи био значајно мањи при свим *CPP* вишим од 40 *cm H<sub>2</sub>O* уз високу статистичку значајности при *CPP* 100 и 120 *cmH<sub>2</sub>O* ( $p < 0.01$ ) (графикон број 15 Е). У групи са дијабетесом није било значајних промена коронарног протока након перфузије алискиреном (графикон број 16 Е). Обзиром да у контролној групи расте *DLVP* при примени алискирена (графикон број 15 Г) један од узрока смањеног *CF* може бити појачана ригидност коронарних крвних судова у овој групи. У прилог ове хипотезе указују и паралелне промене са порастом *CPP* параметара брзине промене притиска у зиду коморе и самој левој комори (графикон број 15 А, 15 Б, 15 В). Алискирен ремети процес мишићне контракције и релаксације у контролној групи и то указује на поремећај метаболизма ћелиског  $Ca^{2+}$ . За овакво објашњење тренутно нема потврде у литератури. *Zhang* и срадници су 2014 објавили да четворонедељна примена алискирена штити миокард од исхемијско реперфузионе повреде активирајући сигнални пут *PI3K-Akt-eNOS* са последичним повећањем расположивог *NO* у миокарду [283].

Напразање зида леве коморе посматрано кроз параметар *RPP* је у контролној групи знатно смањено након перфузије алискиреном при свим *CPP* вишим од 40 *cm H<sub>2</sub>O* уз високу статистичку значајности при *CPP* 100 и 120 *cm H<sub>2</sub>O* ( $p < 0.01$ ) (графикон број 15 Ж). У групи са дијабетесом није било значајних промена *RPP* након перфузије Алискиреном (графикон број 16 Ж). Промене *RPP* на вишим притисцима да како не указују на релаксацију миокарда након перфузије алискиреном у контролној групи већ су у светлу претходних резулта такође одраз смањене систолне функције и остварене фреквенце.

Вредности  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  се нису значајно мењале након перфузије алискиреном ни у контролним групама ни у групи са дијабетесом (графикони број 17 А, 17 Б, 18 А и 18 Б). Благи тренд раста  $O_2^-$  са повећањем *CPP* у групи у којој постоји смањење параметара систолне функције на вишим *CPP* указује да ова два показатеља не морају ићи паралелно (графикони број 17 А, 15 А и 15 В) како је претходно виђено у групи, са спиринолактоном (графикони број 11 А, 11 В и 13 А). *Yamamoto* и сарадници су 2009 објавили да хронична примена алискирена доводи до смањене активности *NADPH* оксидазе и последичног смањења  $O_2^-$  [282]. Овакав ефекат је описан и за валсартан уз још израженије смањење при комбинованој примени [259]. Ефекат на смањење  $O_2^-$  при хроничној примени алискирена објављују и *Zang* и сарадници 2014 [258]. Плећаш и сарадници су 2015 објавили да у акутној примени алискирена у три различите дозе ефекат на смањење  $O_2^-$  уочавају тек са дозом од 10  $\mu\text{M}$  и то на највишем *CPP* од 120 *cm H<sub>2</sub>O* [261]. У спроведеном експерименту са 1  $\mu\text{M}$  алискирена налази се тренд смањења односно нешто нижа вредност  $O_2^-$  при *CPP* од 120 *cm H<sub>2</sub>O* у групи са дијабетесом (графикон број 18 А). Може се претпоставити да је ефекат алискирена немогућност адекватне контрактилности и поред исте или веће потрошње енергије. Сам ефекат на смањење активности *NADPH* оксидазе настаје већ након акутне администрације лека, у групи са дијабетесом (графикон број и 102). У овој групи хипергликемија изазива појачану активност овог прооксидативног ензима [217, 218]. Разлог за изостанак смањења  $O_2^-$  у контролној групи је у сагласју са наводима у литератури за кориштену концентрацију од 1  $\mu\text{M}$  алискирена [261]. Изостанак значајног смањења  $H_2O_2$  у групи са дијабетесом се може приписати умањеној активности *CAT* и *GPx* које се у дијабетесу описују [75, 196]. Може се претпоставити да алискирен нема акутни ефекат на ове ензиме. У литератури се у случају хроничне примене алискирена описује повећана активност *SOD*, *CAT* и *GPx* са повољним ефектом на параметре оксидативног стреса у хипертензији [260]. У спроведеном експерименту примена алискирена није довела до смањења  $H_2O_2$  напротив са порастом *CPP* постоји тренд да резултат расте што је насупрот виђеном за  $O_2^-$  у дијабетичној групи (графикони број 101-104). Може се претпоставити да услови хипертензије додатно компромитују активност *CAT* и *GPx* или повећавају активност *NADPH* оксидазе. За другу тезу налазимо потпору у литератури, наиме *Vaziri* и сар. 2003 у анималном моделу хипертензије изазване излагањем олову не налазе измењену активност *Mn SOD*, *CAT* и *GPx* у левој комори али налазе појачану активност *NADPH* оксидазе [262]. Оваква измена равнотеже фаворизује

продукцију  $O_2^-$  у условима хипертензије што даје више супстрата за дисмутацију у  $H_2O_2$  који затим није убрзано метаболисан активношћу *CAT* и *GPx* [262]. Дисмутација је при примени алискирена додатно повећана ефектима лека на пораст концентрације *SOD* како се то описује у литератури [260]. Динамичан и супротстављен утицај алискирена и хипертензије на активност *NADPH* оксидазе у условима повећане концентрације ткивног ренина какву налазимо у дијабетесу [9] указује не неопходност индивидуализације терапије односно пажљивог избора пацијената за које очекујемо да од лека добију највећу могућу корист.

Резултат *TBARS* указује на степен липидне пероксидације односно створеног *MDA* [263]. У литератури се описује протективни ефекат хроничне примене алискирена на липидну пероксидацију посматран кроз вредност *TBARS* [257]. Описани су и ефекти акутне перфузије алискиреном на *TBARS* када је уочено снижење при *CPP* 120 *cm H<sub>2</sub>O* са концентрацијом од 1  $\mu M$  (без статистичке значајности) и статистички значајно снижење са концентрацијом од 10  $\mu M$  ( $p < 0.05$ ). При осталим вредностима *CPP* 40-100 *cm H<sub>2</sub>O* није уочен ефекат на *TBARS* [261]. Ово би указивало да алискирен смањује липидну пероксидацију на дозно зависан начин и израженије у условима хипертензије. У спроведеном огледу који је такође подразумевао дозу од 1  $\mu M$  алискирена у контролној групи није уочена значајна разлика изузев при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* када је *TBARS* повишен (графикон број 17 Г) што није у сагласју са подацима из литературе [261]. У групи са дијабетесом *TBARS* је снижен при *CPP* 100 *cm H<sub>2</sub>O* ( $p < 0.05$ ) (графикон број 18 Г). Алискирен показује повољан ефекат на липидну пероксидацију у дијабетесу при вишим *CPP*. Нема података у литератури о акутним ефектима алискирена на анимални модел ДКМП.

Продукција *NO* је повећана након перфузије алискиреном код здравих пацова уз статистичку значајност при *CPP* 40, 60 и 100 *cm H<sub>2</sub>O* (графикон број 17 В). Добијени резултат указује на повољан ефекат алискирена на конститутивну *eNOS* већ након акутне примене и одржава се при порасту *CPP*. Налаз је у сагласију са претходно описаним резултатима у хроничном експерименту [283]. У групи са дијабетесом након перфузије алискиреном *NO* је статистички значајно виши при *CPP* 40 *cm H<sub>2</sub>O* ( $p < 0.05$ ), затим постаје нижи од *CPP* 60-100 *cm H<sub>2</sub>O*, при *CPP* 80 *cm H<sub>2</sub>O* значајно нижи ( $p < 0.05$ ), а при *CPP* 120 *cm H<sub>2</sub>O* је високо значајно повишен ( $p < 0.01$ ) (графикон број 18 В). Осцилације вредности *NO* су узрок овакве неконзистентности и уочене су код више група у нашем експерименту. Слично кретање вредности налазимо након примене спиронолактона у групи са дијабетесом, чак је и кретање криве резултата попут виђеног након примене алискирена (графикони број 14 В и 18 В). Перфузија валсартаном у дијабетичној групи такође доводи до великих осцилација вредности *NO* (графикон број 18 В). Зофеноприл није узроковао овакве осцилације, већ уједначено снижену вредност *NO* на средњим притисцима ( $p < 0.05$ ) (графикон број 6 Г). Ни оваква реакција на акутну перфузију миокарда није очекивана

имајући у виду ефекте хроничне примене *ACEI* [185, 240]. Вероватни разлог за уочене неконзистентности налаза је нарушена способност контроле концентрације *NO* у патолошком метаболичком миљеу. Постоји неконтролисана продукција *NO* у дијабетесу као полседница активације *iNOS*, паралелно са недостатком супстрата потребног за синтезу *NO* - *L*-аргинина [230, 239].

Упоредна анализа коришћених лекова издваја ефекте алискирена по више основа. Прво алискирен је лек код кога је најизраженија разлика у реакцији здравог и дијабетесу изложеног миокарда. Ово се нарочито односи на  $dp/dt$  (графикони број 19 и 20) и притиске у левој комори (графикони број 23 и 24). Друго алискирен је лек који је изазвао највећи пад  $dp/dt\ max$  (графикони број 19) у контролној групи и највећи пораст  $dp/dt\ max$  у групи са дијабетесом (графикони број 20) и то на свим *CPP*. Треће најизраженије смањење  $dp/dt\ min$  у контролној групи (графикон број 21). У истој групи алискирен доводи до највећег смањења *SLVP* при вишим *CPP* (графикон број 23), смањења *CF*, *HR* и пораста *DLVP* (графикони број 31, 29 и 25). И у контролној групи *RPP* је најизраженије смањен управо након перфузије алискиреном и то при вишим *CPP* (графикон број 33). Ефекти алискирена се издвајају и по смањењу продукције  $O_2^-$  у дијабетичном миокарду при највишим *CPP* (графикон број 18 А) што је израженији ефекат од спиронолактона за који се примарно очекивао испољенији модулаторни ефекат на ниво оксидативног стреса (графикон број 14 А). Услед повећаног ослобађања *NO* већ након акутне примене, алискирен има потенцијал да регулише дисфункцију ендотела и умањи хиперфузију ткива.

Ефекти алискирена на кардиодинамске параметре здравог и дијабетичног срца упућују на кардиодепресорни ефекат на здрава срца које се смањује у дијабетичном миокарду. Резултати потенцирају ранији закључак да је миокард изложен четворонедељној хипергликемији функционално различит и да је ткивни РААС појачано активан у овој групи. Ефекти перфузије алискиреном постају израженији са порастом *CPP* што указује да је хипертензија важан фактор за испољавање негативних ефеката алискирена.

**VI**  
**ЗАКЉУЧАК**

### 6.1. ЗАКЉУЧАК ЗА ГЛАВНУ ХИПОТЕЗУ:

Главна хипотеза: Хронична хипергликемија доводи до дијастолне и у мањој мери систолне дисфункције миокарда и повећане ригидности коронарних крвних судова.

Закључак: Хронична хипергликемија је довела до дијастолне дисфункције изолованог срца пацова. Поремећај је функционалне природе. Није уочен поремећај систолне функције ни срчане фреквенце. Коронарни проток је благо смањен при вишим перфузионим притисцима. Хипотеза је потврђена

### 6.2. ЗАКЉУЧЦИ ЗА ОСТАЛЕ ХИПОТЕЗЕ

1. Хипотеза: Модулатори РААС остварују различит утицај на миокард и крвне судове код здравих и дијабетичних животиња.

Закључак: Модулатори РААС остварују различите ефекте на миокарду здравих у односу на миокард пацова са дијабетесом. Ова разлика је и квантитативна а при примени неких лекова и квалитативна. Хипотеза је потврђена

2. Хипотеза: Модулатори РААС имају већи утицај на миокард и крвне судове на срцу пацова којима је индукован дијабетес.

Закључак: Акутни ефекти модулатора РААС су израженији у контролној групи. Хипотеза је одбачена.

3. Хипотеза: Директни инхибитор ренина Алискирен има већи утицај на срца пацова којима је индукован дијабетес од инхибитора АСЕ зофеноприла и АТ1 рецепторског антагониста валсартана.

Закључак: У групи са дијабетесом алискирен је имао израженији ефекат на  $dp/dt$ , HR и  $O_2^-$  од зофеноприла и валсартана. За остале параметре алискирен није испољио израженије ефекте од зофеноприла и валсартана. Хипотеза је делимично потврђена.

4. Хипотеза: Најјачи утицај на метаболизам *L*-аргинин/*NO* система имају инхибитори АСЕ-зофеноприл.

Закључак: Очекивани пораст *NO* није уочен након примене зофеноприла, напротив у групи са дијабетесом довео је до снижавања *NO* на средњим CPP. Једини лек који након акутне примене повећава *NO* је алискирен и то у контролној групи. Хипотеза је одбачена.

5. Хипотеза: Најјачи утицај на метаболите оксидационог стреса има блокатор АТ1 рецептора валсартан.

Закључак: Најјачи утицај на смањење  $O_2^{\cdot -}$  у групи са дијабетесом имао је алискирен а затим спиринолактон, док је у контролној групи најиспољенији ефекат имао зофеноприл, испред валсартана. До највећег пораста  $O_2^{\cdot -}$  довео је валсартан у обе групе али у условима хипотензије и хипоксије. Ефекат у контролној групи се са порастом CPP мења у снижавање  $O_2^{\cdot -}$  а у групи са дијабетесом се губи. Водоник пероксид није мењао концентрацију након акутне примене модулатора РААС: Највеће смањење *TBARS* у дијабетесу изазвала је акутна примена зофеноприла док је у контролној групи овакав ефекат имао спиринолактон. Алискирен и зофеноприл су довели до највећег пораста *TBARS* у контролној групи. У групи са дијабетесом није било додатног пораста *TBARS*, обзиром да је параметар липидне пероксидације већ повишен због хипергликемије. Очекивано најјаче снижавање параметара оксидационог стреса након примене валсартана није потврђено али се уочава овакав ефекат у контролној групи при највишем притиску. Хипотеза је одбачена.

6. Хипотеза: Блокатор минералокортикостероидног рецептора спиринолактон повећава метаболите оксидационог стреса у коронарном ефлуенту.

Закључак: У условима хипотензије спиринолактон у обе групе доводи до иницијалног пораста  $O_2^{\cdot -}$  и *TBARS*. Са порастом CPP *TBARS* је снижен у обе групе. У дијабетесу се на средњим CPP а у контролној групи при највећем притиску уочава снижење  $O_2^{\cdot -}$ . Нема ефеката на  $H_2O_2$  након акутне примене спиринолактона. Хипотеза је делимично потврђена.

### 6.3. ДОДАТНИ ЗАКЉУЧЦИ ПРОИСТЕКЛИ ИЗ ИСТРАЖИВАЊА

1. Параметри оксидационог стреса  $O_2^{\cdot -}$  и  $H_2O_2$  су снижени у групи са дијабетесом док је *TBARS* повишен. Није било измене концентрације *NO* у ДКМП.
2. Модулатори РААС остварују различите ефекте на миокарду здравих у односу на миокард пацова са дијабетесом. Ова разлика је квантитативна, а при примени неких лекова и квалитативна.
3. Сви испитивани модулатори РААС након акутне примене доводе до снижавања HR. Овај ефекат се јавља у обе групе тако да није у вези са хипергликемијом, а испољен је при нормалним и повишеним притисцима.
4. Акутни ефекти модулатора РААС на *NO* у дијабетесу су значајно измењени у односу на контролну групу и резултате хроничне администрације због патолошког метаболичког миљеа.

5. Алискирен је лек који је показао највећу разлику у ефектима на здраво и дијабетесом измењено ткиво. Ова разлика је и квантитативна и квалитативна. Перфузија алискиреном код изолованих срца здравих пацова доводи до негативног инотропног и луситропног ефекта. Ови ефекти су мање изражени у дијабетесу. Управо последњи навод потврђује повећано присуство ренина у ткиву изолованог срца пацова са индукованим дијабетесом. Везивањем за ренин алискирен у мањој ефективној концентрацији изазива нежељене ефекте па можемо закључити да блокада ренина није у последичној вези са уоченим кардиодепресорним ефектима. Ови ефекти су потенцирани порастом притиска. Коронарни проток је редукован само у контролној групи. Алискирен у контролној групи показује тренд повећања  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  и *TBARS*, без статистичке значајности. Индекс липидне пероксидације је у овој групи повишен у условима хипотензије. Концентрација *NO* у миокарду здравих пацова расте након перфузије алискиреном. У дијабетесу  $O_2^-$  након администрације алискирена расте у условима хипотензије. Повољан ефекат алискирена на  $O_2^-$  и индекс липидне пероксидације уочава се при условима хипертензије. Акутна перфузија алискиреном у дијабетесу нема утицај на концентрацију  $H_2O_2$ .
6. Зофеноприл доводи до позитивног инотропног и луситропног ефекта на нижим перфузионим притисцима да би на вишим притисцима био регистрован негативан инотропан и луситропан ефекат. Највероватнији узрок је оптерећење ћелија  $Ca^{2+}$ , поремећај функције митохондрија, измена у промету  $Ca^{2+}$  између саркоплазматског ретикулума и цитоплазме као и модулација ефеката фосфоламбана. Коронарни проток је у контролној групи минимално повећан у условима хипотензије и хипоксије да би био нижи на највишем перфузионим притиску. У групи са дијабетесом перфузија зофеноприлом доводи до значајног пада коронарног протока. Зофеноприл је међу испитиваним лековима довео до највећег пада  $O_2^-$  у контролној групи што може проистацати из антиоксидационих особина самог лека. Није било утицаја на  $H_2O_2$ . У миокарду здравих пацова *TBARS* је након перфузије зофеноприлом повишен и ово може бити у вези са израженом липофилношћу зофеноприла. У групи са дијабетесом  $O_2^-$  је повишен на нижим перфузионим притисцима а *TBARS* је благо снижен на средњим притисцима. Није било утицаја на *NO* у контролној групи док је у групи са дијабетесом снижен на средњим притисцима.
7. Валсартан показује негативно инотропно и још израженије негативно луситропно дејство и код здравих и код животиња са дијабетесом. Ово указује да ефекти нису везани за последице излагању хипергликемији. Односно да модулација



активираниог пута преко АТ1 рецептора није узрок промена. Валсартан је у међусобном поређењу ефеката лекова изазвао навећи пад  $dp/dt_{min}$ ,  $SLVP$ ,  $LVdevP$  и  $RPP$  уз пораст  $DLVP$  који је израженији само код алискирена у контролној групи.  $DLVP$  расте у обе групе а у дијабетесу је разлика испољенија у хипотензији да би се при високим притисцима изгубила. Коронарни проток је смањен код здравих животиња док се у дијабетесу ова разлика не уочава. Параметар оксидационог стреса  $O_2^{\cdot-}$  је повећан након перфузије валсартаном у условима хипотензије у обе групе да би на средњим и вишим притисцима био снижен у контролној и неизмењен у групи са дијабетесом. Параметри  $TBARS$  и  $NO$  нису значајно мењани након перфузије валсартаном изузев ниже вредности  $TBARS$  у контролној групи при највишем  $CPP$ .

8. Спиринолактон доводи до убрзања  $dp/dt$  и пораста  $SLVP$  на нижим  $CPP$ . Овај позитивни инотропни ефекат је пролазан. На вишим  $CPP$  доводи до смањивања параметара систолне функције. Спиринолактон смањује дијастолни притисак код здравих пацова на средњим  $CPP$  али не и у групи са дијабетесом. Спиринолактон је довео до снижавања срчане фреквенце у обе групе а израженије у групи са дијабетесом. Супероксид анјон радикал је након перфузије спиринолактоном снижен при највишем притиску у контролној групи и при средњем притиску у групи са дијабетесом, што указује да спиринолактон може позитивно утицати на оксидациони стрес у хипертензији и дијабетесу. Спиринолактон не утиче на метаболизам  $H_2O_2$  и  $NO$  након акутне примене а  $TBARS$  смањује у обе групе, израженије код здравих пацова.

# **VII**

# **ЛИТЕРАТУРА**

1. Sicree R, *The Global burden. Diabetes and impaired glucose tolerance, IDF Diabetes Atlas, fourth edition*
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sircee R, King H *Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030 Diabetes Care 2004; 27: 1047–1053*
3. Shaw E. J, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes research and clinical practice 2010; 87: 4–14*
4. Zimmet P. *Global and societal implications of the diabetic epidemic. Nature 2001; 414: 782-7*
5. Massi M. *The cost of diabetes in Europe CODE 2 study. Diabetologia. Jul 2002; 45 (7): S1-4*
6. Kumar R, Singh VP, Baker KM: *The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. Curr Opin Nephrol Hypertens 17:168 – 173, 2008*
7. Lijnen J. P. *Modulation of reactive Oxygen species and collagen synthesis by angiotensin II in cardiac fibroblasts. The open Hypertension Journal 2011; 4: 1-17*
8. Lim S. H. *Diabetes mellitus the renin angiotensin aldosteron sistem and the heart. Arch Intern Med 2004; 164: 1737-1748*
9. Kumar R. *Review: intracardiac cellular angiotensin system in diabetes AmJ Physiol Integr Comp Physiol 2012; 302: R510-R517*
10. Singh P. V. *Le B Baker KM Kumar R Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress and cardiac fibrosis. Diabetes 2008; 57: 3297-3306*
11. Hayat SA Patel B Khattar RS Malik RA *diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment Clinical Science (2004) 107, 539–557*
12. Li YW, Aeno w WS *Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. J. Clinic Experiment Cardiol 2011; 2: 114*
13. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. *Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingam study. Am J. Cardiol 1974; 34: 29-34*
14. Boudina S, Abel ED. *Diabetes Cardiomyopathy revisited Circulation 2007; 115: 3213-3223*
15. Tocci G, Sciarretta S, Volpe M. *Development of heart failure in recent hypertension trials. J. Hypertens 2008; 26: 1477–1486*
16. Du X, Ninomiya T, De Galan B, Abadir E, Chalmers J, Pillai A, Woodward M, Cooper M, Harrap S, Hamet P, Poulter N, Lip GY, Patel A. *Risks of cardiovascular events and effects of routine blood pressure lowering among patients with type 2*

- diabetes and atrial fibrillation: results of the ADVANCE study. Eur Heart J. ADVANCE Collaborative Group 2009; 30: 1128–1135*
17. Carrabba N, Valenti R, Parodi G, Santoro GM, Antoniucci D. Left ventricular remodeling and heart failure in diabetic patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110: 1974–1979
  18. MacDonald MR, Petrie MC, Varyani F, Ostergren J, Michelson EL, Young JB, Solomon SD, Granger CB, Swedberg K, Yusuf S, Pfeffer MA, McMurray JJ. Impact of diabetes on outcomes in patients with low and preserved ejection fraction heart failure: an analysis of the candesartan in heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme. *Eur Heart J. CHARM Investigators* 2008; 29: 1377–1385
  19. Marso SP, Miller T, Rutherford BD, Gibbons RJ, Qureshi M, Kalynych A, Turco M, Schultheiss HP, MeHRan R, Krucoff MW, Lansky AJ, Stone GW. Comparison of myocardial reperfusion in patients undergoing percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation acute myocardial infarction with versus without diabetes mellitus (from the EMERALD Trial). *Am J. Cardiol* 2007; 100: 206–210
  20. Algeria JR, Miller TD, Gibbons RJ, Yi Q., Yusuf S. Collaborative Organization of RheotHRx Evaluation (CORE) Trial Investigators Infarct size, ejection fraction, and mortality in diabetic patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Am Heart J* 2007; 154: 743–750
  21. Stratton IM, Adler AI, Neil HA et al. Association of hyperglycemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS35): prospective observational study. *Brit Med J* 2000; 321: 405-412
  22. Trachanas K, Sideris S, Aggeli C, Paulidakis E, Gatzoulis K, Tousoulis D, Kallikazaros I. Diabetic cardiomyopathy: from pathophysiology to treatment *Hellenic J. Cardiol* 2014; 55: 411-421
  23. Witteles RM, Fowler MB. Insulin resistant cardiomyopathy: Clinical evidence mechanisms and treatment options *J. Am. Coll. Cardiol* 2008; 51: 93-102
  24. Rubler S. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 1972; 30: 595– 602
  25. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 1972; 30: 595–602
  26. Factor SM, Minase T, Sonnenblick EH. Clinical and morphological features of human hypertensive - diabetic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1980; 99: 446–458
  27. Van Hoesen KH, Factor SM. A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive - diabetic heart disease. *Circulation* 1990; 82: 848–85

28. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA (2006) Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114:597–605
29. Schalkwijk CG, Baidoshvili A, Stehouwer CD, Van Hinsbergh VW, Niessen HW. Increased accumulation of the glycoxidation product Nεpsilon - (carboxymethyl) lysine in hearts of diabetic patients: generation and characterisation of a monoclonal anti-CML antibody. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1636: 82–89
30. Van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao - Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbe'ly A, Van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 2008; 117: 43–51
31. Falcao - Pires I, Hamdani N, Borbe'ly A, Gavina C, Schalkwijk CG, Van der Velden J, Van Heerebeek L, Stienen GJ, Niessen HW, Leite-Moreira AF, Paulus WJ. Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness. *Circulation* 2011; 124: 1151–1159
32. Ban CR, Twigg SM, Franjic B. et al. Serum MMP-7 is increased in diabetic renal disease and diabetic diastolic dysfunction. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 335–341
33. Picano E, Pelosi G, Marzilli M, Lattanzi F, Benassi A, Landini L, L'Abbate A. In vivo quantitative ultrasonic evaluation of myocardial fibrosis in humans. *Circulation* 1990; 81: 58–64
34. Pe'rez JE, McGill JB, Santiago JV, Schechtman KB, Waggoner AD, Miller JG, Sobel BE. Abnormal myocardial acoustic properties in diabetic patients and their correlation with the severity of disease. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 1154–1162
35. Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH. Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcN Acylation. *J Biol Chem.* 2003;278:44230 – 44237.
36. Kwong RY, Sattar H, Wu H, Vorobiof G, Gandla V, Steel K, Siu S, Brown KA. Incidence and prognostic implication of unrecognized myocardial scar characterized by cardiac magnetic resonance in diabetic patients without clinical evidence of myocardial infarction. *Circulation* 2008; 118: 1011–1020
37. Basu R, Oudit GY, Wang X, Zhang L, Ussher JR, Lopaschuk GD, Kassiri Z. Type 1 diabetic cardiomyopathy in the Akita (Ins2WT/C96Y) mouse model is characterized by lipotoxicity and diastolic dysfunction with preserved systolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H2096–H2108
38. Fisher M, Mc Murrey JJ. *Diabetic Cardiology*. John Wiley and Sons Ltd.
39. Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves

- myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. Diabetes 2002; 51: 1166 – 1171.*
40. Watanabe K, Thandavarayan R. A, Harima M, Sari F. R, Gurusamy N, Veeraveedu P. T, Mito S, Arozal W, Sukumaran V, Laksmanan A. P, Soetikno V, Kodama M. and Aizawa Y. *Role of Differential Signaling Pathways and Oxidative Stress in Diabetic Cardiomyopathy. Current Cardiology Reviews 2010; 6: 280-290*
  41. Hunyady L Catt K J *Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II 2006 Molecular endocrinology 20:953-970*
  42. Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A, Kajstura J. *Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II - dependent. Lab Invest J Tech Methods Pathol 2000; 80: 513–527.*
  43. Khatter JC, Sadri P, Zhang M, Hoeschen RJ. *Myocardial angiotensin II (Ang II) receptors in diabetic rats. Ann N York Acad Sci 1996; 793: 466–472.*
  44. Christlieb AR, Long R, Underwood RH. *Renin-angiotensin-aldosterone system, electrolyte homeostasis and blood pressure in alloxan diabetes. Am J Med Sci 1979; 277: 295–303.*
  45. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal - Ginard B, Anversa P. *Myocardial cell death in human diabetes. Circ Res 2000; 87: 1123–1132.*
  46. Liu X, Suzuki H, Sethi R, Tappia PS, Takeda N, Dhalla NS. *Blockade of the renin-angiotensin system attenuates sarcolemma and sarcoplasmic reticulum remodeling in cHRonic diabetes. Ann N Y Acad Sci 2006; 1084: 141–154.*
  47. Yaras N, BilgiNO glu A, Vassort G, Turan B. *Restoration of diabetes induced abnormal local Ca<sub>2</sub> release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 292: H912–H920.*
  48. Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, De Angelis N, Ghezzi P, Latini R, Masson S. *Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. Life Sci 2006; 79: 121–129*
  49. Rosen R, Rump AF, Rosen P. *The ACE-inhibitor captopril improves myocardial perfusion in spontaneously diabetic (BB) rats. Diabetologia 1995; 38: 509 –517.*
  50. Cai L, Wang Y, Zhou G, Chen T, Song Y, Li X, Kang YJ. *Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2006; 48: 1688 –1697.*
  51. Cai L. *Suppression of nitrate damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. Free Radic Biol Med 2006; 41: 851– 861.*

52. Wold LE, Ren J. Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase dependent oxidative stress mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 1066–1071.
53. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 2002; 51: 1938–1948.
54. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223–234.
55. Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2006; 55: 798–805.
56. Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation* 2003; 108: 754–759.
57. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1784–1789.
58. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates cardiac myocyte phenotype via concentration dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 615–621.
59. Liang Q, Carlson EC, Donthi RV, Kralik PM, Shen X, Epstein PN. Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2002; 51: 174–181.
60. Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Matsusaka H, Inoue N, Ohta Y, Yokota T, Sunagawa K, Tsutsui H. Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2237–H2245.
61. Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 25–33.
62. Carley AN, Severson DL. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1734: 112–126.
63. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC., Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP. The cardiac phenotype induced by PPAR $\alpha$  overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002; 109: 121–130.
64. Goyal BR, Mehta AA. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiological mechanisms and cardiac dysfunction. *Hum exp Toxicol* 2013; 32: 571–590.
65. Voulgari C, Papadogianis D, Tentolouris N. Diabetic Cardiomyopathy: from the pathophysiology of the cardiac myocytes, to current diagnosis and management strategies. *Vasc health Risk Manag* 2010; 6: 883–903.

66. Finck BN, Han X, Courtois M, Aimond F., Nerbonne JM, Kovacs A, Gross RW, Kelly DP. A critical role for PPAR alpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1226–1231.
67. Duncan JG, Fong JL, Medeiros DM, Finck BN, Kelly DP. Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway. *Circulation* 2007; 115: 909–917.
68. Yang J, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Kovacs A, Febbraio M, Finck BN, Kelly DP. CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 2007; 100: 1208–1217.
69. Pierce GN, Dhalla NS. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can J Cardiol* 1985; 1: 48–54.
70. Tanaka Y, Konno N, Kako KJ. Mitochondrial dysfunction observed in situ in cardiomyocytes of rats in experimental diabetes. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 409–414.
71. Lashin O, Romani A. Hyperglycemia does not alter state 3 respiration in cardiac mitochondria from type-I diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2004; 267: 31–37.
72. Shen X, Zheng S, Thongboonkerd V, Xu M, Pierce WM Jr, Klein JB, Epstein PN. Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E896–E905.
73. Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME., Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 2005; 112: 2686–2695.
74. Turko IV., Murad F. Quantitative protein profiling in heart mitochondria from diabetic rats. *J Biol Chem* 2003; 278: 35844–35849.
75. Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, Xia S, Xu M, Carlson EC, Epstein PN. Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 1336–1343.
76. Poornima IG, Parkih P, Shanon RP. Diabetic Cardiomyopathy: search for unifying hypothesis *Circ Res* 2006; 98: 596-605
77. Unger RH, Orci L. Lipotoxic diseases of NO adipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 (suppl 4): S28–S32.
78. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001; 108: 437–446.
79. O'Neill BT, Abel ED. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J Clin Invest* 2005; 115: 2059–2064.



80. Morisco C, Condorelli G, Trimarco V, Bellis A, Marrone C., Condorelli G, Sadoshima J, Trimarco B. Akt mediates the cross-talk between beta-adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes. *Circ Res* 2005; 96: 180–188.
81. Kumar S. V, Saritha G, Fareedullah Md. Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases *Annals of Biological Research* 2010; 1 (3): 158-173.
82. Poornima IG, Parikh P, Shannon RP Diabetic Cardiomyopathy The Search for a Unifying Hypothesis *Circ Res.* 2006;98:596-605.
83. Depre C, Young ME, Ying J, Ahuja HS, Han Q, Garza N, Davies PJ, Taegtmeyer H. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 985–996.
84. Dhalla NS, Pierce GN, Innes IR, Beamish RE. Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can J Cardiol* 1985; 1: 263–281.
85. Scognamiglio R, Avogaro A, Negut C, Piccolotto R, Vigili dK, Tiengo A. Early myocardial dysfunction in the diabetic heart: current research and clinical applications. *Am J Cardiol* 2004; 93: 17A–20A.
86. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Myocardial substrate etabolism: implications for diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 69–179.
87. Schannwell CM, Schneppenheim M, Perings S, Plehn G, Stauer BE. Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology* 2002; 98: 33–39.
88. Ha JW, Lee HC, Kang ES, Ahn CM, Kim JM, Ahn JA, Lee SW, Choi EY, Rim SJ, Oh JK, Chung N. Abnormal left ventricular longitudinal functional reserve in patients with diabetes mellitus: implication for detecting subclinical myocardial dysfunction using exercise tissue Doppler echocardiography. *Heart* 2007; 93: 1571–1576.
89. Acar G, Akcay A, Sokmen A, Ozkaya M, Guler E, Sokmen G, Kaya H, Nacar B, Tuncer C. Assessment of atrial electromechanical delay, diastolic functions, and left atrial mechanical functions in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Am Soc Echocardiogr* 2009; 22: 732–738.
90. JW Ha, HC Lee, ES Kang et al. Abnormal left ventricular longitudinal functional reserve in patients with diabetes mellitus: implications for detecting subclinical myocardial dysfunction using exercise tissue Doppler echocardiography *Heart* 2007; 93: 1571-1576.
91. Poirier P, Bogaty P, Garneau C, Marois L, Dumesnil JG. Diastolic dysfunction in NO rnotensive man with well controlled diabetes type 2: importance in maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 2001; 24: 5-10.
92. Zabalgoitia M, Ismaeil MF, Anderson L, Maklady FA. Prevalence of diastolic dysfunction in normotensive asimtomatic patients with well controlled diabetes type 2. *Am J Cardiol* 2001; 87: 320-323.

93. Boyer JK, Thanigaray S, Schechtman KB, Perez JE. Prevalence of left ventricle diastolic dysfunction in asymptomatic normotensive patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2004; 93: 870-875
94. Hare JL, Hordern MD, Leano R, Stanton T, Prins JB, Marwick TH. Application of an exercise intervention on the evolution of diastolic dysfunction in patients with diabetes mellitus: efficacy and effectiveness. *Circ Heart Fail* 2011; 4: 441-449
95. Borlaug BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Eur Heart J* 2011; 32: 670-679
96. Shindler DM, Kostis JB, Yusuf S. et al Diabetes mellitus a predictor of morbidity and mortality in the Studies of Left ventricular Dysfunction (SOLVD) Trials and registry. *Am J Cardiol* 1996; 77: 1017-1020
97. Ryden L, Armstrong PW, Cleland JG. et al Efficacy and safety of high dose lisinopril in chronic heart failure patients and high cardiovascular risk including those with diabetes mellitus. Results from ATLAS trial. *Eur Heart J*. 2000; 21: 1967-1978
98. Komajda M, Carson PE, Hetzel S. et al. Factors associated with outcome in heart failure with preserved ejection fraction: findings from irbesartan in heart failure with preserved ejection fraction study (I-PRESERVE). *Circ Heart Fail* 2011; 4: 27-35
99. Vermees E, Ducharm A, Bourassa MG, Lessard M, White M, Tardif JC. Enalapril reduces the incidence of diabetes in patients with chronic heart failure: insight from Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 2003; 107: 1291-1296
100. Dickstein K, Kjekshus J. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomized trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II antagonist Losartan. *Lancet* 2002; 360: 752-760
101. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  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.
102. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 506-14.
103. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 1996; 148: 291-300.
104. Wang HD, Xu S, Johns DG, et al. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. *Circ Res* 2001; 88: 947-53.

105. Cifuentes ME, Rey FE, Carretero OA, Pagano PJ. Up-regulation of p67phox and gp91phox in aortas from angiotensin II- infused mice. *Am J Physiol* 2000; 279: H2234-40.
106. Villarreal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation* 1993; 88: 2849-61.
107. Crabos M, Roth M, Hahn AW, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured rat fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *J Clin Invest* 1994; 93:2372-8.
108. Lijnen P, Petrov V, Fagard R. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2001; 2: 117-22.
109. Brilla CG, Scheer C, Rupp H. Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix: Modulation of cardiac fibroblast function by angiotensin II type 1 receptor antagonism. *J Hypertens* 1997; 15: S13-8.
110. Crawford DC, Crobanian AV, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res* 1994; 74: 727-39.
111. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 334-48.
112. Nagasawa K, Zimmerman R, Westernachter D, Schaper J. Angiotensin II induced collagen mRNA expression in cardiac fibroblasts depends on autocrine production of transforming growth factor-beta. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 43A.
113. Lijnen P, Papparella I, Petrov V, Semplicini A, Fagard R. Angiotensin II-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. *J Hypertens* 2006; 24: 757- 66.
114. Zhang GX, Lu XM, Kimura S, Nishiyama A. Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogenactivated protein kinase activation. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 204-12.
115. Seeger H, Lippert C, Wallwiener D, Mueck AO. Valsartan and candesartan can inhibit deteriorating effects of angiotensin II on coronary endothelial function. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2001; 2: 141-3.
116. Rouet-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P, Lafuma C. Angiotensin II induces nuclear factor-kappa B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1767-78.
117. Solini A, Santini E, Ferrannini E. Enhanced angiotensin II mediated effects in fibroblasts of patients with familial hypercholesterolemia. *J Hypertension* 2005; 23: 367-74.

118. Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens* 2004; 17: 597-603.
119. Burelle Y, Khairallah M, Ascah A, et al. Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 310-21.
120. Tigerstedt R, Bergman PG 1898. Niere und Kreislauf. *Arch. Physiol.* 8:223-71
121. Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz GW, Dostal DE, Kumar R. Evidence of a NO vel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *RegulPept.* 2004; 120:5–13. [PubMed: 15177915]
122. Silvestre JS Robert V Heymes C Aupetit-Faisant B, Mouas C et all 1988 Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the patohysiological regulation. *J. Biol. Chem.* 273:4883-91
123. Takeda Y Miyamori I Yoneda T Iki K Hatakeyama H 1995 Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension* 25:170-73
124. Gomez-Sanches CE Zhou MY Cozza EN Morita H Foecking MF Gomez-Sanches EP. 1997. Aldosterone biosynthesis in rat brain. *Endocrinoogy* 138:3369-73
125. Dell'italia LJ. Translational success stories: Angiotensin receptor 1 antagonists in heart failure. *Circ Res.* 2011; 109:437–452. [PubMed: 21817164]
126. Bader M Tissue Renin Angiotensin Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 2010 50:439-65
127. Berrv C. Touvz R. Dominicczak AF. Webb RC. Johns DG. 2001. Angiotensin receptors: sinaline. vascular nathonphysiology. and interactions with ceramide. *Am.J. Physiol Heart Circ. Physiol.* 281:112337-65
128. Kaschina E, Unger T. 2003. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 12:70-88
129. de Gasparo M. Catt K.J. Inagami T. Wright JW. Unger T. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52:415-72
130. Welch WJ- 2008. Angiotensin H-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfuction. *Hypertension* 52:51-56
131. Santos RA. Ferreira A.J. 2007. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Cmr. Opin. NepHrol. Hypertens.* 16:122-2
132. Wright JW. Harding JW. 1994. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci. Biochav. Rev.* 18:21—53
133. Baltatu O. Bader M. Ganten D. 2005. Angiotensin. In *Encyclopedia of Stress*, ed. G Fink. Oxford. UK: Elsevier. 2nd ed.
134. Metzger R. Bader M. Ludwig T. Berberich C. Bunnemann B. Ganten D. 1995. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett.* 357:27-32
135. Nguyen G, Delaine F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. 2002. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J. Clin. Invest.* 109:1417-27
136. Bader M. 2007. The second life of die (pro) renin receptor. *J. Renin Ang. Aid. System* 8:205-208
137. Matsusaka T, Miyazaki Y, Ichikawa I. 2002. The renin angiotensin system and

- kidney development. Annu. Rev. Physiol.* 64:551-61
138. A'liiller DN, Hilgers KF, Bohlender J, Linnoldt A, Wagner J, et al. 1995. Effects of human renin in the vasculature of rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension* 26:272-78
139. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. 2000. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am. J. Hypertens.* 13: S.31—38
140. Saito K, Gutkind JS, Saavedra JM. 1987. Angiotensin II binding sites in the conduction system of rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 253:H1618-22
141. Crabos M, Roth M, Hahn AW, Erne P. 1994. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *J. Clin. Invest.* 93:2372-78
142. Koch-Weser J. 1964. Myocardial actions of angiotensin. *Circ. Res.* 14:337-44
143. Dempsev PJ, McCallum ZT, Kent KM, Cooper T. 1971. Direct myocardial effects of angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 220:477-81
144. Mottra D, Pinheiro IT, Paiva MO, Guimaraes S. 1999. Prejunctional effects of angiotensin II and bradykinin in the heart and blood vessels. *Anton. Pharmacol.* 19:321-25
145. Booz GW, Baker KM. 1995. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 30:537-43
146. Matsusaka T, Katori H, Inagami T, Fogo A, Ichikawa I. 1999. Communication between myocytes and fibroblasts in cardiac remodeling in angiotensin chimeric mice. *J. Clin. Invest.* 103:1451-58
147. Mercure C, Yogi A, Callera GF, Aranha AB, Bader M, et al. 2008. Angiotensin 1-7 blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ. Res.* 103:1319-26
148. Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Laniers JM, et al. 1994. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 24:37-48
149. Mackins CJ, Kano S, Sevedi N, Schafer U, Reid AC, et al. 2006. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. *J. Clin. Invest.* 116:1063-70
150. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD: Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109:1417–1427, 2002
151. Krop M, Danser AH: Circulating versus tissue renin-angiotensin system: on the origin of (pro) renin. *Curr Hypertens Rep* 10:112–118, 2008
152. Kumar R, Thomas CM, Yong QC, Chen W, and Baker KM The Intracrine Renin-Angiotensin System *Clin Sci (Lond)*. 2012 September ; 123(5): 273–284
153. Huang XR, Chen WY, Truong LD, Lan HY. Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:1738–1747. [PubMed: 12819233]
154. Singh VP, Baker KM, Kumar R: Activation of the intracellular renin angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: role in extracellular matrix production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1675–H1684, 2008
155. Singh VP, Le B, Bhat VB, Baker KM, Kumar R: 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

156. Filipeanu CM, Brailoiu E, Henning RH, Deelman LE, de Zeeuw D, Nelemans SA. Intracellular angiotensin II inhibits heterologous receptor stimulated Ca<sup>2+</sup> entry. *Life Sci.* 2001; 70:171–180. [PubMed: 11787942]
157. Fierensa FL, Vanderheyden PM, Roggeman C, De Backer J, Thekkumkara TJ, Vauquelin G. Tightbinding of the angiotensin AT(1) receptor antagonist. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61:1227–1235. [PubMed: 11322926]
158. Yoo TH, Li JJ, Kim JJ, Jung DS, Kwak SJ, Ryu DR, Choi HY, Kim JS, Kim HJ, Han SH, Lee JE, Han DS, Kang SW. Activation of the renin-angiotensin system within podocytes in diabetes. *Kidney Int.* 2007; 71:1019–1027. [PubMed: 17361112]
159. Takao T, Hori NO T, Kagawa T, Matsumoto R, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Morita T, Terada Y. Possible involvement of intracellular angiotensin II receptor in high-glucose-induced damage in renal proximal tubular cells. *J NepHRol.* 2011; 24:218–224. [PubMed: 20890878]
160. Cook JL, Zhang Z, Re RN. In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circ Res.* 2001; 89:1138–1146. [PubMed: 11739278]
161. Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res.* 1987; 60:422–428. [PubMed: 3555883]
162. Peters J, Wanka H, Peters B, Hoffmann S. A renin transcript lacking exon 1 encodes for a nonsecretory intracellular renin that increases aldosterone production in transgenic rats. *J Cell Mol Med.* 2008; 12:1229–1237. [PubMed: 18782187]
163. Cheng H, Fan X, Moeckel GW, Harris RC. Podocyte COX-2 exacerbates diabetic nephropathy by increasing podocyte (pro) renin receptor expression. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22:1240–1251. [PubMed: 21737546]
164. Bkaily G, Sleiman S, Stephan J, Asselin C, Choufani S, Kamal M, Jacques D, Gobeil F Jr, D’Orleans-Juste P. Angiotensin II AT1 receptor internalization, translocation and de novo synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81:274–287. [PubMed: 12733826]
165. Huang J, Matavelli LC, Siragy HM. Renal (pro)renin receptor contributes to development of diabetic kidney disease through transforming growth factor-beta1-connective tissue growth factor signalling cascade. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011; 38:215–221. [PubMed: 21265872]
166. Cheng H, Fan X, Moeckel GW, Harris RC. Podocyte COX-2 exacerbates diabetic nephropathy by increasing podocyte (pro) renin receptor expression. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22:1240–1251. [PubMed: 21737546]
167. Nguyen D Cat A, Touyz RM. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: NO velmechanisms. *Curr Hypertens Rep.* 2011; 13:122–128. [PubMed: 21274755]
168. Lavrentyev EN, Estes AM, Malik KU. Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2007; 101:455–464. [PubMed: 17626897]
169. Cat A, Touyz RM, Nguyen D Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: NO velmechanisms. *Curr Hypertens Rep.* 2011; 13:122–128.

170. Dell'italia LJ. Translational success stories: Angiotensin receptor 1 antagonists in heart failure. *Circ Res.* 2011; 109:437–452. [PubMed: 21817164]
171. Bkaily G, Sleiman S, Stephan J, Asselin C, Choufani S, Kamal M, Jacques D, Gobeil F Jr, D'Orleans-Juste P. Angiotensin II AT1 receptor internalization, translocation and de NO vo synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81:274–287. [PubMed: 127338261]
172. Pfeffer MA, Lamas GA, Vaughan DF, Parisi AF, Braunwald E. 1988. Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 319:80-86
173. Pfeffer MA, Braunwald E. 1990. Ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 81:1161- 72
174. Yusuf S, Teo KK, Pogue J. (ONTARGET Investigators). Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med.* 2008; 358(15): 1547-59.
175. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ. (ALTITUDE Investigators). Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2012; 367 (23): 2204-13.
176. Fried LF, Emanuele N, Zhang JH. (VA NEPHRON-D Investigators). Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 2013; 369 (20): 1892-1903.
177. Makani H, Bangalore S, Desouza KA. Efficacy and safety of dual blockade of the renin-angiotensin system: meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2013; 346: f360. doi: 10.1136/bmj.f360
178. Haller H, Lindschau C, Erdmann B, Quass P, Luft FC. Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1996; 79:765–772. [PubMed: 8831500]
179. Kumar R, Yong QC, Thomas CM, Baker KM. Review: Intracardiac intracellular angiotensin system in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012; 302:R510–517. [PubMed:22170614]
180. Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz GW, Dostal DE, Kumar R. Evidence of a NO vel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *RegulPept.* 2004; 120:5–13. [PubMed: 15177915]
181. Singh VP, Baker KM, Kumar R. Activation of the Intracellular Renin-Angiotensin System in Cardiac Fibroblasts by High Glucose: Role in Extracellular Matrix Production. *Am J Physiol HeartCirc Physiol.* 2008; 294:H1675–1684. [PubMed:18296558]
182. Dell'italia LJ. Translational success stories: Angiotensin receptor 1 antagonists in heart failure. *Circ Res.* 2011; 109:437–452. [PubMed: 21817164]
183. Vaibhav B. Patel, Jiu-Chang Zhong, Maria B. Grant and Gavin Y. Oudit Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin–Angiotensin System in Heart Failure *Circulation Research.* (2016); 118:1313-1326
184. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002;417:822–828

185. Subissi A. *Preclinical Profile of Zofenopril: An Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor with Peculiar Cardioprotective Properties Cardiovascular Drug Reviews Vol. 17, No. 2. 1999; pp. 115–133*
186. Barbato JC, Mulrow PJ, Shapiro JI, Franco-Saenz R (2002) *Rapid effects of aldosterone and spironolactone in the isolated working rat heart. Hypertension 40(2):130-5.*
187. Robert V, Heymes C, Silvestre JS. *Angiotensin AT1receptor subtype as a cardiac target of aldosterone:role in aldosterone salt induced fibrosis Hypertension 1999; 33:981-986*
188. Lombes M, Ferman N, Bonvalot J. *Identification and role of aldosterone receptors in cardiovascular system Ann Endocrinol 2000 61: 41-46*
189. Rudolophe A Blasi E Delyani J *Tissue specific corticoidogenesis in the rat J mol Cell EndocriNO l 2000;165: 221-224*
190. Mc Kelvic RS, Yousuf S Pericak D *Comparasion of candesartan enalapril and their combination in congestive heart failure randomized evaluation of strategies for left ventricule dysfunction RESOLVED pilot study The RESOLVED Pylot study investigators Circulation 1999 100: 1056-1064*
191. Srinivasan K, Ramarao P, *Animal models in type 2 diabetes research : an overview 2007 Indian J Med Res 125:451-472*
192. Etuk EU. *Animals models for studying diabetes mellitus Agric. Biol. J. N. Am., 2010 1(2): 130-134*
193. Lenyen S. *The mechanisms of alloxan-and streptozotocin induced diabetes Diabetologia (2008) 51: 216-226*
194. Pellegrino M, Christopher B, Michelle M Gerard R. (1998) *Development of a new model of type 2 diabetes in adult rats administrated with streptozotocin and nicotinamide. Diabetes 47: 224-230*
195. Weiss RB. (1982) *Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. Cancer Treat Rep 66:427–438*
196. Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H. (1982) *Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. J Biol Chem 257:6084–6088*
197. Lenzen S. *Alloxan and streptozotocin diabetes. In: Peschke E (ed) Endokrino logie III Vorträge im Rahmen des Projektes 'Zeitstrukturen endokriner Systeme. (2007) [Endocrinology III lectures within the 'time structures of endocrine systems' project framework]. Abhandlung der Sächs. Akad. Wiss., Math-naturwiss Klasse, Verlag der Sächsischen Akademie der Wissenschaften, Leipzig, commissioned by S. Hirzel Verlag, Stuttgart/Leipzig, pp 119–138*
198. Severson DL. *Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. Can J Physiol Pharmacol.2004; 82:813– 823.*
199. Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED. *Reduced cardiac efficiency and altered substrate*



- metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. Endocrinology. 2005;146:5341–5349*
200. Semenza GL. *Life with oxygen. Science 2007; 318: 62-4.*
201. Chang Cheng Y, Chuang LM. *The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication Am J Transl Res 2010; 2(3): 316-331*
202. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 10771-8.*
203. Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM. *Disulfideformation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. Science 2009; 324: 1284-7.*
204. Ushio-Fukai M. *Localizing NADPH oxidase-derived ROS. Sci STKE 2006; 349: re8.*
205. Birben E, Sahiner M U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. *Oxidative Stress and Antioxidant Defense WAO Journal 2012; 5: 9–19*
206. Jenner P. *Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann Neurol. 2003;53: S26–S36.*
207. Stadtman ER. *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. Free Radic Biol Med 1990; 9: 315–325.*
208. Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER. *Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. Proc Natl Acad Sci U S A 1983; 80: 1521–1525.*
209. Girotti AW. *Mechanisms of lipid peroxidation. J Free Radic Biol Med 1985; 1: 87–95.*
210. Imlay JA. *Pathways of oxidative damage. Annu Rev Microbiol 2003; 57: 395-418.*
211. D'Autréaux B, Toledano MB *ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 813-24.*
212. *Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 329: 977–86.*
213. *UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998; 352: 837–853.*
214. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. *Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. N Engl J Med 2008; 358: 580–591.*
215. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. *Oxidative stress and diabetic vascular complications. Diabetes Care 1996; 19: 257-67.*

216. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL *NO* rmalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787-90.
217. Watanabe K, Thandavarayan R. A, Harima M, Sari F. R, Gurusamy N, Veeraveedu P. T, Mito S, Arozal W, Sukumaran V, Laksmanan A. P, Soetikno V, Kodama M. and Aizawa Y. Role of Differential Signaling Pathways and Oxidative Stress in Diabetic Cardiomyopathy. *Current Cardiology Reviews* 2010; 6: 280-290
218. Lakshimi SVV, Padmaja G, Kuppusami P, Kutala K. V. Oxidative stress in cardiovascular disease *Indian Journal of Biochemistry and biophysics* 2009; 46: 421-440
219. Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications *Circ Res* 2010; 107: 1058-1070.
220. Esra B E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S and Kalayci O Oxidative Stress and Antioxidant Defense *WAO Journal* 2012; 5:9–19
221. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813–820
222. Houston N, Rosen ED, and Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440: 944–948
223. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci. Dec* 1997; 22(12): 477-81
224. D Turjačanin-Pantelić Efekti acetil salicilne kiseline na izolovano srce pacova interakcija l arginine *NO* sistema ciklooksigenaznog sistema i oksidaciono stresa: doktorska disertacija 2011.
225. Jakovljević V. Interakcije *NO* -sistema i miogenog tonusa u koronarnoj autoregulaciji pacova. Magistarski rad, Medicinski fakultet, Kragujevac, 1998.
226. 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 Aug-Oct;19(4-5):221-357
227. KoppeNO l WH, Kissner R. Can  $O=NOOH$  undergo homolysis? *Chem Res Toxicol.* 1998 Feb; 11(2): 87-90
228. Liu R, Li B, Quui M. Elevated superoxide production by active H-ras enhance human lung WI-38 VA—13 cell proliferation, migration and resistance to TNF. *Oncogene* 2001; 2: 1486-96
229. Dessy C, Ferron O. Pathophysiological Roles of Nitric Oxide: In the Heart and the Coronary Vasculature. *Current Medical Chemistry – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 2004; 3 (3): 207–216
230. West MB, Ramana KV, Kaiserova K, Sirvastava SK. and Bhatngar A. L-Arginin prevents metabolic effects of high glucose in diabetic mice *FEBS let* 2008 23; 582(17): 2609-2614

231. Harder DR, Campbell Wb, Roman RJ. Role of cytochrome P-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *J Vasc Res* 1995; 32 (2): 79-92
232. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. Apr 28 1994; 368 (6474): 850-3
233. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR and Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2001; 282: 1075–1079
234. Boyd CS and Cadenas E. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol. Chem* 2002; 383: 411–423
235. Makino N, Dhalla KS, Elimban V, Dhalla NS Sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport in streptozotocin induced diabetic cardiomyopathy in rats. *American Journal of Physiology endocrinology and metabolism* 1987; 253:2:202-7
236. Boudina S, Abel ED Diabetic cardiomyopathy causes and effects (2010) *Rev Endocrin Metabol Disord* march 11(1):31-39
237. Takayushi M, Yuda S, Kousu H, Miura T Diabetic cardiomyopathy pathophysiology and clinica features (2013) *Heart Fail Rev* (2013) 18:149–166
238. Zhang M, Shah AM ROS signalling between endothelial cells and cardiac cells *Cardiovascular Research*( 2014) 102, 249-257
239. Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM (2005) Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(5):H2144-52.
240. Khanna S, Singh GB, Khullar M (2014) Nitric oxide synthases and diabetic cardiomyopathy. *Nitric Oxide*. 1;43:29-34
241. NS Dhalla, S Rangi, S Zieroth, Y-J Xu. Alterations in sarcoplasmic reticulum and mitochondrial functions in diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Cardiol* 2012; 17(3):115-120.
242. Lagadic-Gossmann D, Buckler KJ, Prigent KL, et al. Altered Ca<sup>2+</sup> handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 270:H1529-37.
243. Carnicelli V, Frascarelli S, Zucchi R (2011) Effect of acute and chronic zofenopril administration on cardiac gene expression. *Mol Cell Biochem* 352(1-2):301-7.
244. Zhong Y, Ahmed S, Grupp IL, Matlib MA (2001) Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281(3):H1137-47.
245. Frascarelli S, Carnicelli V, Ghelardoni S, Chielini G, Ronca F, Zucchi R Effects of Zofenopril on cardiac sarcoplasmic reticulum calcium handling (2009) *J cardiovasc Pharmacol NO v*; 54(5): 456-63
246. NS Dhalla, S Rangi, S Zieroth, Y-J Xu. Alterations in sarcoplasmic reticulum and mitochondrial functions in diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Cardiol* 2012;17(3):115-120.

247. Riamondi L, De Paoli P, Mannucci E, Lonardo G, Sartiani L, Banchelli G, Pirisino R, Mugelli A, Carbai E Restoration of cardiomyocyte functional properties by Angiotensin II receptor blockade in diabetic rats 2004 *Diabetes* 53:1927-1933
248. Sunil KK, Surti J, Siva KK, Sandip P, Lalit KM, Kirtikumar DM Spirinilactone; the ultimate blocker of RAAS cascade in hypertensive patients with special reference to its cardiovascular benefits:Revisiting the forgotten ways *Bangladesh Journal of medical Science* 11:2:80-6
249. Verma S, Violet GY, Badiwala M, Anderson JT, McNeil LH, Working heart function in diabetes is not improved by spirono lactone treatment 2003 *Can.J.Physiol. Pharmacol* 81:493-496
250. Miric D, Dellemagne C, Endre Z, Margolin S, Taylor SM, Brown L Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidon and spirino lactone in streptozotocin diabetic rats 2001 *Br. J. Pharmacol.* 133: 687-694
251. Westerman D, Riad A, Lettau O, Roks A, Savvatis K, Moritz Beker P, Esher F, Jan Danser A H, Schulthheiss HP Tschope T Renin inhibition improves cardiac function and remodeling after myocardial infarction independent of blood pressure (2008) *Hypertension* 52:1068-1075
252. Yang NY, Liao CC, Hung MJ, Cherng WJ Direct renin inhibitor attenuates left ventricular remodeling in post myocardial infarction heart failure mice 2013 *Acta cardiologica*; 29: 160-167
253. Parodi-Rullan R, Barreto-Torres G, Ruiz L, Casanovas J, Javadov S Direct renin inhibition exerts anti-hypertrophic effect associated with improved mitochondrial function in post infarction heart failure in diabetic rats *Cell Physiol Biochem* (2012);29:841-850
254. Thomas CM, Yong QC, Seqqat R, Chandel N, Feldman DL, Baker KM, Kumar R Direct renin inhibition prevents cardiac dysfunction in diabetic mouse model: comparison with an angiotensin receptor antagonist and angiotensin converting enzymeinhibitor *Clinical science* (2013) 124, 529-541
255. Ho E, Galougahi K K, Liu C C, Bhindi R, Biological markers of oxidative sterss:Applications to cardiovascular research and practice (2013) *Redox Biology* 1 483-491
256. Evangelista S, Manzini S Antioxidant and cardioprotective properties of the sulphidril angiotensine converting enzyme inhibitor zofenopril.(2005) *The journal of international medical research* 33:42-54
257. Rashikh A, Najmi A K, Akhtar M, Mahmood D, Pillai K K, Ahmad S J Protective effect of aliskiren in doxorubicin induced acute cardiomyopathy in rats (2011) *Human and experimental toxicology* 30(2)102-109
258. Zhang W, Han Y, Meng, G, Direct renin inhibition with aliskiren protects against myocardial ishemia reperfusion injury by activating nitric oxide synthase signaling in spontaneously hypertensive rats.(2014) *Am J heart asoc*;3(1):e000606

259. Yamamoto E, Kataoka K, Dong Y F Aliskiren enhances protective effects of valsartan against cardiovascular and renal injury in endothelial nitric oxide synthase deficient mice.(2009) *Hypertension* 54(3):633-8
260. Kamal S Aliskiren augments the activities of antioxidant enzymes in liver homogenates of DOCA Salt induced hypertensive rats.*Sci Res.*2014;2:92-9
261. Plecevic S, Pechanova O, Barta A, Vranic A, Jeremic J, Arsenijevic Lj, Jeremic N, Jakovljevic V, Jevdjevic M, Stanojevic D Effects of the direct renin inhibitor aliskiren on oxidative stres in isolated rat heart(2015) *Ser J Exp Clin Res* 16(3):193-199
262. Vaziri N D, Lin C Y, Farmand F, Sindhu R K Superoxide dismutase,catalase,glutation peroxidase and NADPH oksidase in lead-induced hypertension (2003) *Kidney int* 63(1):186-194
263. Naranjan S D,Temsah N R, Netticadan T Role of oxidative stres in cardiovascular disease *Journal of hypertension* (2000);18.6:655-73
264. Barbato J C, Rashid S, Murlow P J, Shapiro I J, Franco-Saenz R Mochanisms or Aldosterone and Spirinolactone-induced positive inotropic actions in the heart (2004;44:751-757
265. Dhalla NS, Rangi S, Zieroth S, Xu Y-J. Alterations in sarcoplasmic reticulum and mitochondrial functions in diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Cardiol* 2012;17(3):115-120
266. Van den Bergh A, Vanderper A, Vangheluwe P, Desjardins F, Nevelsteen I, Verreth W, et al. Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):371–9
267. Abraham I, MacDonald K, Hermans C, Aerts A, Lee C, Brié H, et al. Real-world effectiveness of valsartan on hypertension and total cardiovascular risk: review and implications of a translational research program. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 209
268. Raeisi S, Ghorbanihaghjo A, Argani H, Dastmalchi S, Ghasemi B, Ghazizadeh T, Rashtchizadeh N, Mesgari Abbasi M, Bargahi N, Nemati M, Mota A, Vatankhah AM. The effects of valsartan on renal glutathione peroxidase expression in alleviation of cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Bioimpacts.* 2016;6(3):119-124.
269. Jiao B, Wang Y, Cheng Y, Gao J, Zhang Q. Valsartan attenuated oxidative stress, decreased MCP-1 and TGF- $\beta$  1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels. *Biosci Trends.* 2011; 5: 173-81.
270. Wu B, Lin R, Dai R, Chen C, Wu H, Hong M. Valsartan attenuates oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation and reduces myocardial apoptosis after ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2013; 705: 140-7.

271. Dandona P, Kumar V, Aljada A, Ghanim H, Syed T, Hofmayer D, Mohanty P, Tripathy D, Garg R, 2003. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an anti-inflammatory action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4496–4501
272. Berthouneche C, Sulpice T, Boucher F, Gouraud L, de Leiris J, O'Connor S, E, Herbert J, M, Janiak P, 2004. New insights into the pathological role of TNF- $\alpha$  in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H340–350.
273. Berthouneche C, Sulpice T, Tanguy S, O'Connor S, Herbert J, M, Janiak P, de Leiris J, Boucher F, 2005. AT1 receptor blockade prevents cardiac dysfunction after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 19, 251–259.
274. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- $\alpha$ -dependent pathway. *Diabetes.* 2008 Feb; 57(2):460-9.
275. Hadi NR, Al-Amran FG, Hussien YA, Al-Yasiri IK, Al-Turfy M. The cardioprotective potential of valsartan in myocardial ischaemia reperfusion injury. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):159-66. doi: 10.5114/ceji.2015.52829. PubMed PMID: 26557029; PubMed Central PMCID: PMC4637390.
276. Moreau D<sup>1</sup>, Chardigny JM, Rochette L. Effects of aldosterone and spironolactone on the isolated perfused rat heart. *Pharmacology.* 1996 Jul;53(1):28-36.
277. Silva MA, Bruder-Nascimento T, Cau SB, Lopes RA, Mestriner FL, Fais RS, Touyz RM, Tostes RC. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. *Front Physiol.* 2015 Oct 5;6:269.
278. Ojeda-Cervantes M, Barrera-Chimal J, Alberú J, Pérez-Villalva R, Morales-Buenrostro LE, Bobadilla NA. Mineralocorticoid receptor blockade reduced oxidative stress in renal transplant recipients: a double-blind, randomized pilot study. *Am J Nephrol.* 2013;37(5):481-90.
279. Mayyas F, Alzoubi KH, Bonyan R. The role of spironolactone on myocardial oxidative stress in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovasc Ther.* 2016 Dec 19. doi: 10.1111/1755-5922.12242. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27992114.

280. Silva MA, Bruder-Nascimento T, Cau SB, Lopes RA, Mestriner FL, Fais RS, Touyz RM, Tostes RC. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. *Front Physiol.* 2015 Oct 5;6:269. doi: 10.3389/fphys.2015.00269. PubMed PMID: 26500555
281. Pérez JC, Ramírez AC, González LT, Espinosa LE, Quintana MM, Galván GA, Chavira HZ, de la Garza FJ, Lemarroy CR, Garza NE, Rodríguez EP, Pérez PC. Spironolactone Effect in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3196431. doi: 10.1155/2016/3196431. PubMed PMID: 26798418; PubMed Central PMCID: PMC4700188.
282. Wang LP, Fan SJ, Li SM, Wang XJ, Sun N. [Aliskiren inhibits proliferation of cardiac fibroblasts in AGT-REN double transgenic hypertensive mice in vitro]. *Sheng Li Xue Bao.* 2016 Oct 25;68(5):684-690. Chinese. PubMed PMID: 27778035.
283. Zhang W, Han Zi, Meng G, Bai W, Liping Ms, Lu H, Shao Y, Wei L, Pan S, Zhou S, Chen Q, Ferro A, Ji Y Direct renin inhibition with aliskiren protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating nitric oxide synthase signaling in spontaneously hypertensive rats (2014) *J Am Heart Assoc.* 3:e000606 doi 10.1161/JAHA.113.000606